

JAMILE RAMOS DA SILVA

**VACINAS BASEADAS EM RNA
MESSAGEIRO FORMULADAS EM
NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS PARA
TRATAMENTO DE TUMORES
INDUZIDOS PELO HPV-16**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutorado em Ciências.

São Paulo

2021

Jamile Ramos da Silva

**Vacinas baseadas em RNA mensageiro
formuladas em nanopartículas lipídicas para
tratamento de tumores induzidos pelo HPV-16**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutorado em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Luís Carlos de Souza Ferreira

Versão corrigida.

São Paulo

2021

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Ramos da Silva, Jamile

Vacinas baseadas em RNA mensageiro formuladas em nanopartículas lipídicas para tratamento de tumores induzidos pelo HPV-16 / Jamile Ramos da Silva; orientador Luís Carlos de Souza Ferreira. -- São Paulo, 2021.

161 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. RNAm. 2. Vacina terapêutica . 3. RNAm autorreplicativo. 4. Imunoterapia. 5. Câncer cervical. I. de Souza Ferreira, Luís Carlos, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): **Jamile Ramos da Silva**

Título da Dissertação/Tese: **Vacinas baseadas em RNA mensageiro formuladas em nanopartículas lipídicas para tratamento de tumores induzidos pelo HPV-16**

Orientador: **Luís Carlos de Souza Ferreira**

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Vacina de RNA auto-amplificante como estratégia imunoterapêutica para o controle de tumores induzidos por HPV-16*", registrado sob o protocolo nº **121/2016**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **16/11/2016** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Luis Carlos de Souza Ferreira**

- Departamento: *Microbiologia*

- Membros da Equipe: *Jamile Ramos da Silva (Pós-graduando), Mariana de Oliveira Diniz (Pós-doutorando), Natiely Silva Sales (Pós-graduando), Mariângela de Oliveira Silva (Pós-graduando)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico www.icb.usp.br/ceua. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*Self-amplifying RNA as immunotherapeutic strategy for the control of tumors induced by HPV-16*", protocol nº **121/2016**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **11/16/2016** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) Luis Carlos de Souza Ferreira**

- Team members: *Jamile Ramos da Silva (Graduate Student), Mariana de Oliveira Diniz (Postdoctoral Researcher), Natiely Silva Sales (Graduate Student), Mariângela de Oliveira Silva (Graduate Student)*.

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
<i>Mus musculus</i>	C57bl/6	Fêmeo/female	7-8 semanas/weeks	665

São Paulo, 23 de novembro de 2016.



Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes
Coordenador CEUA-ICB/USP



Eliane Aparecida Gomes de M. Nascimento
Secretária CEUA-ICB/USP



Uso de animais
para experimentação



DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que

Jamile Ramos da Silva

participou do Curso "Uso de Animais em Experimentação" com carga horária total de 10 horas, em formato ensino a distância, realizado pela Comissão de Biotérios do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

São Paulo, 28 de agosto de 2020
Comissão de Biotérios
ICB USP

Dedico esse trabalho:

Aos meus pais
Ângela e Oscar,

Aos meus irmãos
Tainan, Carolaine e Guilherme,

Por acreditarem em mim,
vibrarem a cada conquista
e compartilhar do mais puro amor

Com imenso carinho

AGRADECIMENTOS

Escrever em poucas páginas para expressar todos os meus agradecimentos às pessoas que contribuíram para realização dessa tese de doutorado, chega a ser injusto, porque não é só um estudo científico, mas aqui também descreve um trajeto de realizações de sonhos, amadurecimento pessoal e profissional, renúncias, e escolhas que fizeram parte dessa minha trajetória de 8 anos na pós-graduação. Por isso, inicio agradecendo à Deus por ter colocado cada um de vocês na minha vida, me guiar até aqui, e principalmente, por tornar meus sonhos reais.

Agradeço aos meus pais Ângela e Oscar, por todo o amor, preocupação, orações, lágrimas, saudades, carinhos dedicados a mim de forma incondicional. Por estarem ao meu lado em todos os momentos e sempre acreditar no meu sucesso e me apoiar em todas as minhas decisões. E aos meus irmãos, Tainan, Carolaine e Guilherme, os quais amo muito. Agradeço pelas ligações, sorrisos, afetos, principalmente por se orgulharem de mim e sempre desejarem meu sucesso. A vocês o meu muito obrigada por conviverem com a saudade de todos os dias, esperando até o próximo reencontro. Nada disso faria sentido sem vocês.

Agradeço imensamente ao prof. Luís - um exemplo de conduta profissional para mim - pela orientação, dedicação, amor ao trabalho, incentivo no meu crescimento profissional e científico, por abrir imensas portas na minha carreira profissional e ficar feliz a cada conquista. Mas acima de tudo, agradeço por ser muito mais que um orientador; por sempre me ouvir, me aconselhar, e de forma tão humilde trazer ensinamentos que vão além do que está nessa tese, e levarei para a vida toda.

À Mariana Diniz, a qual tive o privilégio de conhecer e tenho um apreço imenso. Você foi quem concebeu a ideia desse trabalho e mesmo longe se faz muito presente. Qualquer agradecimento a você, não vai expressar tudo que fez e faz continuamente na minha vida e todo o amor que você doa ao seu trabalho. Obrigada pelas horas investidas em delineamento experimental, discussões, correções de texto, me ajudar a solucionar problemas (independente do fuso horário), tirar minhas dúvidas, conselhos profissionais e pessoais, incentivos, paciência e todos os seus ensinamentos, sempre de forma tão humilde. Grande parte do que sou hoje como cientista devo a você.

Ao eterno grupo das HPVtes+1 (meninas e Gui), o qual tive o prazer de conhecer e trabalhar com esse time de pessoas incríveis: Mariana Diniz (Mari), Luana (Luh), Bruna (Bru), Natiely (Nati), Mariângela (Angel), Karine (Ká), Ana Carolina (Rol), e Guilherme (Gui); e as que também passaram por aqui: Tácita (Tatá), Pati, Carina (Cá), Laís e Roberta. Foram muitos momentos de parceria, execução de experimentos, discussões de *papers* e resultados, conselhos, palavras de conforto diante das dificuldades, amizades, risadas, conversas (muitas fofocas), muitos cafés, festinhas de aniversário, reuniões na casa da Luana e *fitdance*. Obrigada por suportarem todo o meu drama (que não foram poucos momentos), e me apoiarem em tudo. Tenho muito orgulho de fazer parte dessa equipe. Eu não teria chegado aqui sem vocês. Em especial agradeço à Carol, por me ensinar muito a escrever e sempre corrigir meus textos; à Ka, por SEMPRE estar disposta a ajudar de um jeito tão comprometido e por ser tão amiga; e à Luana, empresária, cientista, mãe, amiga e parceira, que mesmo com suas mil atividades, consegue estar de unha feita e ainda dedicar tempo para nos ajudar, corrigir textos, sempre disponível sem medir esforços. Agradeço principalmente aos seus conselhos, que com certeza, mesmo que você não saiba, foram essenciais para a minha evolução pessoal (lembro de todos eles). Aqui expresso com imensa gratidão o meu muito obrigada.

Aos amigos e demais integrantes do laboratório LDV: Aléxia, Samuel, Lennon, Fernanda, Fagner, Lukas, Eduardo, Erik, Nayara, Juliana, Deni, Rubéns, Robert, Marianna Favaro, Mônica, Sammy, prof Rita; aos colaboradores de outros laboratórios: Wesley e Nicole, e outros colegas que passaram por aqui e estiveram presentes durante meu período no laboratório; obrigada pelas trocas de conhecimentos diversos, colaborações e discussões. Em especial, à Wesley pelas aulas de biologia molecular, por me ensinar tanto, e me auxiliar a estabelecer as colaborações no exterior. Agradeço também ao Eduardo (Edu) pela competência na qual exerce o seu trabalho, e por estar sempre disposto a ajudar. Muito obrigada por todo o suporte que você proporciona diariamente ao laboratório.

Aos integrantes do laboratório da Universidade da Pensilvânia: Dorottya, Hiro, Istvan, Elena, Mohamad, Ambika e Drew na qual pude conhecer, aprender técnicas e compartilhar conhecimentos importantíssimos na minha carreira profissional. À Katalin Karikó por confiar em mim, me indicar para o seu laboratório e participar de discussões no meu trabalho. E em especial ao meu supervisor Norbert Pardi, o qual tive a honra de trabalhar. Agradeço pela paciência, pelas horas dedicadas à minha orientação, por

ter confiado no meu potencial, me ensinar sobre organização, e me proporcionar grandes ensinamentos que me fizeram crescer e amadurecer profissionalmente. Sou muito grata a todos vocês.

Aos meus muitos amigos conquistados durante a minha trajetória na USP: às meninas Karine, Aléxia, Naty, Bianca, Mari e Luh (Luísa), e também à Greg e Gabriel, pela amizade, momentos *fitness* ou não, festinhas, reuniões regadas à vinhos (chalise, pérgola ou não), drinks, muita comida, cafés, e por todo suporte emocional, principalmente durante a pandemia; À Luísa, a qual tive o prazer de conhecer e compartilhar momentos únicos em meio a quarentena, dividir momentos ímpares da minha vida, fazendo o que uma taurina e uma sagitariana fazem de melhor: comer. Obrigada pelos conselhos, por se preocupar comigo sempre. Aos queridos amigos de laboratório e da vida: Patrícia, Tácita, Nayara, Samuel, Lennon, Maria Fernanda (a mais jovem de todas), Percília, Tiffany, Raquel, Mari França, Irla, Fran, e outros que conheci durante todo esse período; minha família, tios e primos, por todo suporte que me deram aqui em São Paulo; os amigos que fiz durante o estágio no exterior: Tati, Kevin, Andressa, Julie Andréia e Mint, que fizeram meus dias mais alegres e me deram todo apoio emocional que precisava durante meu período fora do Brasil.

Agradeço também, a todos que me ajudaram muito nas dicas de escrita, e apresentações em inglês: Mari Diniz, Luana, Fer (Nanda), Marianna Favaro, Rubéns, Tácita, Bruna, Wesley e minhas professoras de língua inglesa: Jéssica e Mari; que tiveram paciência comigo durante meu processo de aprendizado, que veio sempre acompanhado de muito desespero e drama, mas que com o suporte de vocês, fui conseguindo superar meus medos. Agradeço imensamente a vocês.

Aos funcionários dos biotérios dos Departamentos de Microbiologia e Parasitologia pela atenção e competência no cuidado dos animais. Aos funcionários e ex-funcionários da USP com os quais tive o prazer de conviver no período que fiquei aqui, em especial a Gisele secretária do Departamento de Pós-Graduação, por toda competência e eficiência na conduta do seu trabalho. Sem vocês essa tese não estaria concluída.

Ao apoio financeiro das agências de fomento: CNPq, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), nº 2016/11594-7 e 2019/01523-3.

E a todos que colaboraram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Este trabalho foi realizado sob orientação do Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira, desenvolvido no Centro de Vacinas e Terapia Gênica (CEVAT – GENE 4), no Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) sob os processos, nº 2016/11594-7 e 2019/01523-3.

“Tudo o que você precisa saber é que, quando se passa por uma experiência do tipo, o resultado é um de dois extremos: ou você perde completamente a esperança e se despedaça por completo, ou ganha tanta força que tem certeza de que ninguém mais pode te derrubar.”

Malala Yousafzai, no livro “longe de casa”.

RESUMO

SILVA, J. R. **Vacinas baseadas em RNA mensageiro formuladas em nanopartículas lipídicas para tratamento de tumores induzidos pelo HPV-16.** 2021. 161 f. Tese (Doutorado em Microbiologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

O câncer do colo do útero é causado por infecções persistentes pelo papilomavírus humano (HPV), e se destaca como uma das principais causas de mortes por câncer em mulheres. Devido às taxas de recidiva após os tratamentos convencionais, o desenvolvimento de estratégias antitumorais seguras e eficazes ainda é uma necessidade não atendida. Em particular, tumores associados ao HPV expressam, constitutivamente, as oncoproteínas E6 e E7, as quais representam excelentes alvos para o desenvolvimento de vacinas terapêuticas. Neste trabalho, desenvolvemos três formulações vacinais terapêuticas baseadas em RNA mensageiro (RNAm) incorporado em nanopartículas lipídicas (LNP) que codificam para o antígeno gDE7, uma proteína derivada da fusão da glicoproteína D do vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) e da oncoproteína E7 do HPV-16. Para avaliação do efeito antitumoral das formulações, foi utilizado o modelo de implante de células da linhagem TC-1, caracterizado mundialmente e que fornece uma prova de conceito pré-clínica de tumores associados ao HPV. Nossos resultados demonstram que, com uma única dose, e em baixa concentração, as vacinas de RNAm-LNP foram capazes de controlar tumores em diferentes estágios de crescimento, promover a expansão de células T de memória e prevenir recidivas tumorais. Além disso, as vacinas foram capazes de induzir uma ativação robusta de células T CD8⁺ E7-específicas com atividade citotóxica e conferiram erradicação de tumores em dois modelos de transplante ortotópico (intravaginal e sublingual). Em resumo, o presente estudo descreve a eficácia terapêutica de três vacinas de RNAm-LNP voltadas para o controle de tumores associados ao HPV-16 e contribui para a pesquisa de vacinas com perspectivas para futuras aplicações clínicas.

Palavras-chave: RNAm. Vacina terapêutica. RNAm autorreplicativo. Imunoterapia. Câncer cervical.

ABSTRACT

SILVA, J. R. **mRNA-based vaccines formulated in lipid nanoparticles against tumors induced by HPV**. 2021. 161 p. Thesis (Microbiology). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Cervical cancer caused by persistent human papillomavirus (HPV) is a major cause of cancer deaths in women and the development of safe and effective immune therapeutic strategies represent a high priority. Particularly, HPV-associated tumors express constitutively E6 and E7 oncoproteins, excellent targets for the development of therapeutic vaccines. Given the paramount importance of developing active immunotherapies against these malignancies, we design a mRNA-based therapeutic vaccine lipid nanoparticles (LNP)-formulated encoding antigen gDE7, a fusion protein of herpes simplex virus type 1 glycoprotein D and HPV-16 E7 oncoprotein. Our results provide a proof of concept pre-clinical that with a single low-dose of the tested mRNA vaccines were capable to control tumors at different growth stages and generate memory T cell responses capable to prevent tumor relapses using TC-1 tumor model. Additionally, our vaccines generate robust activation of E7-specific CD8⁺ T cells with cytotoxic activity. Most importantly, our vaccines induced complete eradication of tumor cells using two different orthotropic tumor models (vaginal and tongue). In summary, our findings demonstrate the potency of mRNA vaccines on the treatment of HPV-associated tumors and raise perspectives for future applications at clinical settings.

Keywords: mRNA. Therapeutic vaccine. Self-amplifying mRNA. Immunotherapy. Cervical cancer.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Tipos de vacinas baseadas em RNAm. _____	28
Figura 2. Mecanismo de replicação dos re-RNAm. _____	31
Figura 3. Modificações nucleosídicas mais frequentes observadas em RNAm de eucariotos. _____	34
Figura 4. Caracterização e purificação de vacinas de RNAm _____	61
Figura 5. Produção da vacina re-RNAm a partir do vetor T7-OPAL1 _____	62
Figura 6. Avaliação do efeito da adição de Cap1 na atividade de luciferase após transfecção de células HEK 293-T usando diferentes estratégias de RNAm que codifica Luc _____	63
Figura 7. Avaliação da atividade de luciferase após transfecção de células HEK 293-T e células dendríticas derivadas de monócitos (mo-DC) humanos usando RNAm que codifica Luc _____	66
Figura 8. Avaliação da luminescência <i>in vivo</i> de camundongos inoculados com nr-RNAm e re-RNAm. _____	68
Figura 9. Imunização com gDE7 RNAm-LNP induz resposta robusta de células T CD8 ⁺ E7-específica contra tumores induzidos por HPV em camundongos ____	71
Figura 10. Imunização com gDE7 RNAm-LNP induz aumento de células T CD8 ⁺ E7-específicas secretoras de IFN- γ em modelo de tumores induzidos por HPV-16. _____	73
Figura 11. Análise de linfócitos T CD8 ⁺ E7-específicos em animais imunizados com diferentes formulações de gDE7 RNAm-LNP em modelo de tumores induzidos por HPV-16. _____	74
Figura 12. Imunização com gDE7 RNAm-LNP induz atividade citotóxica <i>in vivo</i> mediada por células T CD8 ⁺ E7-específicas em modelo de tumores induzidos por HPV-16. _____	75
Figura 13. Avaliação da proteção terapêutica das diferentes vacinas baseadas em gDE7 RNAm-LNP no modelo de tumores induzidos por HPV. _____	79
Figura 14. Imunização com dose única de gDE7 RNAm-LNP induz proteção de longo prazo contra recidivas de tumores associados ao HPV-16. _____	80

Figura 15. Imunização com dose única de gDE7 RNAm-LNP induz infiltração de células T CD8⁺ E7-específicas de memória no modelo de tumores associados ao HPV-16.	84
Figura 16. A eficácia da proteção tumoral das vacinas de gDE7 RNAm-LNP requer células T CD8⁺ e depende parcialmente das respostas imunes das células T CD4⁺.	86
Figura 17. Imunização com baixas doses das vacinas baseadas em gDE7 RNAm-LNP induzem regressão parcial de tumores estabelecidos.	88
Figura 18. As vacinas baseadas em gDE7 RNAm-LNPs induzem proteção antitumoral em dois modelos de tumores ortotópicos.	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Rendimento das reações de re-RNA _m IVT em diferentes tempos de incubação da reação.....	61
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

μg	micrograma (10^{-6} grama)
μl	microlitro (10^{-6} Litro)
μm	micrometro
ACK	<i>Ammonium-Chloride-Potassium</i> (Amônio-Coreto-Potássio)
AEC	<i>3-amino-9-ethylcarbazole</i>
AF	Alexa flúor
APC	Aloficocianina
APCs	<i>Antigen presenting cell</i> (célula apresentadora de antígeno)
ATP	Trifosfato de adenosina
BTLA	<i>B and T lymphocyte attenuator</i> (atenuador de linfócitos B e T)
BV	<i>Brilhart violet</i>
CA	Cambride
CBA	<i>Cytometric beads array</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i> (grupo de diferenciação)
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CFSE	<i>Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester</i>
CO ₂	Dióxido de carbono
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
Covid	<i>Coronavirus Disease 2019</i>
CTLA4	<i>Cytotoxic T Lymphocyte antigen-4</i> (antígeno 4 de linfócitos T citotóxicos)
CTP	trifosfato de citidina
D	diâmetro

DCs	<i>Dendritic cells</i> (células dendríticas)
DEXTR	Dextrâmero
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucléico)
dsRNA	<i>double-stranded RNA</i> (RNA de fita dupla)
E	<i>Early protein</i> (proteína de expressão precoce)
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (Ácido etileno diamino tetra acético)
EIF	<i>Eukaryotic translation initiation</i> (Fator de iniciação eucariótica)
ELISpot	<i>enzyme-linked immune absorbent spot</i>
EUA	Estados Unidos da América
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i> (Separador Celular Ativado por Fluorescência)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FITC	Fluoresceína
FPLC	<i>Fast performance liquid chromatography</i>
FSC	<i>Forward scatter</i>
g	grama
g	Gravitacional
GAPDH	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
gD	Glicoproteína D
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i> (Fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos)
h	Hora(s)
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i> (vírus da imunodeficiência humana)

HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> (cromatografia líquida de alta performance)
HPV	<i>Human papillomavirus</i> (vírus do papiloma humano)
HSV	<i>Herpes simplex virus</i> (vírus herpes simplex)
HVEM	<i>Herpesvirus entry mediator</i> (mediador de entrada do vírus herpes)
i.d.	Intradérmica
i.m.	Intramuscular
i.p.	Intraperitoneal
IACUC	(<i>Institutional Animal Care and Use Committees</i>) Comitês Institucionais de Cuidado e Uso de Animais
ICS	<i>Intracellular cytokine staining</i> (marcação intracelular de citocinas)
IFN	Interferon
IgG:	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
IVIS	<i>In vivo imaging system</i>
IVT	<i>in vivo transcription</i> (Transcrição <i>in vitro</i>)
Kg	kilograma
KLRG	<i>Natural Killer Cell Lectin Like Receptor</i>
KO	<i>Knockout</i> (nocaute)
L	<i>Late protein</i> (proteína de expressão tardia)
LNP	Nanopartículas lipídicas
LPS	Lipopolissacarídeos
Luc	Luciferase
M1ΨTP	<i>1-metil-pseudouridina tri-phosphate</i> (trifosfato de 1-metil-pseudouridina)

Mab	Anticorpo monoclonal
MDA5	<i>melanoma differentiation-associated protein 5</i> (Proteína 5 Associada à Diferenciação de Melanoma)
min	minutos
mg	miligrama
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> (complexo principal de histocompatibilidade)
mL	mililitro (10^{-3} Litro)
mm	milímetro (10^{-3} metros)
mm ²	milímetros quadrados
mo-DC	<i>monocytes-derived dendritic cells</i> (Células dendríticas derivadas de monócitos humanos)
MPECs	<i>Memory precursor effector cells</i> (Células efetoras precursoras de memória)
ms	milissegundo (10^{-3} segundos)
NaCl	Cloreto de Sódio
NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa B</i> (fator nuclear kappa B)
ng	nanogramas (10^{-9} grama)
NK	<i>Natural killer cells</i>
nr	não replicativo
nsP	<i>nonstructural protein</i> (Proteínas não-estruturais)
p/s	photons per seconds (fótons por segundos)
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i> (padrão molecular associado aos danos)

pb	Pares de base
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> (células mononucleares do sangue periférico)
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (tampão salina-fosfato)
PCR:	<i>Polymerase chain reaction</i> (reação de polimerase em cadeia)
PE	Ficoeritrina
pH	Potencial de hidrogênio
PKR	<i>Protein kinase RNA-activated</i> (proteína quinase dependente de RNA)
PMA	<i>dodeca molybdophosphoric acid</i> (ácido dodecamolibdofosfórico)
poli-A	poli-adenosina
Poly (I:C)	<i>Polyinosinic:polycytidylic acid</i>
pRb	proteína retinoblastoma
re	replicativo
RIG	<i>retinoic acid-inducible gene I</i> (Proteínas de genes induzíveis pelo Ácido Retinóico)
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay</i> (Ensaio de radioimunoprecipitação)
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (ácido ribonucléico)
RPMI	<i>Meio Roswell Park Memorial Institute</i>
RPRD	RNA polimerase RNA dependente
sc	Subcutâneo
SDS-	<i>Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i> (separação eletroforética em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio)
PAGE	
SEM	<i>standard error of the mean</i> (erro padrão da média)
SFB	Soro fetal bovino
SFC	<i>Spot forming cells</i> (células formadoras de <i>spot</i>)

SFV	<i>Semliki Forest Virus</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i> (Pequeno RNA de interferência)
SLECs	<i>Short-live effector cells</i> (células efectoras de vida curta)
SSC	<i>Side scatter</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i> (ativadores de transcrição de sinal e transdutores de ativação)
STING	<i>Stimulator of interferon genes</i> (Genes estimuladores de Interferon)
TBS	<i>Tris-Buffered Saline</i> (Tampão salina tris-fosfato)
TBS-T	<i>Tris-Buffered Saline-tween</i> (Tampão salina tris-fosfato com adição de detergente <i>Tween</i>)
TCM	<i>T central memory</i> (Células de memória central)
TCR	<i>T cell receptor</i> (Receptor de célula T)
TEV	<i>Tobacco etch virus</i> (vírus do tabaco)
TIL	<i>Tumor-infiltrating lymphocyte</i> (linfócitos infiltrantes no tumor)
TLR	<i>Toll-like receptor</i> (Receptor do tipo Toll)
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i> (fator de necrose tumoral)
TRM	<i>Tissue-resident memory T cells</i> (memória de células T residentes)
U	unidade
UTP	Trifosfato de uridina
UTR	<i>untranslated region</i> (Região não traduzida)
V	voltagem
Vol	Volume
VEE	<i>Venezuelan equine encephalitis</i> (vírus da Encefalite equina venezuelana)
VLPs	<i>Virus Like Particles</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
<	Menor
>	Maior
®	Marca registrada
°C	Graus celsius
†	eutanásia
α	Alfa
β	Beta
μ	micro
γ	Gama
Ψ	Pseudo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	26
1.1	Vacinas baseadas em RNAm	27
1.2	RNAm autorreplicativo como estratégia vacinal	29
1.3	Histórico e avanços importantes na área de desenvolvimento das vacinas de RNAm	31
1.4	nr-RNAm e as modificações nucleosídicas	33
1.5	Nanopartículas lipídicas como métodos de entrega	37
1.6	O HPV e o câncer	39
1.7	Desenvolvimento de vacinas terapêuticas para tratamento de tumores induzidos por HPV	40
1.8	gDE7 como antígeno vacinal	41
2	OBJETIVOS	43
2.1	Objetivo geral	44
2.2	Objetivos específicos	44
3	MATERIAL E MÉTODOS	45
3.1	Animais de experimentação	46
3.2	Linhagens celulares	46
3.2.1	TC-1	46
3.2.2	HEK 293-T	46
3.2.3	Células dendríticas derivadas de monócitos (mo-DC)	47
3.3	Plasmídeos	47
3.4	Vacinas baseadas em RNAm	47
3.5	Produção das vacinas de RNAm IVT	48
3.6	Formulação dos RNAm em nanopartículas lipídicas (LNPs)	48
3.7	Transfecção <i>in vitro</i>	48
3.8	Western blot	49
3.9	Deteccção de bioluminescência <i>in vivo</i>	49
3.10	Implantação do tumor	50
3.10.1	Modelo de tumor subcutâneo	50
3.10.2	Redesafio com as células tumorais	50
3.10.3	Modelo de tumores ortotópicos	50
3.11	Protocolo de imunização	51
3.12	Citometria de fluxo	51

3.12.1	<i>Preparação de amostras para citometria de fluxo</i>	51
3.12.2	<i>Ensaio de linfócitos T citotóxicos in vivo</i>	52
3.12.3	<i>Determinação de células T CD8⁺ produtoras de citocinas</i>	52
3.12.4	<i>Marcação de dextrâmero, detecção de linfócitos infiltrantes no tumor (TIL) e caracterização de células T de memória.</i>	53
3.13	Ensaio de ELISpot	54
3.14	Análise estatística	55
4	RESULTADOS	56
4.1	Síntese <i>in vitro</i> e purificação das vacinas nr-RNA_m e re-RNA_m	58
4.1.2	<i>Otimização da vacina re-RNA_m</i>	61
4.1.3	<i>Expressão do RNA_m codificando Luc e gDE7</i>	62
4.1.4	<i>Expressão in vivo de RNA_m formulado em nanopartículas lipídicas (LNP)</i>	66
4.2	Imunização terapêutica com diferentes vacinas de gDE7 RNA_m-LNPs ...	69
4.2.1	<i>Vacinas gDE7 RNA_m-LNPs induzem ativação robusta de respostas de células T CD8⁺ E7-específicas</i>	69
4.2.2	<i>Eficácia terapêutica e proteção antitumoral das vacinas RNA_m-LNP codificando gDE7 in vivo</i>	76
4.2.3	<i>Imunização com dose única de gDE7 RNA_m-LNP induz proteção de longo prazo contra recidivas de tumores associados ao HPV-16</i>	79
4.2.4	<i>Proteção antitumoral das vacinas gDE7 RNA_m-LNP são mediadas primariamente por respostas de células T CD8⁺ e parcialmente por respostas de células T CD4⁺</i>	85
4.2.5	<i>As vacinas gDE7 RNA_m-LNPs em baixas doses conferem regressão de tumores em estágios mais avançados de crescimento</i>	86
4.3	As vacinas baseadas em gDE7 RNA_m-LNPs induzem proteção antitumoral em dois modelos de tumores ortotópicos	89
5	DISCUSSÃO	94
6	CONCLUSÃO	101
	REFERÊNCIAS	103
	APÊNDICES E ANEXOS	120
	APÊNDICE A – Súmula Curricular	121
	APÊNDICE B – Artigos científicos de primeira autoria publicados durante o período do doutorado	128
	APÊNDICE C– Artigo científicos publicados em colaboração durante o período de dotouramento	155

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Vacinas baseadas em RNAm

Entre 2020 e 2021, o mundo pôde acompanhar os ensaios clínicos bem-sucedidos das vacinas baseadas em RNA mensageiro (RNAm) para a prevenção da COVID-19 (BADEN et al., 2021; POLACK et al., 2020). Esta plataforma biotecnológica despertou interesse generalizado no desenvolvimento de vacinas não apenas contra doenças infecciosas, mas também como estratégia terapêutica para diferentes tipos de câncer. As vacinas das empresas Pfizer-BioNTech e Moderna contra o SARS-Cov-2 foram aprovadas por autoridades regulatórias em diversos países com uma eficácia superior a 94%, apresentando-se como uma estratégia vacinal altamente segura e efetiva em humanos (BADEN et al., 2021; FDA, 2021a; LAMB, 2021; POLACK et al., 2020).

Atualmente, duas plataformas tecnológicas principais para o desenvolvimento de vacinas de RNAm têm sido usadas em modelos clínicos e pré-clínicos: (i) RNAm convencional ou não replicante (nr-RNAm) e (ii) vacinas baseadas em RNAm autorreplicativas (re-RNAm) (**Figura 1**). No geral, as vacinas de RNAm consistem em elementos essenciais, incluindo o cap, as regiões 5' e 3'UTR não traduzíveis flanqueando uma fase de leitura aberta (ORF) que codifica o gene de interesse, seguido pela calda de poli adenosina (poli-A) (SAHIN; KARIKÓ; TÜRECI, 2014). Especificamente, os nr-RNAm são baseadas em moléculas de RNAm mais curtas desenhadas para codificar apenas o antígeno vacinal de interesse (SAHIN; KARIKÓ; TÜRECI, 2014). Por outro lado, as vacinas de re-RNAm, além do antígeno de interesse, contêm sequências adicionais necessárias para a autorreplicação da molécula de RNAm (BLAKNEY; IP; GEALL, 2021). Por isso, os re-RNAm representam uma vantagem em relação aos nr-RNAm, uma vez que permitem a expressão prolongada do antígeno em células transfectadas e, por isso, demandam menores quantidades de RNAm por dose (DE ALWIS et al., 2021; VOGEL et al., 2018a). Embora ambas as estratégias sejam capazes de induzir potentes respostas imunológicas de base celular e humoral, as vacinas de nr-RNAm são as mais avançadas em ensaios clínicos e recentemente aprovadas pelas autoridades regulatórias em todo o mundo (LAMB, 2021).

A. RNAm convencional (não replicativo)



B. RNAm auto-replicativo

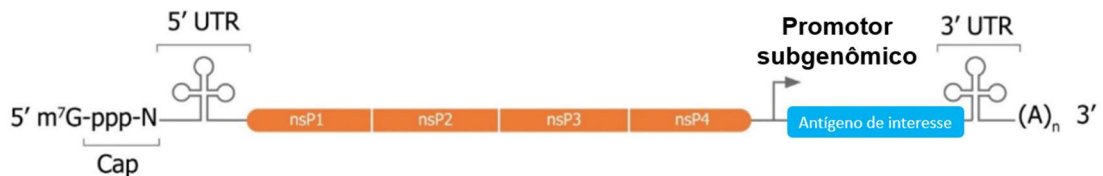


Figura 1. Tipos de vacinas baseadas em RNAm.

Ambas as vacinas de (A) RNAm convencional e (B) autorreplicativo (re-RNAm) compartilham elementos básicos incluindo o cap, regiões 5' UTR, 3' UTR e cauda poli-A de comprimento variável. As vacinas de re-RNAm também codificam quatro proteínas não estruturais (nsP1–4) e um promotor subgenômico derivado do genoma do alfavírus. nsP1–4 codifica uma replicase responsável pela amplificação do re-RNAm. Adaptado de Anna K. Blakney, Shell Ip and Andrew J. Geall, 2021.

A utilização do RNAm como plataforma vacinal apresenta diversas vantagens em relação a outras estratégias. O método de transcrição *in vitro* (IVT) é a técnica utilizada para sintetizar RNAm *in vitro* em poucas horas, por meio de uma transcrição enzimática isenta de células e livre de lipopolissacarídeos (LPS), excluindo assim qualquer preocupação associada com contaminação com endotoxinas frequentemente associado às vacinas baseadas em linhagens bacterianas atenuadas ou inativadas (NORBERT PARDI, HIROMI MURAMATSU, 2013). O IVT é um processo facilmente escalonável, principalmente devido ao alto rendimento das reações, e pouco laborioso, que permite purificação simples, rápida e rentável quando comparado à produção de vacinas baseadas em cultivo viral em ovos, vacinas de DNA ou proteínas recombinantes purificadas (BLAKNEY; IP; GEALL, 2021).

Uma vez no citoplasma da célula, as moléculas de RNAm são traduzidas em proteínas-alvo pela maquinaria de síntese proteica do hospedeiro (IAVARONE et al., 2017). A expressão do antígeno começa horas após a entrada do RNAm IVT na célula e a duração da expressão é transitória e dependente do tempo de vida do RNAm. A tradução do RNAm é controlada por mecanismos intrínsecos de degradação da célula hospedeira e também por modificações presentes na molécula de RNAm (SAHIN; KARIKÓ; TÜRECI, 2014). Como a tradução do RNAm ocorre exclusivamente no citoplasma das células transfectadas, problemas de segurança associados à entrega

intranuclear, como riscos de integração genômica e transformação celular, são evitados, representando, dessa forma, uma importante vantagem sobre vacinas de DNA ou vetores virais (GEALL et al., 2012; KOFLEER et al., 2004).

Outro benefício das vacinas de RNAm é de imunidade contra o vetor, garantindo a segurança dessas vacinas e a possibilidade de aplicação de múltiplas doses (KIM et al., 2020). Além disso, a entrega de antígenos por RNAm permite a geração de potentes respostas imunológicas humorais (anticorpos) e celulares (células T) e, por isso, torna-se uma plataforma tecnológica interessante para o desenvolvimento de tratamentos de doenças crônicas, como o câncer que requer a ação de imunidade baseada em células citotóxicas (IAVARONE et al., 2017). Outra vantagem das vacinas de RNAm é a flexibilidade, permitindo uma rápida adaptação para a expressão de novas sequências de antígenos sejam elas variantes de uma mesma linhagem ou espécie ou de diferentes patógenos. Por exemplo, a vacina de RNAm contra o SARS-Cov-2 foi completamente desenvolvida e aprovada para uso em humanos em menos de um ano após o sequenciamento total do vírus, representando um marco na história do desenvolvimento de vacinas (KIM et al., 2020).

Embora apresentem várias características vantajosas, ainda há espaço para melhorias nas vacinas baseadas em RNAm. A primeira delas é a necessidade de armazenamento em baixas temperaturas, o que dificulta a distribuição em larga escala. Recentemente a vacina de RNAm da empresa Pfizer-BioNTech demonstrou ser passível de armazenamento em geladeira por até 30 dias (FDA, 2021b). No entanto, estudos de estabilidade em longo prazo ainda estão em andamento. Em segundo lugar, está a busca por novas estratégias para a entrega do RNAm na célula-alvo. Os RNAm são moléculas aniônicas, que apresentam repulsão eletrostática com a membrana celular, e por isso, não são internalizados de forma eficiente (PARDI et al., 2018c). Neste contexto, o desenvolvimento de métodos de entrega eficientes, atóxicos, que protejam a molécula contra degradação e que garantam que o RNAm chegue íntegro dentro da célula-alvo, ainda se fazem necessários.

1.2 RNAm autorreplicativo como estratégia vacinal

A hipótese de utilizar o re-RNAm como estratégia vacinal é apoiada por estudos recentes que evidenciaram efeitos superiores aos observados para outras plataformas (DE ALWIS et al., 2021; GEALL et al., 2012; VOGEL et al., 2018a). Os re-RNAm são moléculas grandes (8-12 kb), fundamentadas na plataforma de replicação dos vírus

de RNA, principalmente alfavírus, em que o RNAs de fita positiva apresentam quatro regiões codificadoras para proteínas não estruturais (nsP1–4), dentre elas, a enzima RNA polimerase RNA-dependente (RPRD), um promotor subgenômico e uma região codificadora de proteínas estruturais do vírus (PERRI et al., 2003). A região que codifica para as proteínas estruturais pode ser substituída pela sequência do antígeno alvo, o que resulta em uma molécula de RNAm não infecciosa e capaz de se autorreplicar dentro da célula (**Figura 1**) (LJUNGBERG; LILJESTRÖM, 2015; LUNDSTROM, 2014). Cada uma das proteínas não estruturais codificadas pelo RNA viral desempenha funções que auxiliam na montagem do complexo RDRP. Dentre outras funções, destacam-se: a nsP1 com função envolvida na adição de cap; a nsP2 com as funções de helicase e protease; a nsP3 que define o macro domínio que interage com outras proteínas da célula; e a nsP4 que forma a RDRP (ABU BAKAR; NG, 2018). Uma vez que o re-RNAm entra no citoplasma, a molécula de RNAm é traduzida pela maquinaria de tradução da célula, levado à produção das poliproteínas precursoras do complexo de replicação. A replicase usa a fita de RNAm de sentido positivo como molde para sintetizar novas moléculas de RNAm de sentido negativo. Posteriormente, estas moléculas servem como molde para a síntese de novas fitas positivas da região subgenômica, o que leva a uma produção aumentada do antígeno alvo na célula (ABU BAKAR; NG, 2018) (**Figura 2**).

A replicação do RNAm permite aumentar gradualmente a expressão dos antígenos codificados pelo RNAm, que se mantém por um longo período de tempo. Esse processo leva à exaustão celular, estimulação imunológica pelos intermediários de RNA de fita dupla (dsRNA) e simula o processo de infecção viral com indução de respostas inflamatórias (BLAKNEY; IP; GEALL, 2021; PEPINI et al., 2017). O desencadeamento de uma resposta antiviral pode levar à apoptose da célula, permitindo, ainda, a apresentação de antígenos e ativação de respostas de linfócitos T e B (BRITO et al., 2014b; GEALL et al., 2012; HEKELE et al., 2013; LAZZARO et al., 2015).

Para doenças infecciosas, a utilização do re-RNAm do Vírus da Encefalite Equina Venezuelana para a expressão do antígeno GAG do HIV demonstrou, pela primeira vez, a ativação de forte resposta de células T CD8⁺ específicas, bem como a indução de anticorpos, quando testada em modelo murino (PERRI et al., 2003). Embora seja uma plataforma altamente eficiente para a estimulação das respostas imunológicas, os re-RNAm ainda são pouco explorados no contexto de terapia contra

o câncer. Alguns poucos estudos exploraram o efeito de vacinas baseadas em DNA ou partícula viral codificando um RNAm replicativo para o tratamento do câncer (DAEMEN et al., 2003; KOMDEUR et al., 2021; MORSE et al., 2010; VAN DE WALL et al., 2018), mas a imunização direta de re-RNAm IVT codificando para antígenos tumorais para controle de tumores ainda não foi explorada.

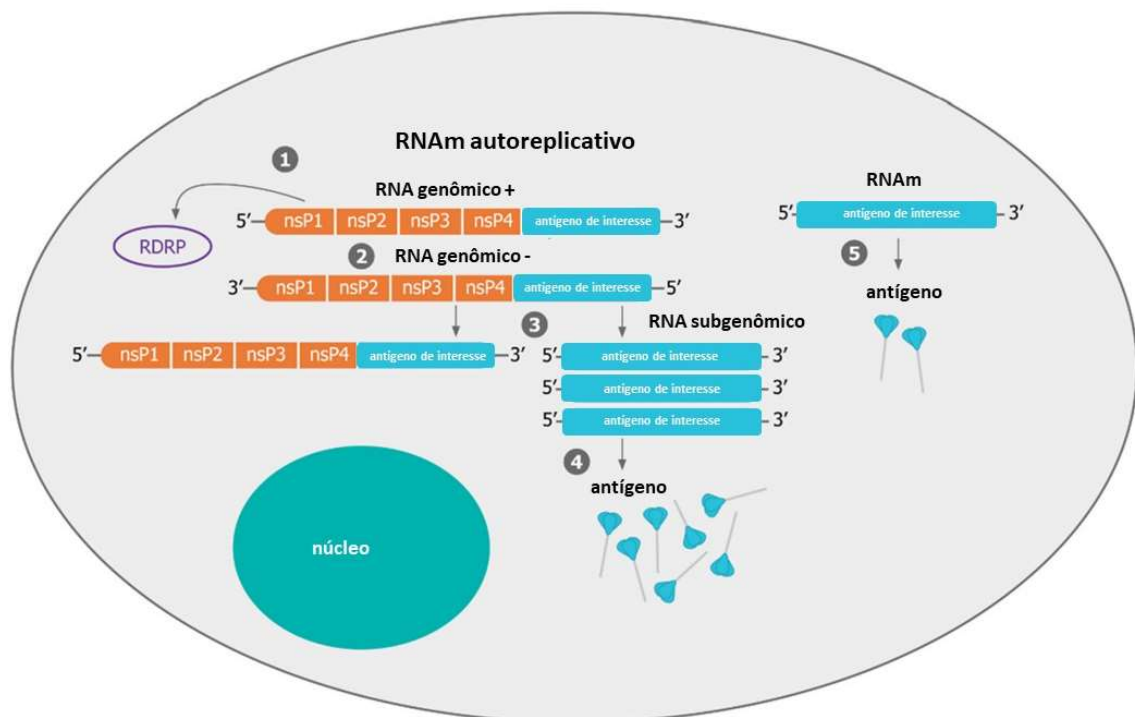


Figura 2. Mecanismo de replicação dos re-RNAm.

(1) Após a entrada no citoplasma, ocorre a tradução do re-RNAm que produz as proteínas não estruturais 1-4 (nsP 1-4) responsáveis pela montagem do complexo RPRD. (2) A RPRD é responsável pela replicação do re-RNAm e a síntese de novas cópias de RNAm. (3) Múltiplas cópias do RNA subgenômico são produzidas a partir de cada fita re-RNAm originalmente entregue. (4) Isso leva a uma produção aumentada do antígeno de interesse (5) quando comparado aos nr-RNAm.

1.3 Histórico e avanços importantes na área de desenvolvimento das vacinas de RNAm

Em 1990, houve a primeira prova de conceito mostrando a entrega de um RNAm e a expressão do antígeno *in vivo*, sugerindo a utilização de moléculas de RNAm como abordagem vacinal (WOLFF et al., 1990). Os problemas com a baixa expressão de antígeno, indução de respostas inflamatórias exacerbadas e estabilidade da molécula foram fatores limitantes dessa tecnologia como uma estratégia para a prevenção e o

tratamento de doenças (KALLEN et al., 2013). Desde então, vários estudos têm explorado estratégias para otimizar os elementos estruturais, síntese e purificação da reação IVT e métodos de entrega, o que permitiu alcançar melhorias significativas na estabilidade, expressão do antígeno, entrega na célula e produção em larga escala das vacinas.

Algumas modificações na sequência dos elementos estruturais podem melhorar a estabilidade e a eficiência de tradução do antígeno, como por exemplo, a composição dos códons (SAHIN; KARIKÓ; TÜRECI, 2014)'. Elementos ricos em AU na região 3'-UTRs são responsáveis pela remoção de caudas poli-A, que permitem uma rápida degradação do RNAm e, conseqüentemente, uma meia-vida curta do RNAm no citoplasma (CAPUT et al., 1986). Alternativamente, as sequências 3'UTR do RNAm, que codificam a proteína β -globina de diversos animais, são compostas de regiões que aumentam a meia vida do RNAm diminuindo sua degradação ao nível citoplasmático (ROSS; SULLIVAN, 1985; YU; RUSSELL, 2001). Além disso, a presença da sequência 5' UTR do vírus do tabaco "*Tobacco etch virus*" é reconhecida pelo fator de iniciação eucariótica 4E (eIF4G) e proporciona complementariedade à subunidade 18S do RNA ribossomal. Esta, por sua vez, medeia a tradução do RNAm por uma via não-canônica independente de cap (GALLIE; TANGUAY; LEATHERS, 1995; MIRAS et al., 2017; NIETFELD; MENTZEL; PIELER, 1990). Além disso, a adição subsequente de análogos de cap na região 5' da fita de RNAm e o comprimento da calda de poli-A, preferencialmente superior a 50 nucleotídeos, é capaz de aumentar ainda mais a expressão da proteína de interesse (KARIKÓ et al., 2008). Essas melhorias, em conjunto, levaram ao desenvolvimento de vetores que produzem moléculas de RNAm mais estáveis, com um aumento significativo da produção da proteína de interesse *in vivo* e por um período mais prolongado (KARIKÓ; KUO; BARNATHAN, 1999; NORBERT PARDI, HIROMI MURAMATSU, 2013; WEISSMAN et al., 2000).

Nesse contexto, pesquisadores da Universidade da Pensilvânia (Filadélfia, EUA) desenvolveram um vetor para produção de nr-RNAm IVT baseada em um plasmídeo pUC que expressa uma sequência não codificadora 5'UTR do "*Tobacco etch virus*" (TEV) associada a uma sequência não codificadora 3'UTR da beta-globina de *Xenopus* (Weissman et al., 2000). Esses elementos não traduzíveis são responsáveis por mediar a tradução da proteína por uma via independente de cap, bem como aumentar a estabilidade do RNAm e expressão do antígeno, respectivamente

(GALLIE; TANGUAY; LEATHERS, 1995; NIETFELD; MENTZEL; PIELER, 1990; SCHLAKE et al., 2012).

A reação de IVT para a produção de nr-RNAm inclui a formação de RNAs curtos produzidos por eventos de iniciação abortivos e contaminantes de dsRNA, um potente padrão molecular associado a patógenos (PAMP) capaz de ativar receptores celulares que levam à inibição da tradução de proteínas (Alexopoulou et al. 2001; Karikó et al. 2011). Duas estratégias importantes de purificação foram desenvolvidas pelos pesquisadores Katalin Karikó e Drew Weissman, para remoção de dsRNA e contaminantes da reação de RNAm IVT. As estratégias se baseiam em métodos cromatográficos, como cromatografia líquida rápida de proteína de fase reversa (FPLC) ou cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) (KARIKÓ et al., 2011) e a purificação por colunas carregadas com celulose (BAIERSDÖRFER et al., 2019a), sendo esta última uma técnica mais simples, rápida e fácil de executar. Destaca-se que a purificação do RNAm demonstrou ser eficiente para a remoção de contaminantes de dsRNA e ainda aumentou a produção da proteína alvo a partir de RNAm IVT em até 1.000 vezes em células dendríticas (DCs) transfectadas *in vitro* (KARIKÓ et al., 2011).

1.4 nr-RNAm e as modificações nucleosídicas

Além dos contaminantes de dsRNA, outro importante fator no desenvolvimento de vacinas baseadas em RNAm é representado pela indução de respostas inflamatórias naturalmente induzida pela molécula. As moléculas de RNA de ocorrência natural são sintetizadas com quatro nucleosídeos básicos (ATP, CTP, GTP e UTP) durante o processo de transcrição. Subsequente ao processo de transcrição, o RNA sofre modificações pós-transcricionais na composição química dos nucleotídeos de forma a evitar o reconhecimento pelos receptores intracelulares como um RNA exógeno (YU et al., 2019). Existem mais de 143 modificações de nucleotídeos de ocorrência natural na natureza (CANTARA et al., 2011) e as mais comuns são apresentadas na **Figura 3**.

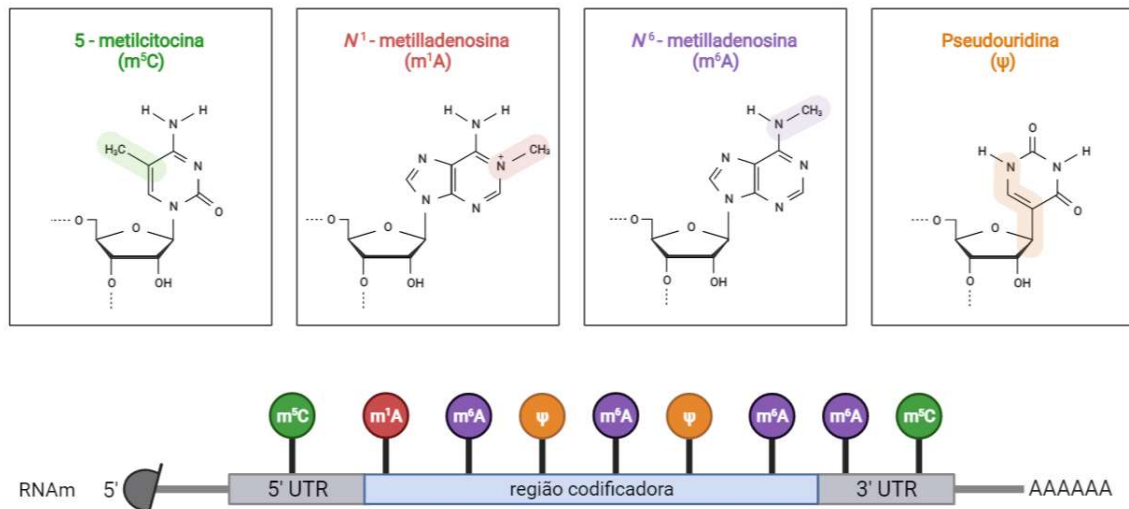


Figura 3. Modificações nucleosídicas mais frequentes observadas em RNAm de eucariotos.

A figura mostra as principais modificações na composição química da estrutura dos nucleosídeos de ocorrência natural nas células de eucariotos. Adaptado de BioRender.com a partir de modelos disponíveis no site.

Uma vez no citoplasma, os RNAm IVT produzidos com os nucleosídeos não modificados, uma vez no citoplasma, podem acionar sensores citosólicos, tais como: receptores Toll-like (TLRs) -3, -7, -8 (TANJI et al., 2015; ZHANG et al., 2016), proteínas de genes induzíveis pelo Ácido Retinóico (RIG-I) e a proteína 5 associada à diferenciação de melanoma (MDA5) (ALEXOPOULOU et al., 2001; KARIKÓ et al., 2004; SEN; SARKAR, 2005), que envia para a célula um sinal de perigo. RIG-I está frequentemente associado à detecção de RNAs exógenos e, eventualmente, pode levar à parada da tradução, à degradação do RNA e à indução de atividades antivirais diretas (KARIKÓ et al., 2004). Esses efeitos são parcialmente mediados pela PKR, que fosforila o fator de iniciação da tradução eucariótica 2α (eIF2α), que, por sua vez, inibe a tradução do RNAm (SAHIN; KARIKÓ; TÜRECI, 2014). Consequentemente, a ativação desses sensores acaba levando a um nível mais baixo de tradução da proteína de interesse e à degradação do RNAm (SAHIN; KARIKÓ; TÜRECI, 2014). Paralelamente, a indução de respostas de IFN do tipo I por meio da ativação dos receptores Toll pode induzir apoptose da célula e, consequentemente, impedir a tradução do antígeno codificado (DE BEUCKELAER; GROOTEN; DE KOKER, 2017; HEIL et al., 2004). Dessa forma, os nucleosídeos modificados podem ser usados na síntese de RNAm por IVT para evitar o reconhecimento de RNAm pelo sistema

imunológico inato e suprimir respostas imunológicas indesejáveis (KARIKÓ et al., 2005).

Karikó e seus colaboradores foram os pioneiros no desenvolvimento da estratégia de sintetizar moléculas de RNAm IVT com propriedades não inflamatórias. Em seus trabalhos, foi demonstrado que a substituição nucleosídica do trifosfato de uridina (UTP) pelo trifosfato de 1-metil-pseudouridina (m¹ΨTP) durante a reação de IVT mostrou-se capaz de impedir a ativação da maioria dos TLRs (KARIKÓ et al., 2005) e o reconhecimento do RNAm IVT pelos sensores RIG-1 e PKR (ANDERSON et al., 2010), resultando no aumento da tradução da proteína por DCs (KARIKÓ et al., 2008). Além disso, essa estratégia foi capaz de induzir fortes respostas imunológicas contra diferentes antígenos alvos em modelo animal, sem desencadear efeitos inflamatórios decorrentes da inoculação do RNAm (ANDERSON et al., 2010; PARDI et al., 2018a, 2018b; RICHNER et al., 2017).

Os RNAm podem ser sintetizados com outros nucleosídeos modificados que não a pseudouridina. No entanto, os trabalhos da Katalin Karikó e colaboradores demonstraram que essa modificação é a principal responsável pela supressão da atividade inflamatória dos RNAm, levando a uma maior capacidade de tradução por DCs e aumento na estabilidade biológica (KARIKÓ et al., 2008). Vale ressaltar que apenas as estratégias baseadas em RNAm convencional (nr-RNAm) são passíveis de serem produzidas com modificação nucleosídica, uma vez que a replicase codificada pelos re-RNAm, não reconhece RNAm modificados e, portanto, não são capazes de replicar RNAm produzidos com nucleosídeos modificados.

Desta forma, a otimização da produção do RNAm IVT com a incorporação de nucleosídeos modificados, somados à purificação da reação de IVT por celulose ou por cromatografia, se tornaram estratégias importantes no que se refere ao desenvolvimento de nr-RNAm como vacinas. Essas descobertas resultaram em três patentes (número: US 9750824, US 10232055 e US 20210292786 inventores Katalin Karikó e Drew Weissman), posteriormente licenciadas para as empresas Moderna e Pfizer-BioNTech e que se mostraram essenciais para o sucesso das vacinas de RNAm contra a COVID-19 em humanos.

Por outro lado, as propriedades imunoestimulatórias dos RNAm não modificados para a indução de repostas de IFN do tipo I podem ser benéficas para a ativação de linfócitos T e para o desenvolvimento de imunidade contra tumores (BROOS et al., 2016). De fato, a imunização com RNAm não modificado, codificando

para diferentes antígenos tumorais e complexado com lipossomas (RNA-LPX), resultou no aumento da resposta de células T de memória em modelo pré-clínicos e clínicos de melanoma (KRANZ et al., 2016). Destaca-se que os efeitos terapêuticos antitumorais observados nesse trabalho foram dependentes da indução da liberação de IFN do tipo I (KRANZ et al., 2016). Além disso, outros trabalhos que utilizam a vacinação com nr-RNA não modificado codificando antígenos associados a tumores, complexado ou não à protamina (denominado RNA *active*), mostraram a indução de células T antígeno-específicas e aumento da resposta de anticorpos, resultando em efeitos antitumorais significativos com aumento de sobrevivência dos animais vacinados (FOTIN-MLECZEK et al., 2011, 2012). De forma geral, os efeitos promissores induzidos por essa estratégia vacina estão relacionados à uma potente ativação de TLR7 e TLR8 (humano), à produção de IFN do tipo I e secreção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, que desencadeiam efeitos adjuvantes e antitumorais (EDWARDS et al., 2017). De forma relevante, essa mesma vacina demonstrou alta imunogenicidade e efeitos antitumorais em pacientes com câncer de próstata (KÜBLER et al., 2011), câncer de pulmão de células não pequenas (SEBASTIAN et al., 2019), carcinoma de células renais (RITTIG et al., 2011) e melanoma (WEIDE et al., 2009), sendo essa a estratégia de nr-RNA não modificada mais avançada em estudos clínicos para tratamento de câncer.

O desencadeamento da ativação de IFNs do tipo I pelos RNA é ambígua. A produção de IFNs do tipo I influencia vários aspectos da função das DCs, incluindo a apresentação do antígeno, a expressão de moléculas coestimulatórias e a secreção de citocinas (BEUCKELAER; GROOTEN; KOKER, 2017). Em contrapartida, a ativação dessa via pode ter um efeito adjuvante na ativação de resposta celular mediada por células T – benéficas no contexto de imunidade contra tumores. Recentemente foi descrito que a cinética relativa à apresentação de antígeno *versus* a secreção de IFN tipo I determina o destino da ativação de linfócitos (BEUCKELAER; GROOTEN; KOKER, 2017). Se a ativação das vias de IFN do tipo I ocorre antes do contato do TCR do linfócito T com a molécula de MHC da célula apresentadora de antígeno, há uma ativação de STAT1, que induz um processo anti-proliferativo e pró-apoptótico (Bromberg, Horvath, Wen, Schreiber, & Darnell, 1996; Gimeno, Lee, Schindler, & Levy, 2005). Por outro lado, se a apresentação do antígeno precede a ativação dos receptores de interferons, há uma regulação positiva da ativação de STAT4, que resulta em um sinal de proliferação e anti-apoptótico em células T CD8⁺

(CURTSINGER et al., 2005). Dessa forma, uma vacina de RNAm ideal para o tratamento de câncer deve permitir a expressão e apresentação do antígeno por DCs para os linfócitos T, com indução mínima de IFNs do tipo I, a fim de iniciar respostas de citotóxicas e prevenir a indução de uma resposta inflamatória contra o RNAm.

1.5 Nanopartículas lipídicas como métodos de entrega

Uma das principais questões relacionadas à aplicação de vacinas de RNAm é o desenvolvimento de métodos de entrega *in vivo* eficientes, não tóxicos e passíveis de aplicação clínica. Embora a inoculação direta de RNAm permita a transfecção *in vivo*, a molécula está sujeita à degradação extracelular por ribonucleases e não induz ativação eficiente da resposta imunológica (AJBANI et al., 2015; SELMI et al., 2016; WOLFF et al., 1990). A eletroporação *in vivo* também tem sido utilizada como método de transfecção de RNAm (CU et al., 2013; HUYSMANS et al., 2019). Entretanto é uma técnica que funciona apenas para re-RNAm e não de uma vacina baseada em nr-RNAm (dados não mostrados).

Estudos recentes mostraram que as nanopartículas lipídicas (LNPs) são excelentes carreadores para entrega de RNAm *in vivo* e adequadas para aplicações pré-clínicas e clínicas devido ao perfil de segurança e capacidade de induzir resposta imunológica potente contra vários patógenos, como SARS-Cov-2, HIV, Zika e vírus influenza (BOGERS et al., 2015; FREYN et al., 2020; GEALL et al., 2012; HOU et al., 2021; MAIER et al., 2013; PARDI et al., 2015, 2017). As LNPs são compostas por um lipídio catiônico ionizável, responsável pela automontagem das partículas; polietilenoglicol ligado a lipídios (PEG), para aumentar a meia-vida das formulações; colesterol, como estabilizante; e fosfolipídios de ocorrência natural, que fornecem suporte à estrutura da bicamada lipídica (HAJJ; WHITEHEAD, 2017; HOU et al., 2021; KOWALSKI et al., 2019). Os lipídios ionizáveis são importantes componentes dessas formulações porque não apresentam cargas em pH fisiológico, o que diminui a toxicidade das LNPs. Por outro lado, uma vez endocitados, esses lipídios tornam-se ionizados no pH ácido, o que permite a liberação do RNAm para o citoplasma (HAJJ; WHITEHEAD, 2017; KOWALSKI et al., 2019). Além disso, essas vesículas permitem uma maior estabilidade da molécula de RNAm e confere proteção contra a degradação por ribonucleases presentes nos tecidos (GEALL et al., 2012).

A magnitude e a duração da produção de proteína *in vivo* pelos RNAm formulados em LNP (RNAm-LNP) podem ser controladas em função das vias de

administração *in vivo* (intradérmica, intramuscular, subcutânea ou intravenosa) (PARDI et al., 2015). No geral, as vias de imunização intramuscular (i.m.) e intradérmica (i.d.) de RNAm-LNPs levam à expressão proteica prolongada e localizada, ao contrário das vias que levam à liberação sistêmica (PARDI et al., 2015). O uso de LNPs no encapsulamento de re-RNAm demonstrou ser capaz de evitar a degradação por ribonucleases e aumentar a expressão antigênica, mesmo com o uso de uma dose 10 vezes menor em relação ao RNAm não encapsulado (BRITO et al., 2014a; GEALL; MANDL; ULMER, 2013). Além disso, para o controle de doenças infecciosas, essa plataforma conseguiu induzir imunidade específica contra os antígenos vacinais avaliados, por meio da produção de títulos de anticorpos similares aos induzidos por vetor viral ou de DNA associado à eletroporação (GEALL et al., 2012). Estudos subsequentes confirmaram a eficácia das formulações de RNAm-LNP em modelos pré-clínicos contra a Influenza aviária e HIV, em animais de pequeno, médio e grande porte (AJBANI et al., 2015; BOGERS et al., 2015; BRITO et al., 2014a; HEKELE et al., 2013)

As LNPs podem sofrer modificação na composição da sua estrutura, de forma a incluir lipídios com propriedades adjuvantes, como lipídios cíclicos que ativam vias intracelulares do tipo estimuladores de genes de interferon (STING do inglês “*stimulator of interferon genes*”) (MIAO et al., 2019; TSE et al., 2021). Essas LNPs, quando associadas a vacinas de RNAm codificando antígenos vacinais, aumentam os efeitos antitumorais e as respostas imunológicas celulares em diferentes modelos pré-clínicos (MIAO et al., 2019; TSE et al., 2021). Outros estudos tiveram como foco o desenvolvimento de lipossomas capazes de promover o direcionamento para órgãos específicos. Por exemplo, a modificação na composição lipídica do lipossoma carregando uma vacina de RNAm que codifica antígenos de tumores (RNA-LPX), foi capaz de levar ao direcionamento seletivo do complexo aos órgãos linfoides, com a transfecção preferencial de DCs e ativação de fortes respostas de linfócitos T, seja em modelo animal ou com DCs humanas (KRANZ et al., 2016). Mecanismos capazes de direcionar o RNAm incorporado a lipossomas para DCs permitem transfecção mais eficiente dessas células, as quais são essenciais para a apresentação de antígenos e para o início da montagem da resposta imunológica contra tumores (MCCULLOUGH et al., 2014).

A primeira LNP aprovada pelo FDA (do inglês “*United States Food and Drug Administration*”) para uso em humanos ocorreu em 1995, e envolveu seu uso como

carreador das drogas doxorubicina e anfotericina B (AKINC et al., 2019). Posteriormente, em 2018, ocorreu a primeira aprovação do FDA de pequenos RNA de interferência (siRNA) para uso em humanos, entregues por LNPs (AKINC et al., 2019; YONEZAWA; KOIDE; ASAI, 2020). Esses avanços na área de biomateriais foram essenciais para viabilizar os testes clínicos e levar à aprovação das vacinas de RNAm para uso em humanos.

1.6 O HPV e o câncer

A relação entre o papilomavirus humano (HPV) e o câncer está bem estabelecida, totalizando um terço dos casos de tumores associados a agentes infecciosos (DE MARTEL et al., 2020). Cerca de 99,8% dos casos de câncer cervical são associados a infecções persistente por HPV de alto risco e representam a quarta causa de câncer e morte entre mulheres (BURD, 2003; SCHIFFMAN et al., 2007). Além disso, o HPV está envolvido com o surgimento de outras neoplasias em homens e mulheres, incluindo tumores de vulva, vagina, ânus, pênis e carcinoma de cabeça e pescoço (PIROG et al., 2014). Entre os subtipos virais com potencial oncogênico, os mais frequentes são os subtipos virais de HPV-16 e -18, responsáveis por cerca de 70% dos casos de câncer cervical (HAUSEN HZ., 1996).

Com a intenção de evitar futuras infecções pelos vírus e prevenir o câncer em longo prazo, foram desenvolvidas vacinas preventivas contra o HPV (nome comercial Gardasil e Cervarix) baseadas em VLPs (do inglês "*virus like particles*") (KEAM; HARPER, 2008; SHI et al., 2007). Embora as vacinas profiláticas sejam capazes de desencadear a produção de anticorpos contra as partículas virais e promover elevada proteção contra os tipos de HPV cobertos pelas vacinas, elas não são amplamente distribuídas e, portanto, muitas pessoas permanecem em risco iminente de desenvolver tumores associados ao HPV (WIGLE; COAST; WATSON-JONES, 2013). O tratamento utilizado para o câncer cervical é invasivo, envolve cirurgias, radioterapias, quimioterapias ou uma combinação destes (FAKHR; MODIC; CID-ARREGUI, 2021; HILL, 2020). Além da morbidade iatrogênica, esses tratamentos são dispendiosos, traumáticos e não agem especificamente sobre as células tumorais. Adicionalmente, muitos pacientes desenvolvem resistência às drogas que pode levar a diminuição das taxas de sobrevivência global (GADDUCCI et al., 2010; TSENG et al., 2010). Portanto, é desejável o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas contra tumores induzidos por HPV.

Os carcinomas epiteliais cervicais e suas lesões precursoras são resultantes de alterações genéticas causadas pela integração genômica e subsequente expressão aumentada de duas oncoproteínas virais: E6 e E7 (SYRJÄNEN; SYRJÄNEN, 1999). Quando ocorre a integração do DNA viral ao genoma do hospedeiro, a maioria dos genes do HPV é perdida, que abrange os genes de regulação da expressão de proteínas virais (HAUSEN, 1996). Com isso, todas as células transformadas passam a expressar de forma constitutiva as oncoproteínas E6 e E7, que interferem no ciclo celular por meio da degradação de p53 e interação com retinoblastoma (pRb), respectivamente (SYRJÄNEN; SYRJÄNEN, 1999). A p53 é um fator de transcrição envolvido na apoptose e parada do ciclo celular (WERNESSE; LEVINE; HOWLEY, 1990). A proteína pRb ativa genes envolvidos na síntese de DNA e progressão do ciclo celular (DYSON, 1998). As modificações resultantes da ação dessas proteínas, induzem a malignização da célula e manutenção desse estado (WOODMAN; COLLINS; YOUNG, 2007). Em função da sua importância e da expressão constitutiva dessas oncoproteínas, a E6 e E7 são excelentes alvos para terapias de tumores associados ao HPV.

1.7 Desenvolvimento de vacinas terapêuticas para tratamento de tumores induzidos por HPV

As proteínas E6 e E7, apesar de estarem presentes nas células tumorais, não estimulam naturalmente uma resposta imunológica citotóxica. Isso acontece por serem expressas em um contexto de diversos mecanismos de escape imunológico que desencadeiam um quadro de tolerância antigênica (TINDLE, 2002). Estratégias terapêuticas capazes de reestabelecer a antigenicidade dessas proteínas são necessárias na terapia contra o câncer. Tais vacinas devem ser voltadas para aumentar a ativação de células T capazes de reconhecer especificamente e matar as células transformadas pelo vírus.

Estudos recentes descreveram a aplicação bem sucedida de vacinas baseadas em RNAm no tratamento de tumores associados ao HPV em condições pré-clínicas (GRUNWITZ et al., 2019; TSE et al., 2021). Em particular, vacinas de RNAm que codificam E7 associadas a diferentes métodos de entrega resultaram em forte indução de resposta de células T específicas e aumento dos efeitos antitumorais contra câncer induzido por HPV usando modelo pré-clínico baseado em camundongos transplantados com células TC-1 pela via subcutânea (GRUNWITZ et al., 2019;

KRANZ et al., 2016; MIAO et al., 2019). Além dos antígenos tumorais, as vacinas de RNAm podem ser projetadas para codificar ligantes de moléculas coestimuladoras (BIALKOWSKI et al., 2016; VAN LINT et al., 2012), adjuvantes (TSE et al., 2021) ou citocinas com potencial antitumoral (LI et al., 2020). Essas estratégias promovem a maturação das DCs, aumentam as respostas de linfócitos T CD8⁺ antígeno-específicas e melhoraram os efeitos imunológicos antitumorais em estudos pré-clínicos (BIALKOWSKI et al., 2016; TSE et al., 2021; VAN LINT et al., 2012). Uma vacina baseada em nr-RNAm que codifica um agonista de CD40 está em andamento em ensaio clínico fase 1/2 (NCT03418480) contra o carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço induzido por HPV-18.

1.8 gDE7 como antígeno vacinal

Nosso grupo de pesquisa tem consolidado estratégias vacinais terapêuticas contra tumores induzidos por HPV, sendo uma baseada em DNA (pgDE7h) (DINIZ et al., 2010, 2013; LASARO et al., 2005) e outra em proteína recombinante purificada (gDE7) (PORCHIA et al., 2011, 2017). Ambas expressam proteínas híbridas, resultado da fusão da glicoproteína D (gD) do HSV-1 e a oncoproteína E7 do HPV-16. A proteína gD confere um efeito adjuvante ao antígeno E7, uma vez que se liga ao Mediador de Entrada do Vírus Herpes (HVEM) e concorre com o mesmo sítio de ligação do BTLA (Atenuador de Linfócitos B e T) que, por sua vez, evita os sinais inibitórios da ativação de células B e T desencadeados por esta interação (CHEUNG et al., 2009; COMPAAN et al., 2005; STILES et al., 2010). Portanto, a gD pode atuar como uma molécula inibidora de *checkpoint*, aumentando o número de linfócitos T ativados contra as oncoproteínas fusionadas à gD.

As duas abordagens de vacinas baseadas no antígeno vacinal gDE7 foram capazes de demonstrar o efeito adjuvante da proteína gD em induzir linfócitos T CD8⁺ citotóxicos e conferir proteção terapêutica parcial quando testados no modelo de implante subcutâneo de células TC-1 (DINIZ et al., 2010; LASARO et al., 2005; PORCHIA et al., 2011). Quando essas estratégias foram combinadas a outros adjuvantes (por exemplo, poly I:C), eletroporação, citocinas (como IL-12 e GM-CSF) quimioterápicos, imunometabólicos, ou bloqueadores da imunossupressão, a vacina foi capaz de reverter totalmente o crescimento de tumores em camundongos, resultando em estratégias vacinais mais potentes que outras já descritas na literatura no mesmo modelo pré-clínico de tumores (DINIZ et al., 2013, 2016; MORENO et al.,

2018; PORCHIA et al., 2017; RAMOS DA SILVA et al., 2021; SALES et al., 2017; SILVA et al., 2019). Nosso grupo também demonstrou que a ativação eficaz de DCs é crucial na terapia contra tumores (APS et al., 2015; PORCHIA et al., 2017). No entanto, vacinas de DNA tem pouca aceitação na indústria, pelas preocupações com a segurança e a baixa imunogenicidade em ensaios clínicos. Atualmente, essa técnica necessita de métodos de transfecção complexos, como a eletroporação, que apresenta desafios técnicos para vacinação em massa.

Diante da potencialidade do antígeno vacinal desenvolvido pelo nosso grupo, e da necessidade de viabilizar abordagens terapêuticas para uso em humanos, a presente tese de doutorado buscou expandir os estudos com o antígeno vacinal gDE7, a partir de três vacinas de RNAm diferentes: (i) re-RNAm, (ii) nr-RNAm não modificado (UTP) e (iii) nr-RNAm com modificação nucleosídica (m¹Ψ). Todas elas foram formuladas em LNP e estão voltadas para o tratamento de tumores associados ao HPV-16. Coletivamente, este estudo fornece análises comparativas detalhadas da resposta imunológica e da eficácia terapêutica induzida e pelas três vacinas de RNAm-LNP baseadas em gDE7. Em suma, os resultados deste trabalho demonstram uma estratégia terapêutica de alta relevância e com potencial para o desenvolvimento de terapias mais seguras e eficientes no controle de lesões e câncer induzidos por HPV em condições clínicas.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver uma nova vacina terapêutica, voltada para o controle de tumores induzidos pelo HPV-16 em modelo pré-clínico, a partir de três abordagens vacinais baseadas em RNAm não replicativo (convencional ou por incorporação nucleosídeos modificados) e autorreplicante. As vacinas foram incorporadas em nanopartículas lipídicas (LNPs) codificando o mesmo antígeno vacinal: a proteína quimérica gDE7. Dentre as etapas experimentais específicas realizadas para conclusão deste trabalho estão:

2.2 Objetivos específicos

- Construir, produzir e purificar as vacinas baseadas em RNAm-LNP codificando o antígeno gDE7 e avaliar a expressão do antígeno *in vitro* e *in vivo*.
- Avaliar a proteção terapêutica induzida pelas três estratégias vacinais baseadas na plataforma de RNAm-LNP frente ao modelo terapêutico de desafio tumoral com células TC-1 no modelo subcutâneo (s.c.).
- Investigar os mecanismos de resposta celular envolvidos na proteção antitumoral induzida pela imunização e, em particular, caracterizar a resposta de células T de memória no modelo de tumores induzidos por HPV-16.
- Analisar o efeito antitumoral terapêutico das vacinas baseadas em RNAm-LNP no controle de tumores que expressam antígenos de HPV-16 a partir de modelos ortotópicos com implante de tumores em mucosa intravaginal e sublingual.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais de experimentação

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 com idade entre 6 a 8 semanas de idade adquiridos do Biotério Central da Faculdade de Medicina (Universidade de São Paulo - Brasil) ou do Laboratório Jackson (Estados Unidos). Camundongos fêmeas C57BL/6 deficientes em CD8 (do inglês *knockout* -KO) e ou deficientes em CD4 foram fornecidos pelo Centro de Criação de Animais do Departamento de Imunologia da Universidade de São Paulo. Os camundongos foram manuseados de acordo com as políticas locais, estaduais e federais para o uso de animais em pesquisas. Os procedimentos experimentais e de eutanásia foram realizados de acordo com as diretrizes estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) e conduzidos sob os protocolos aprovados pelos Comitês Institucionais de Cuidado e Uso de Animais (IACUC) da Universidade da Pensilvânia e do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de São Paulo.

3.2 Linhagens celulares

3.2.1 TC-1

A linhagem celular tumoral TC-1 foi derivada de células do epitélio pulmonar primário de camundongos C57BL/6, transformados com genes que codificam c-Ha-ras e HPV-16 E6 e E7 (LIN et al., 1996). A variante TC-1-luc foi obtida após a transdução de células TC-1 por lentivírus que codifica a luciferase (Luc) do vagalume (KIM; HUNG; WU, 2007). Ambas as células, (gentilmente cedida pelo Dr. T.C. Wu, Universidade Johns Hopkins, EUA) foram cultivadas em meio RPMI (Gibco) suplementado com 50 U/ml de penicilina/estreptomicina, 0,4 mg/ml de G418 e 10% de soro fetal bovino (SFB) a 37 °C e 5% de CO₂. As células foram rotineiramente testadas quanto à presença de micoplasma por PCR. No dia do transplante tumoral, as células foram tratadas com Tripsina-EDTA e suspensas em RPMI sem soro em concentrações apropriadas de uso, em um volume de 100 µL por animal.

3.2.2 HEK 293-T

As células HEK 293-T foram cultivadas em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) com suplemento de alta concentração de glicose e com 10% de SFB e 50 U/ml de penicilina/estreptomicina.

3.2.3 Células dendríticas derivadas de monócitos (*mo-DC*)

As células humanas primárias foram isoladas de amostras de sangue periférico obtidas de voluntários saudáveis após o procedimento de leucoafereze. Os estudos foram conduzidos sob os protocolos aprovados pelo IACUC da Universidade da Pensilvânia (Estados Unidos). As células dendríticas derivadas de monócitos (*mo-DC*) humanos foram geradas a partir dos monócitos humanos primários cultivados em RPMI 1640, contendo 10% de SBF, 50 U/ml de penicilina/estreptomicina e diferenciadas por 7 dias, a partir da suplementação com o fator estimulador de colônia de macrófago e granulócito humano recombinante (GM-CSF - 50 ng / ml) e a citocina IL-4 (100 ng / ml) a cada 3 dias.

3.3 Plasmídeos

Os plasmídeos T7-pUC-TEV-A101 (cedido pelo prof. Norberti Pardi, Universidade da Pensilvânia, EUA), SP6-VEE-IRES-Puro (Addgene) e T7-SFV-OPaL1-A50 (cedido pelo prof. Tim Beissert, Universidade Johannes Gutenberg, Mainz, GER) foram utilizados para clonagem do gene de interesse e posteriormente como molde para a IVT do RNAm. Para isso, utilizamos a sequência otimizada do gene que codifica a proteína E7 de HPV-16 fusionada geneticamente à gD de HSV-1, presente no plasmídeo pUMVC3-gDE7h (DINIZ et al., 2013), para produzir o gene sintético de interesse e realizar a clonagem nos plasmídeos de interesse.

3.4 Vacinas baseadas em RNAm

As vacinas foram desenvolvidas com base em três diferentes plataformas de RNAm, cada uma codificando a proteína híbrida gDE7 (formada pela fusão genética da proteína E7 do HPV-16 com a gD do HSV-1), ou o gene Luc. Para este fim, usamos o nr-RNAm contendo uridina 5'-trifosfato (UTP) ou 1-metilpseudouridina-5'-trifosfato (m1ΨTP-TriLink, aqui chamado de m1Ψ) para produzir o RNAm não replicativo contendo nucleosídeo não modificado e modificado, respectivamente. Além disso, também utilizamos as formulações baseadas de RNAm replicativo (re-RNAm) codificando o mesmo antígeno alvo.

3.5 Produção das vacinas de RNAm IVT

O plasmídeo T7-pUC-TEV-A101 foi utilizado para a transcrição *in vitro* do nr-RNAm, enquanto que as vacinas re-RNAm foram transcritas usando o vetor SP6-VEE-IRES-Puro ou T7-SFV-OPaL1-A50, que contém 5' e 3' UTRs e regiões de caudas poli-A otimizadas para tradução da proteína de interesse. O RNAm foi transcrito utilizando o kit T7 RNA polimerase (Megascript, Ambion) e o plasmídeo linearizado como molde. Os transcritos foram sintetizados com m¹ΨTP ou UTP para produzir os RNAm modificado por incorporação nucleosídica ou o RNAm não modificado, respectivamente. Os RNAm foram purificados por adsorção em colunas carregadas com celulose (Sigma-Aldrich # 11363-250G) para remover contaminantes de RNA de fita dupla, conforme descrito anteriormente (BAIERSDÖRFER et al., 2019a). Em seguida, foram adicionados o Cap1 na região 5' do RNAm usando o kit de Cap1 m7G e 2'-O-metiltransferase (ScriptCap, CellScript) para obtenção da RNAm final (PARDI et al., 2013). Todos os RNAm foram analisados por eletroforese em gel de agarose e foram armazenados em freezer a -20 °C.

3.6 Formulação dos RNAm em nanopartículas lipídicas (LNPs)

As LNPs são compostas por lipídio catiônico ionizável, fosfatidilcolina, colesterol e polietilenoglicol-lipídio, de acordo a preparação previamente descritas (JAYARAMAN et al., 2012; MAIER et al., 2013). Os RNAm foram encapsulados usando um processo de automontagem no qual uma solução aquosa de RNAm, em pH ácido, foi misturada com a solução lipídica dissolvida em etanol (MAIER et al., 2013). As partículas carregadas com RNAm foram caracterizadas por tamanho, carga e potencial zeta e, subsequentemente, armazenadas a -80 °C. Todo o processo de encapsulamento foi realizado pela empresa Acuitas, colaboradora do projeto.

3.7 Transfecção *in vitro*

A transfecção de células HEK 293-T ou mo-DC humanas foi realizada usando TransIT-mRNA (Mirus Bio), de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, os Luc- ou gDE7 RNAm (0,1 µg) foram combinados com TransIT-mRNA Reagent e Boost Reagent em meio sem soro e os complexos adicionados a 5×10^4 células em DMEM completo (HEK 293-T) ou meio RPMI 1640 (mo-DC). Os experimentos de luminescência *in vitro* foram realizados com células lisadas em tampão específico de lise para luciferase (Promega) em diferentes tempos pós-

transfecção. As alíquotas foram testadas quanto à atividade enzimática usando o sistema de ensaio da luciferase (Promega) e a luminescência foi medida por um luminômetro MiniLumat LB 9506 (Berthold/EG & G; Wallac). Alternativamente, as células transfectadas com RNAm codificando para a gDE7 ou Luc foram lisadas por 30 min em gelo em tampão de ensaio de rádio imunoprecipitação (RIPA) (Sigma) e coletadas para análises de *Western blot* 24 h após a transfecção.

3.8 Western blot

Os lisados de células transfectadas com RNAm codificando para gDE7 foram testados quanto à presença da proteína gDE7. As amostras foram misturadas com tampão Laemmli 4X (Bio-Rad), incubadas a 95 °C por 10 min e, em seguida, submetidas a corrida eletroforética em gel de poliacrilamida de SDS-PAGE (do inglês *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) de gradiente de concentração de poliacrilamida (4% a 15%) usando um dispositivo Mini-Protean TGX (Bio-Rad) por 1 h a 120 V. A transferência para membranas de nitrocelulose, previamente ativada, foi realizada utilizando uma unidade de transferência semi-seca (Ellard Instrumentation) à 10 V por 1 h. A membrana foi bloqueada com 5% de leite em pó desnatado em tampão de solução salina tamponada com Tris (TBS) contendo 0,1% de Tween-20. Em seguida, a membrana foi incubada com o mAB 1D3 anti-gD de camundongo (diluição de 1:10.000) ou com o mAB anti-GAPDH produzido em coelho (clone 14C10, 1:5.000) por 14 h a 4 °C. A seguir, as membranas foram incubadas com anti-IgG de camundongo produzido em cabra conjugado a peroxidase (IgG-HRP Sigma, diluição de 1: 5.000) durante 1 h à temperatura ambiente. Todos os anticorpos foram diluídos em leite em pó desnatado a 5% em TBS-T. A membrana foi revelada usando o reagente de detecção Amersham ECL Western Blotting e um sistema Amersham Imager 600 (ambos da GE Healthcare).

3.9 Detecção de bioluminescência *in vivo*

Os camundongos inoculados com Luc RNAm-LNP (3 µg / camundongo) para os ensaios de expressão de Luc *in vivo*, bem como camundongos transplantados com as células TC-1 Luc para os experimentos de modelo de implante de tumor de mucosa, foram avaliados quanto a emissão de bioluminescência *in vivo*. Para isso, os animais foram inoculados intraperitonealmente (i.p.) com 200 µl de D-luciferina (Regis Technologies) a uma concentração de 150 mg/kg, e a bioluminescência foi avaliada

usando o sistema de imagem IVIS Spectrum (Caliper Life Sciences). Os camundongos foram anestesiados em câmara de anestesia ventilada com 3% de isoflurano em oxigênio, e as imagens foram adquiridas 5 min após a injeção de D-luciferina. A bioluminescência foi quantificada na região de interesse para obter os valores de fluxo total expressos em fótons por segundo (f/s) usando o software Living IMAGE (Caliper Life Sciences).

3.10 Implantação do tumor

3.10.1 Modelo de tumor subcutâneo

Os camundongos foram transplantados com 1×10^5 células TC-1 diluídas em 100 μ l de solução de PBS por injeção subcutânea (s.c.) na região dorso-lateral direita. O crescimento do tumor foi monitorado 2-3 vezes e mensurados com auxílio de um paquímetro. Os diâmetros menor (d) e maior (D) dos tumores foram medidos e as áreas tumorais foram calculadas de acordo com a fórmula $D \times d$. A sobrevivência foi registrada por pelo menos 70 dias. Os camundongos foram sacrificados quando o tamanho do tumor atingiu 15 mm de diâmetro ou se tornou necrótico.

3.10.2 Redesafio com as células tumorais

Para os experimentos de proteção contra recidivas, os camundongos receberam uma segunda inoculação de células tumorais com uma concentração de células TC-1 10 vezes maior (1×10^6 células por camundongo), 90 dias após o primeiro desafio tumoral. Para os ensaios de análise de infiltrado intratumoral, as células TC-1 foram previamente diluídas em uma matriz extracelular (Matrigel - BD) antes da inoculação nos animais, seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, as células TC-1, na concentração de 1×10^6 células por camundongo, foram ressuspensas em 100 μ l de PBS, misturadas com 100 μ l de Matrigel a 4 °C e inoculadas por via s.c nos animais.

3.10.3 Modelo de tumores ortotópicos

Modelo intravaginal. Camundongos fêmeas foram inicialmente tratadas com inoculação por via s.c. de acetato de medroxiprogesterona (nome comercial DepoProvera - 3 mg por camundongo) para sincronização do ciclo estral. Quatro dias depois, 1×10^5 células TC-1-luc por camundongo foram inoculadas na submucosa da parede lateral da vagina do animal usando 20 μ l de suspensão de células em PBS.

Modelo sublingual. As células TC-1-luc, em uma concentração de 5×10^4 células por camundongo diluídas em 10 μ l de PBS, foram transplantadas na região da

submucosa da língua. Apenas para fins didáticos, chamamos aqui de sublingual a inoculação das células na língua do animal, o que não se refere à inoculação das células abaixo da língua.

Em ambos os modelos, a implantação de células tumorais foi confirmada com um sistema de imagem IVIS Spectrum (Caliper Life Sciences) 3 dias após o transplante das células tumorais. Os animais foram monitorados quanto à emissão de bioluminescência uma vez por semana. Os camundongos foram sacrificados quando o fluxo total atingiu entre 10^9 - 10^{10} f/s ou quando os animais perderam mais de 20% do peso corporal, de acordo com os regulamentos de cuidados com os animais.

3.11 Protocolo de imunização

Os ensaios de imunização foram iniciados no mínimo 3 dias após o implante das células tumorais. Os camundongos foram imunizados com uma única dose das diferentes vacinas baseadas em RNAm-LNPs que codificam gDE7 (30 μ g ou 5 μ g) diluídas em um total de 80 μ l de PBS e inoculados por via intramuscular (i.m.) no músculo tibial anterior em um volume de 40 μ l por pata. Camundongos do grupo controle foram inoculados com a formulação Luc m1 Ψ nr-RNAm-LNP na mesma dose. Alternativamente, camundongos portadores de tumor foram imunizados com quantidades decrescentes das diferentes formulações de RNAm-LNPs para avaliar a dose mais baixa capaz de induzir respostas antitumorais. As imunizações foram iniciadas quando o tamanho médio do tumor atingiu aproximadamente 12 mm², geralmente no dia 12 após o transplante das células tumorais. Para os modelos de tumor ortotópico, os camundongos receberam as imunizações três dias após a inoculação do tumor, quando a bioluminescência atingiu aproximadamente 10^6 ou 10^7 f/s no modelo de tumor intravaginal e sublingual, respectivamente.

3.12 Citometria de fluxo

3.12.1 Preparação de amostras para citometria de fluxo

Sangue e baço. Suspensões de células únicas de sangue e baço foram preparadas de acordo com protocolos padrão previamente descritos. Resumidamente, as células foram tratadas com tampão de ACK para lise das hemácias, centrifugadas a 600 g por 5 min e lavadas com meio RPMI suplementado com 5% de SFB. Em seguida, as células foram diluídas em meio RPMI completo e mantidas a 4 °C até o momento de uso.

Tumor. As amostras de tumor foram excisadas 6 dias após o transplante das células tumorais imersas em matrigel. As amostras foram então cortadas em pequenos pedaços e incubadas em PBS contendo 1 mg/ml de colagenase D (Roche) e 50 µg/ml de DNase I (Roche), e incubadas por 40 min a 37 °C. A reação da colagenase foi interrompida após a adição de solução de EDTA 5 mM, e as suspensões de células foram filtradas em filtros de 70 µm e 40 µm (BD) respectivamente, seguidas de lavagens com RPMI 10% de SFB. As células foram centrifugadas a 600 g durante 15 min e diluídas em PBS contendo 2% de SFB, e mantidas a 4 °C até o momento da marcação.

3.12.2 Ensaio de linfócitos T citotóxicos *in vivo*

Suspensões de esplenócitos de camundongos não imunizados (do inglês *naive*) foram divididas em duas alíquotas iguais e marcadas com éster succinimidil de diacetato de carboxifluoresceína (CFSE; Invitrogen #C34554) em concentrações finais de 7 µM (CFSE^{high}) ou 0,7 µM (CFSE^{low}). As células CFSE^{high} foram pulsadas com 2,5 µg/mL do peptídeo T CD8⁺ E7 específico ₄₉RAHYNIVTF₅₇, GenScript, #RP20249) em meio RPMI suplementado com 10% de SFB a 37 °C por 40 min. Números iguais de células pulsadas (CFSE^{high}) e não pulsadas (CFSE^{low}) foram inoculados pela via intravenosa em um total de 2 x 10⁷ células por camundongo, em animais previamente imunizados com 30 µg de gDE7 ou Luc m1Ψ nr-RNAm-LNP 14 dias antes. Dezoito horas após a inoculação, os baços dos animais imunizados foram removidos e os esplenócitos analisados, após marcação com CFSE, por citometria de fluxo usando citômetro de fluxo LSR II ou Fortessa (BD Biosciences, CA, EUA). Os números de células CFSE^{high} e CFSE^{low} foram usados para calcular a porcentagem de morte de células alvo pulsadas com o peptídeo, determinado pelo uso da fórmula: $[1 - (\% \text{ CFSE}^{\text{high}} \text{ imunizado} / \% \text{ CFSE}^{\text{low}} \text{ imunizado}) / (\% \text{ CFSE}^{\text{high}} \text{ controle} / \% \text{ CFSE}^{\text{low}} \text{ controle})] \times 100$.

3.12.3 Determinação de células T CD8⁺ produtoras de citocinas

Suspensões de células de sangue periférico ou baço, a uma concentração de 3 x 10⁶ células/poço, foram estimuladas na presença de 5 µg/ml de peptídeo T CD8⁺ E7 específico (₄₉RAHYNIVTF₅₇, GeneScript, #RP20249) e 1 µg/ml de anticorpo monoclonal (mAb) anti-CD28 (BD Biosciences, CA, USA # 553295) em uma placa de fundo em U a 37 °C, 5% de CO₂ por 1 h seguido pela adição de 5 µg/ml de brefeldina

A (GolgiPlug; BD Biosciences, CA, EUA, #555029) e 2 µg/ml de monensina (GolgiStop; BD Biosciences, CA, EUA, #554724) por um mínimo de 5 h. Amostras não estimuladas para cada animal e amostras incubadas com forbol 12-miristato-13-acetato (PMA; 10 ng/ml) e ionomicina (200 ng/ml; Sigma) foram incluídas como controles negativos e positivos, respectivamente. As células foram lavadas com PBS e coradas com o kit Live/Dead Aqua (Dead Cell Stain, Thermo Fisher) seguido do bloqueio do receptor Fc anti-CD16/32 (BD Biosciences, CA, EUA, # 553142) durante 30 min a 4 °C. As superfícies das células foram marcadas com o mAb anti-CD8 Pacific Blue (clone 53-6.7; BioLegend, #100725) durante 30 min a 4 °C. Após a marcação extracelular, as células foram lavadas com tampão FACS (PBS com 2% de FBS), fixadas e permeabilizadas usando o kit Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences, # 554714) e marcadas intracelularmente com os mAbs anti-CD3 APC-Cy7 (clone SP34-2; BD Biosciences, # 557586), anti-TNF-α PE-Cy7 (clone MP6-XT22; BD Biosciences, # 557644), anti-IFN-γ AF700 (clone XMG1.2; BD Biosciences, # 557998) e anti-IL-2 BV711 (clone JES6-5H4; BioLegend, # 503837) durante 30 min a 4 °C. Em seguida, as células foram lavadas com o tampão de Perm (BD Biosciences, # 554714), fixadas com PBS contendo 1% de paraformaldeído e armazenadas a 4 °C até o momento da aquisição das amostras.

3.12.4 Marcação de dextrâmero, detecção de linfócitos infiltrantes no tumor (TIL) e caracterização de células T de memória.

Suspensões de células provenientes do baço ou do tumor foram plaqueadas em uma concentração de 3×10^6 células por amostra e, subsequentemente, marcadas com Live/Dead Aqua (Dead Cell Stain, Thermo Fisher) em PBS, seguido por bloqueio do receptor FC anti-CD16/32 (BD Biosciences, CA, EUA, #553142), durante 30 min a 4 °C. Em seguida, as células foram marcadas com o dextrâmero peptídeo MHC de classe I restrito E7₄₉₋₅₇ APC-conjugado (Immudex, Copenhagen, Dinamarca, # JA2195) por 40 min e depois analisadas por citometria de fluxo usando dois painéis de mAb diferentes. No primeiro, as células foram marcadas extracelularmente com os mAbs anti-CD8α Pacific Blue (clone 53-6.7; BioLegend, #100725) e anti-CD3 APC-Cy7 (clone SP34-2; BD Biosciences, #557586) por 30 min a 4 °C, para avaliar as células T CD8⁺ E7-específicas. No segundo, as células foram marcadas com os mAbs de superfície: anti-CD45, anti-CD3, anti-CD8, anti-CD44, anti-CD62L, anti-CD127, anti-KLRG-1, anti-CD103 e anti-CD69 (BioLegend ou Biosciences) para avaliar os

linfócitos infiltrantes no tumor (TIL) e células T de memória. As células foram lavadas duas vezes em tampão FACS, fixadas com PBS 2% contendo 1% de paraformaldeído e armazenadas a 4 °C até o momento da aquisição das amostras. Os fenótipos de células imunes foram definidos por um pré-gate em células únicas (do inglês *singlets*), seguido da detecção de células viáveis, da seguinte forma: **TIL**: (CD45⁺ CD3⁺ CD8⁺); **TIL E7-específico**: (CD45⁺ CD3⁺ CD8⁺ Dextr⁺); **Célula T de memória central (TCM)**: CD45⁺ CD3⁺ CD8⁺ Dextr⁺ CD44⁺ CD62L⁺; **Células efetoras de vida curta (SLEC)**: CD45⁺ CD3⁺ CD8⁺ Dextr⁺ CD44⁺ CD62L⁻ KLRG-1⁺ CD127⁻; **Células efetoras precursoras de memória (MPEC)**: CD45⁺ CD3⁺ CD8⁺ Dextr⁺ CD44⁺ CD62L⁻ KLRG-1⁻ CD127⁺; **Célula T de memória residente (TRM)**: CD45⁺ CD3⁺ CD8⁺ Dextr⁺ CD69⁺ CD103⁺.

Todos os dados de citometria de fluxo foram analisados no citômetro LSR II ou LSR Fortessa (ambos BD Bioscience, CA, EUA). Para todos os experimentos, um total aproximado de 500.000 - 1.000.000 eventos foram adquiridos por amostra. Os dados foram analisados com auxílio do software FlowJo 10.4 (FlowJo LLC) após a exclusão inicial de *doublets* usando os parâmetros FSC e SSC. A ferramenta de Boolean foi usada para criar o conjunto de combinações possíveis, para determinar células únicas produtoras de mais de uma citocina.

3.13 Ensaio de ELISpot

Os ensaios de ELISpot foram realizados com as células do baço coletadas duas semanas após a imunização. Os esplenócitos foram semeadas na concentração de 4 x 10⁵ células por poço, em placas de nitrocelulose de 96 poços (Multiscreen, Millipore) previamente revestidas com o anticorpo anti-IFN- γ purificado (# 551216; BD Biosciences). As células foram estimuladas ou não com o peptídeo T CD8⁺ E7 específico ₄₉RAHYNIVTF₅₇ (GeneScript) a uma concentração de 5 μ g/ml por 24 h. A secreção de IFN- γ foi detectada após a marcação com um anticorpo anti-IFN- γ biotilado (# 554410; BD Biosciences) por 14 h a 4 °C, seguido do tratamento com o substrato AEC (#551951; BD Biosciences) de acordo com as instruções do fabricante. Os *spots* foram contados em um software automático Aid ELISpot 6.0 usando um leitor estereomicroscópio AID ELISPOT (Autoimmun Diagnostika GMBH, Oberkochem, Alemanha). Os resultados foram expressos como células formadoras de *spots* (SFC – do inglês *spot forming cells*) por 10⁶ células (SFU/10⁶ células) após subtrair os valores de controle negativo de células não estimuladas de todos os grupos testados.

3.14 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism, versão 8.0. As análises de vários grupos foram realizadas usando o teste paramétrico de comparações múltiplas usando o *One* ou *Two Way* ANOVA seguido dos pós teste de Bonferroni. As curvas de sobrevivência foram comparadas usando o teste de log-rank (Mantel-Cox). Métodos apropriados foram indicados nas legendas com diferenças significativas marcadas em todas as figuras. Os valores e as barras de erro foram expressos como média \pm erro padrão da média (SEM). Os níveis de significância foram definidos como $p < 0,05$ (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$). As figuras foram preparadas nos softwares GraphPad Prism e Adobe Illustrator 2020 (Adobe Systems, San Jose, CA), e as ilustrações gráficas feitas no website BioRender utilizando a versão gratuita.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

As vacinas antitumorais específicas para HPV que estão atualmente em estágio clínico de desenvolvimento são baseadas em diferentes plataformas tecnológicas. Dentre elas incluem-se proteínas recombinantes, vacinas com vetores bacterianos ou virais e vacinas genéticas, particularmente baseadas em DNA plasmidial (CHENG; WANG; DU, 2020). Entretanto, nenhuma vacina terapêutica foi licenciada para uso em humanos até o momento. O sucesso da aplicação de vacinas de RNAm para a prevenção da COVID-19 em meio à pandemia causada pelo SARS-CoV-2, abriu perspectivas para o desenvolvimento de novas vacinas genéticas baseadas nas plataformas de expressão de RNAm (BADEN et al., 2021; POLACK et al., 2020). Trabalhos recentes descreveram resultados promissores obtidos pelas vacinas de RNAm no tratamento de tumores associados ao HPV em condições pré-clínicas, demonstrando o potencial terapêutico dessa estratégia vacinal na terapia contra o câncer (GRUNWITZ et al., 2019; KRANZ et al., 2016; MIAO et al., 2019). Em particular, as vacinas de RNAm que codificam E7, associadas a diferentes métodos de entrega, resultaram em forte indução de respostas de células T específicas e aumento dos efeitos antitumorais em camundongos transplantados com as células TC-1 pela via s.c., (GRUNWITZ et al., 2019; KRANZ et al., 2016; MIAO et al., 2019).

Nosso grupo descreveu duas estratégias vacinais terapêuticas contra tumores induzidos por HPV: uma baseada em DNA e outra em proteína recombinante. Ambas envolvem a expressão de uma proteína híbrida, resultado da fusão da glicoproteína D (gD) do HSV-1 e a oncoproteína E7 do HPV-16, chamada de gDE7 (DINIZ et al., 2013; LASARO et al., 2005; PORCHIA et al., 2011). As duas abordagens foram capazes de demonstrar a ativação de linfócitos T CD8⁺ citotóxicos específicos e conferir proteção parcial terapêutica quando testados no modelo de implante s.c. de células tumorais TC-1 associadas ao HPV-16 (DINIZ et al., 2010; PORCHIA et al., 2011). Diante dos resultados obtidos pelo nosso grupo e da perspectiva de viabilizar uma abordagem terapêutica para uso em humanos, esse trabalho buscou expandir os estudos com as vacinas terapêuticas baseadas em gDE7, a partir da plataforma de vacina de RNAm para o tratamento de tumores associados ao HPV-16.

Na presente tese de doutorado, descrevemos a construção e síntese de três vacinas baseadas em RNAm, sendo elas: (1) não replicativa e não modificada (nr-

RNA_m UTP), (2) não-replicativa e modificada por incorporação nucleosídica com a metil-1-pseudouridina (nr-RNA_m m1Ψ) e (3) autorreplicativa (re-RNA_m). As três plataformas vacinais foram desenhadas de forma a codificarem o gene repórter da Luc e o gene que codifica a proteína gD fusionada à oncoproteína E7 do HPV-16 (gDE7). Todas as vacinas foram incorporadas em nanopartículas lipídicas (LNPs) como estratégia de delivery, e então utilizadas como uma abordagem terapêutica contra tumores induzidos por HPV-16 em modelo murino. Para melhor compreensão, os resultados foram divididos em três partes: a primeira seção dos resultados é voltada para a produção das vacinas de RNA_m envolvendo a síntese *in vitro* e a caracterização da expressão do gene de interesse *in vitro* e *in vivo*. Para esse propósito, comparamos as estratégias de nr-RNA_m e re-RNA_m que codificam para o gene repórter da Luc ou para o antígeno vacinal gDE7, quanto à expressão do gene de interesse *in vitro*. Na segunda parte, buscamos avaliar a proteção antitumoral terapêutica das diferentes vacinas de RNA_m-LNP que codificam o antígeno vacinal gDE7, utilizando o modelo de tumores induzidos por HPV-16 em camundongos transplantados com as células TC-1. Em seguida, foram caracterizados a resposta imunológica e os mecanismos relacionados com a proteção antitumoral terapêutica induzida pelas diferentes estratégias vacinais. Além disso, investigamos a capacidade das vacinas em promover proteção terapêutica contra recidivas, bem como a caracterização das células imunológicas de memória envolvidas na proteção de longo prazo. Por fim, as vacinas foram avaliadas em relação à proteção antitumoral terapêutica no modelo de tumores em estágio avançado de crescimento. Na terceira e última parte dos resultados, avaliamos a eficácia das diferentes vacinas no contexto terapêutico de implantação de tumores de mucosa, que mimetizam a localização das neoplasias em humanos, como os tumores cervicais (modelo intravaginal) e os tumores de cabeça e pescoço (modelo sublingual).

4.1 Síntese *in vitro* e purificação das vacinas nr-RNA_m e re-RNA_m

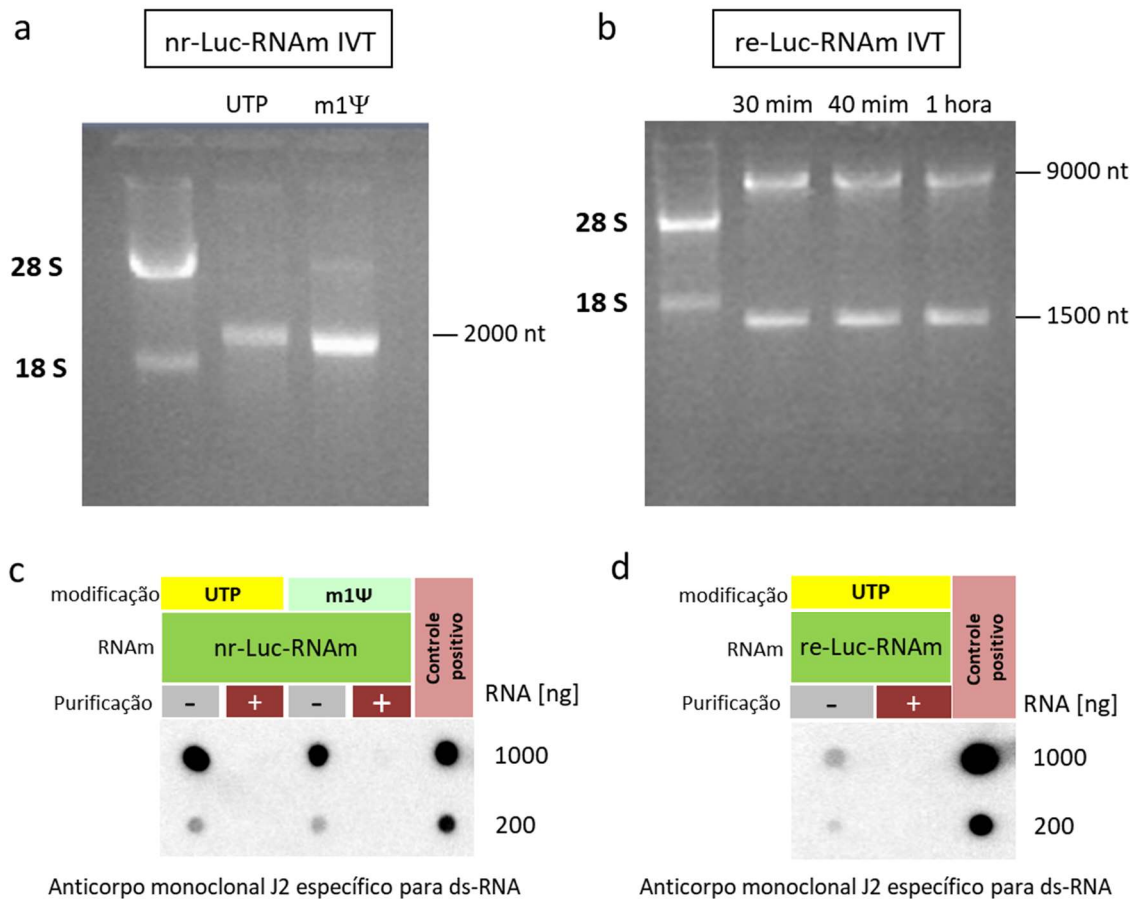
Inicialmente foi realizada a produção do nr-RNA_m codificando Luc sintetizado com nucleosídeos não modificados (UTP) ou com a incorporação nucleosídica da 1-metil-pseudouridina (m1Ψ). O fracionamento por tamanho do RNA_m IVT foi realizado por meio de eletroforese para confirmar a integridade e o tamanho do produto obtido, bem como avaliar a ausência de fragmentos de tamanho indesejáveis. Conforme

observado na **Figura 4a**, ambas as amostras de nr-RNA_m UTP ou com a incorporação nucleosídica (nr-RNA_m m1Ψ) apresentaram bandas íntegras de aproximadamente 2.000 nucleotídeos, compatíveis com o tamanho predito *in silico*. Como esperado, observamos também a presença de bandas mais altas, correspondente às estruturas secundárias do RNA_m, visualizadas no gel não-desnaturante. Observamos que os RNAs modificados por pseudouridina migram com um peso molecular ligeiramente menor do que seus equivalentes não modificados, no gel de agarose, que pode ser atribuído ao empacotamento mais compactado e, portanto, menor volume hidrodinâmico de RNAs modificados (**Figura 4a**).

Em relação às construções com o vetor autorreplicativo, inicialmente propomos reduzir o tempo de reação de síntese de RNA para 30 mim, 40 mim e 1 h de reação de IVT. Notavelmente, foi possível observar bandas íntegras do re-RNA_m compatíveis com o tamanho predito *in silico* de 9.000 nucleotídeos e também uma segunda banda inespecífica de 1.500 nucleotídeos em todos os tempos de reação IVT avaliados (**Figura 4b**). Embora não tenham ocorrido diferenças significativas entre tempos de reação das IVT testadas, o rendimento da reação foi ligeiramente mais alto para as reações de 30 mim (**tabela 1**). De fato, RNAs longos são facilmente degradados em pHs ácidos, e por isso, tempos menores de reação *in vitro* são desejáveis para a síntese de re-RNAs. Portanto, padronizamos o tempo ideal para a síntese de re-RNAs em 30 mim.

Sabe-se que a eliminação de contaminantes de dsRNA por HPLC ou purificadas por adsorção em colunas carregadas com celulose, melhora a tradução do RNA_m IVT (BAIERSDÖRFER et al., 2019b; KARIKÓ et al., 2011). A ligação de ácidos nucleicos de fita dupla à celulose no tampão contendo 16% de etanol é uma propriedade exclusiva do dsRNA e, por isso, permite purificar RNAs IVT. Portanto, o próximo passo consistiu na purificação do nr-Luc-RNA_m contendo UTP e m1Ψ e do re-Luc-RNA_m por meio de colunas carregadas com celulose imersas em um tampão com 16% de etanol. A análise por *dotblot*, realizada com o anticorpo J2 específico para dupla fita de RNA, demonstrou que as amostras de nr-RNA_m, após a purificação por celulose, continham quantidades de RNA dupla fita indetectáveis pela ausência de sinal positivo, confirmando assim a remoção eficiente de contaminantes de RNA dupla-fita pela celulose (**Figura 4c**). Em contrapartida, as amostras da IVT dos nr-RNA_m UTP e m1Ψ antes da purificação apresentam altas quantidades de contaminantes de RNA dupla fita, observados pelo sinal positivo no *dotblot* (**Figura**

4c). Para os re-RNAm foi possível observar que a IVT antes da purificação continha um número muito menor de contaminantes por dupla-fita de RNA que os nr-RNAm (**Figura 4c-d**), que foram completamente removidos após a purificação (**Figura 4d**). A análise das amostras de nr-RNAm UTP e m1Ψ por eletroforese em gel de agarose demonstrou que a integridade da molécula não foi comprometida durante a purificação por celulose (**Figura 4e**). No entanto, para os re-RNAm observa-se uma visível diminuição da intensidade da banda de 9.000 nucleotídeos, possivelmente por quebras na molécula de RNAm, por se tratar de um RNA longo e mais susceptível à degradação (**Figura 4f**).



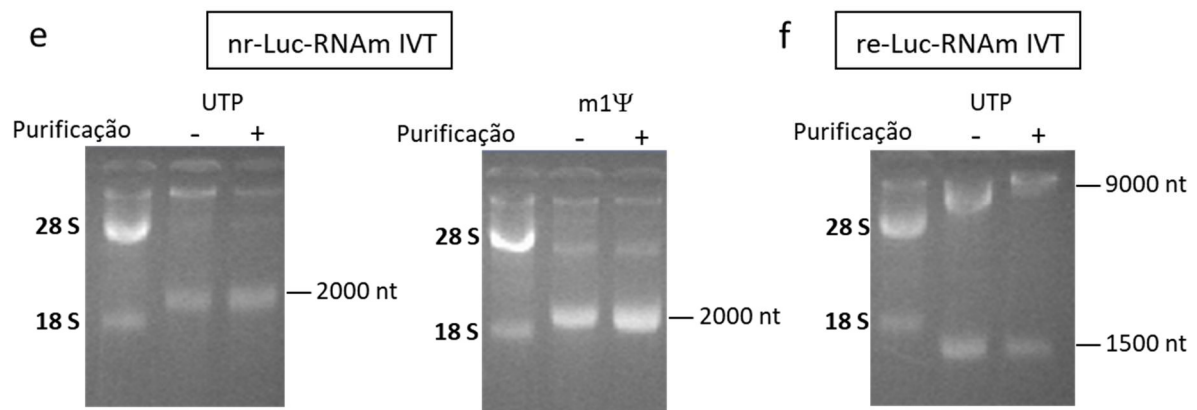


Figura 4. Caracterização e purificação de vacinas de RNAm

(a) Eletroforese em gel de agarose de nr-RNAm UTP e modificado por incorporação de m1Ψ e (b) re-RNAm após a transcrição *in vitro* durante 30, 40 min e 1 h. (c) nr-Luc-RNAms UTP ou m1Ψ e (d) re-Luc-RNAm purificados por celulose na concentração de 1000 ng e 200 ng /dot foram analisados por *dot blot* usando o anticorpo monoclonal J2 específico para dupla-fita de RNA. (e) Eletroforese em gel de agarose de nr-RNAm UTP e modificado por incorporação de m1Ψ e (f) re-RNAm antes e depois da purificação da IVT por celulose.

Tabela 1. Rendimento das reações de re-RNAm IVT em diferentes tempos de incubação da reação.

Construção re-RNAm	Modificação	Concentração (µg/µl)	Vol (µl)	Total (µg)	Tempo (min)	RNA/U de enzima (µg)
SP6 VEE Luc	UTP	1,71	50	85	30	48,0
SP6 VEE Luc	UTP	1,68	50	84	40	42,1
SP6 VEE Luc	UTP	1,58	50	79	60	38,1

Abreviação: Vol - volume. U - unidade.

4.1.2 Otimização da vacina re-RNAm

Idealmente, vacinas de RNAm sintetizadas *in vitro* devem ser produzidas sem que haja contaminantes e produtos inespecíficos durante a transcrição. Nos nossos experimentos com a vacina de re-RNAm, observamos a presença de produtos inespecíficos na reação *in vitro* que poderiam estar interferindo na expressão da vacina *in vivo*. Levantamos a hipótese que a banda inespecífica observada poderia ser resultado da ligação da enzima SP6 a outros sítios que não o promotor. Dessa forma, a substituição da vacina re-RNAm para um vetor que contivesse o promotor T7 para a IVT poderia evitar ligações inespecíficas durante a transcrição. Para isso, utilizamos o vetor SFV pOPAL-1 (gentilmente cedido pelo laboratório de Oncologia translacional da *University Medical Center* em *Johannes Gutenberg University*, Mainz, Alemanha) para a produção *in vitro* da vacina de re-RNAm. Sendo assim, após a

clonagem da gDE7 ou da Luc no plasmídeo OPAL1, as novas construções foram utilizadas para a produção das vacinas de Luc e gDE7 re-RNA*m* *in vitro*. Conforme observado na **Figura 5**, ambas as amostras de re-RNA*m* Luc ou gDE7 apresentaram bandas íntegras de aproximadamente 10.576 nucleotídeos, sem a presença de bandas inespecíficas, compatíveis com o tamanho predito *in silico*. Além disso, a reação de adição de Cap1 ao re-RNA*m* manteve a integridade do RNA*m*. Observamos também, a presença de duas bandas, visível após 40 min de corrida de eletroforese, referente à forma enovelada do RNA*m* em gel de agarose não desnaturante (**Figura 5b**). A partir dos resultados obtidos, utilizamos o vetor T7-OPAL-1 para a produção da vacina de re-RNA*m* nos experimentos subsequentes.

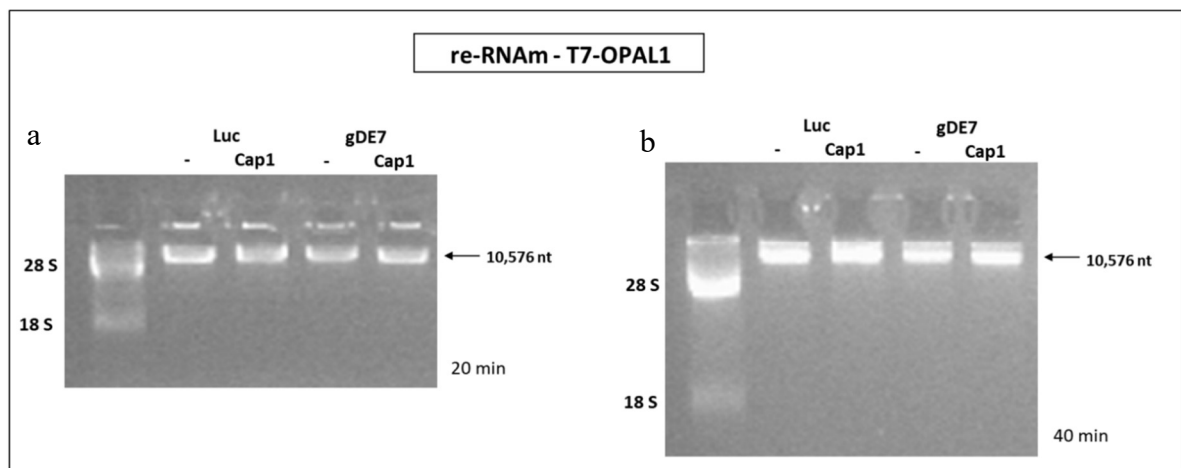


Figura 5. Produção da vacina re-RNA*m* a partir do vetor T7-OPAL1

Eletroforese em gel de agarose de re-RNA*m* codificando a Luc e a gDE7 após 30 min de transcrição *in vitro*. As amostras de RNA*m* foram utilizadas para a adição *in vitro* de Cap1 e também submetidas a corrida eletroforética durante **(a)** 20 e **(b)** 40 min para avaliação da integridade.

4.1.3 Expressão do RNA*m* codificando Luc e gDE7

Primeiramente, investigamos se a adição do Cap1 ao RNA*m* IVT poderia incrementar a expressão do antígeno *in vitro*. Células HEK 293-T foram transfectadas individualmente com 100 ng de uma das quatro formulações de RNA*m* complexado com TransIT: nr-luc-RNA*m* UTP e m1Ψ ou re-Luc-RNA*m* purificado ou não purificado, ambos com ou sem a adição de Cap 1, e a atividade de Luc foi avaliada 12 h após a transfecção. Como esperado, a atividade de Luc foi detectada para todas as formulações testadas. Além disso, a adição do Cap1 aumentou a atividade da Luc, e,

portanto, demonstra-se como um passo importante para se obter níveis superiores de expressão do antígeno (**Figura 6**).

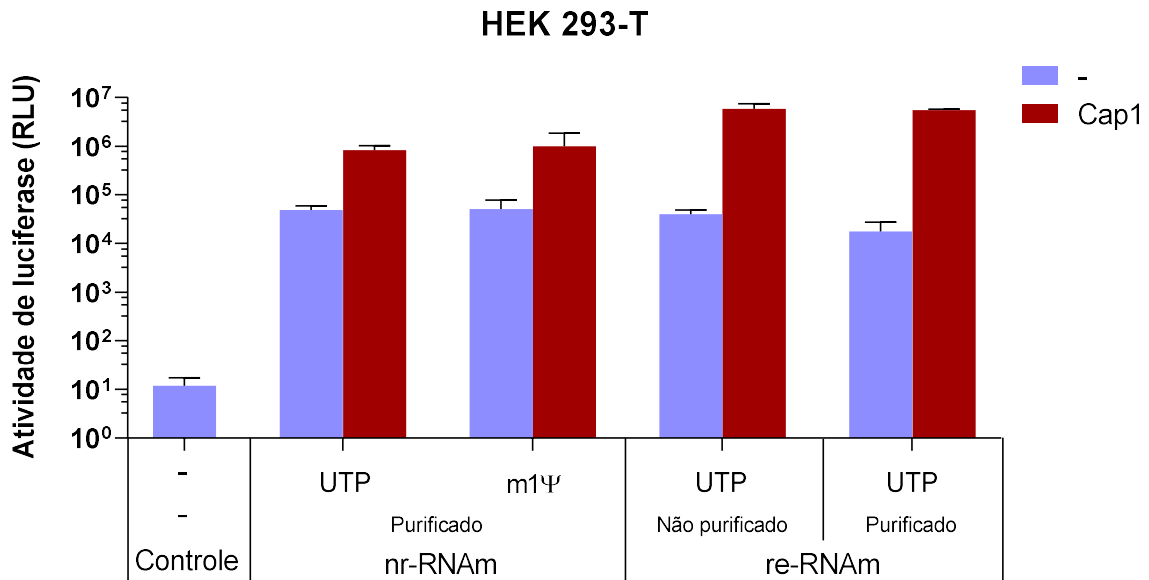


Figura 6. Avaliação do efeito da adição de Cap1 na atividade de luciferase após transfecção de células HEK 293-T usando diferentes estratégias de RNAi que codifica Luc

As células HEK 293-T foram semeadas em placas de 96 poços na concentração de 6×10^4 células / poço e transfectadas com 100 ng de diferentes estratégias de RNAi codificando Luc e complexo com TransIT. As células foram lisadas 12 h após a transfecção e a atividade de Luc foi medida em 6000 células por amostra. Dados representados correspondem a um experimento realizado em quadruplicatas.

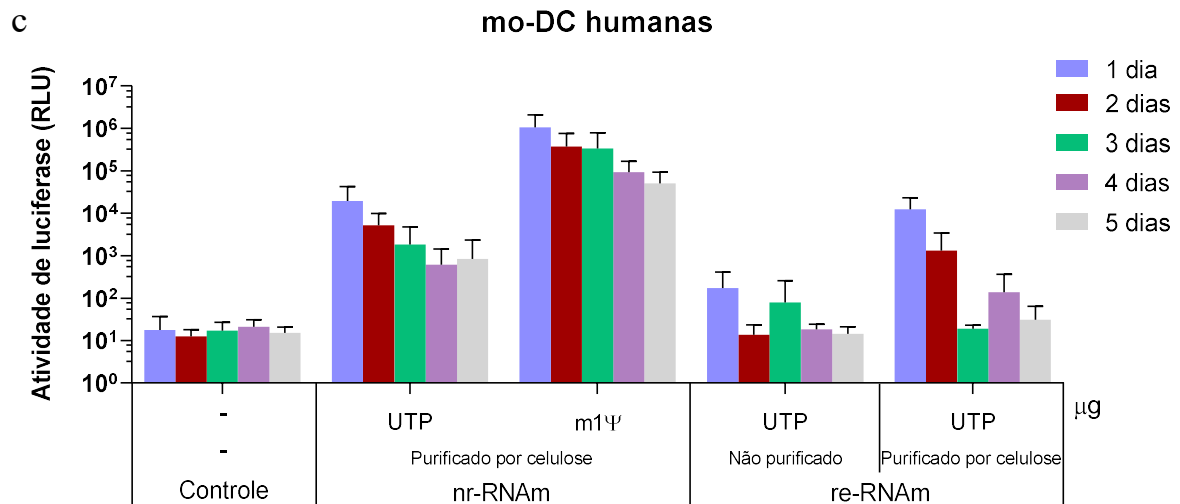
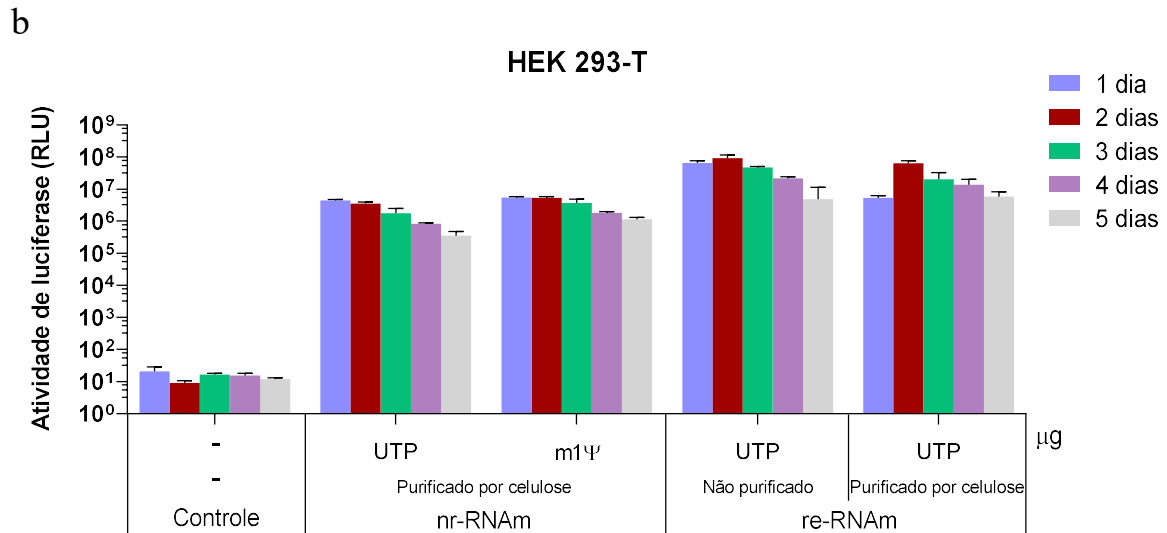
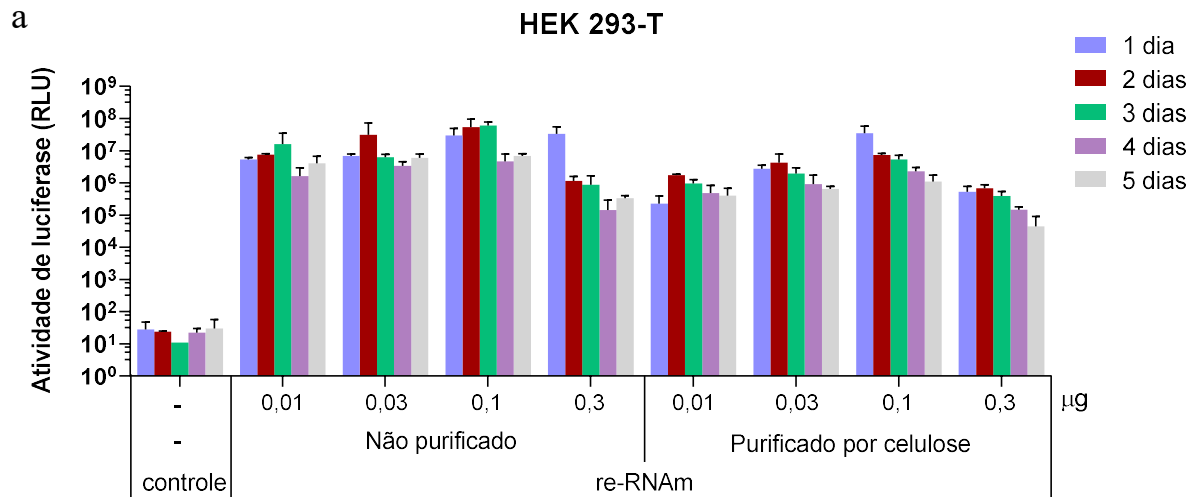
O próximo passo foi avaliar se a purificação do re-RNAi poderia promover o aumento da expressão do antígeno *in vitro*. Para isso, células HEK 293-T foram transfectadas com quantidades crescentes de re-Luc-RNAi, purificado ou não purificado, complexo com TransIT. A luminescência das amostras foi avaliada durante 5 dias. Em concordância com os achados da literatura, foi detectado um alto nível de atividade de Luc, mesmo após a transfecção com apenas 10 ng de re-RNAi. Além disso, foi possível observar que a purificação do re-RNAi não promoveu o aumento a atividade de Luc em comparação com o re-RNAi não purificado (**Figura 7a**). Aumentos significativos da atividade de Luc foram detectados durante os três primeiros dias após a transfecção, os quais permaneceram elevados até o dia 5 para todas as condições testadas (**Figura 7a**). Notavelmente, a atividade de Luc foi maior quando as células foram transfectadas usando re-RNAi não purificado (**Figura 7a**).

Em seguida, comparamos a expressão do gene repórter em linhagens celulares imortalizadas e células primárias promovido pelos 4 RNAs diferentes que codificam

Luc: nr-RNAs m1 Ψ ou não modificados (UTP) e re-RNA purificado e não purificado. Para as células HEK 293-T, a atividade de Luc para o re-RNA superou os níveis nr-RNAs não modificados e os modificados por m1 Ψ , com níveis de Luc aproximadamente 10 vezes mais altos do que os medidos a partir da transfecção com nr-RNAs (**Figura 7b**). A transfecção com nr-Luc-RNA UTP ou m1 Ψ resultou em níveis semelhantes de luminescência nas células HEK 293-T (**Figura 7b**). Por outro lado, em mo-DC, o nr-RNA contendo m1 Ψ promoveu um aumento significativo na capacidade de tradução do RNA em comparação com o controle correspondente e o nr-RNA contendo UTP (**Figura 7c**). Entretanto a produção de Luc nas células mo-DC foi insuficiente ou não foi detectada com re-RNA não purificado, atingindo os mesmos níveis do controle negativo (**Figura 7c**). Embora a purificação do re-RNA resulte em um aumento de luminescência nas primeiras 24 h, a atividade da Luc diminui rapidamente.

Posteriormente, buscamos investigar a expressão da proteína gDE7 promovida pelo nr-RNA e re-RNA, por meio de *Western blot* seguindo o mesmo protocolo de transfecção usado para o gene repórter. Como esperado, resultados semelhantes ao ensaio de Luc *in vitro* foram obtidos a partir das análises com células transfectadas com os RNAs codificando a gDE7. Em células HEK 293-T, o re-RNA promoveu um aumento robusto na expressão da proteína gDE7 em comparação com o nr-RNA UTP e m1 Ψ ou ao grupo controle Luc nr-RNA (**Figura 7d**). É possível observar que a purificação do re-RNA não aumentou a expressão da gD em células HEK 293-T, e, portanto, demonstrou ser um passo dispensável para essa formulação (**Figura 7d**). A incorporação de m1 Ψ ao nr-RNA promoveu um aumento na expressão da gD em comparação com o nr-RNA não modificado (**Figura 7d**). Em contraste, em células primárias mo-DC, a expressão da proteína gDE7 apenas é observada nas células transfectadas com o nr-RNA contendo m1 Ψ (**Figura 7e**). Tomados em conjunto, embora o re-RNA produza altos níveis do antígeno e da proteína repórter na célula HEK 293-T, apenas o nr-RNA nucleosídeo modificado foi capaz de traduzir eficientemente a gDE7 nas mo-DC.

Resultados



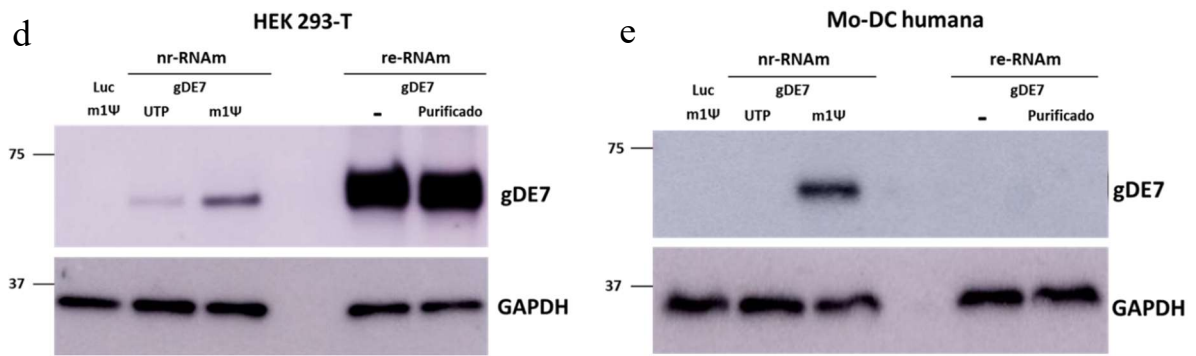


Figura 7. Avaliação da atividade de luciferase após transfecção de células HEK 293-T e células dendríticas derivadas de monócitos (mo-DC) humanos usando RNAm que codifica Luc

As células HEK 293-T e as mo-DC humanas foram semeadas em placas de 96 poços a uma concentração de 6×10^4 células /poço e transfectadas com diferentes RNAm que codifica Luc complexado com TransIT. As células foram lisadas 1, 2, 3, 4 ou 5 dias após a transfecção e a atividade de Luc foi medida (6.000 células por amostra). **(a)** atividade de Luc após transfecção de células HEK 293-T com diferentes quantidades de re-RNA m não purificado e purificado por celulose; **(b)** atividade de Luc após transfecção de células HEK 293-T com 0,1 μg por / poço de nr-RNA m e re-RNA m; **(c)** atividade de Luc após transfecção de mo-DC humanas com 0,1 μg por / poço com nr-RNA m e re-RNA m. **(d-e)** Células HEK 293-T e mo-DC humanas foram semeadas em placas de 96 poços a uma concentração de 6×10^4 células /poço e transfectadas com diferentes RNAm que codifica gDE7 complexado com TransIT. Vinte e quatro horas após a transfecção, as células foram lisadas e analisadas por meio de *western blot*. **(d)** células HEK 293-T ou **(e)** mo-DC incubadas com o anticorpo monoclonal específico para gD, clone ID3, ou GAPDH como controle interno. Os dados representam três experimentos independentes foram realizados em triplicatas.

4.1.4 Expressão *in vivo* de RNAm formulado em nanopartículas lipídicas (LNP)

Para se obter uma eficácia *in vivo*, RNAm devem ser formulados em veículos de entrega que possam proteger contra a degradação por RNases, bem como garantir a entrega eficiente dentro da célula. Portanto, nessa próxima etapa, estabelecemos uma colaboração com a empresa Acuitas (Toronto, Canadá) para a formulação do RNAm em nanopartículas lipídicas (LNP) – uma abordagem que foi previamente testada pelo grupo do Dr. Norbert Pardi. Essa estratégia mostra-se eficiente para entrega de RNAm *in vivo* e também apresenta efeitos adjuvantes.

A fim de determinar a durabilidade e a eficiência dos RNAm-LNPs em expressar a proteína de interesse *in vivo*, comparamos a expressão do nr-RNA m UTP e nr-RNA m m1Ψ que codifica a Luc com os re-RNA m, purificado ou não purificado, por celulose. Comparamos também as vias i.d. e i.m. para inoculação do RNAm-LNP *in vivo*. Como demonstrado na **Figura 8**, um alto nível de expressão de Luc foi detectado para os animais inoculados com a formulação nr -RNA m UTP nas primeiras horas pós inoculação, tanto para a via i.d., quando para a via i.m. **(Figura 8 a e b)**. No entanto, a expressão da Luc decaiu rapidamente e atingiu os níveis semelhantes ao controle

em 7 dias pós inoculação (**Figura 8b**). Para a formulação re-RNA_m, a atividade da Luc foi inferior em ordens de magnitude às alcançadas pelas construções nr-RNA_m (UTP e m1Ψ) (**Figura 8a**). Apesar da longa duração da luminescência promovida pelo re-RNA_m-LNP, essa construção não atingiu os níveis de pico medidos com o nr-RNA_m modificado por m1Ψ (**Figura 8b**). De fato, o nr-RNA_m-LNP m1Ψ resultou em níveis muito mais altos (cerca de 10 vezes) da expressão de Luc em comparação com o nr-RNA_m-LNP UTP (**Figura 8b**). Importaneamente, ambas as vias demonstraram ser eficientes na expressão do RNA_m em camundongos (**Figura 8**). Em suma, todas as formulações foram capazes de expressar eficientemente o antígeno *in vivo*, embora apresentem cinéticas diferentes.

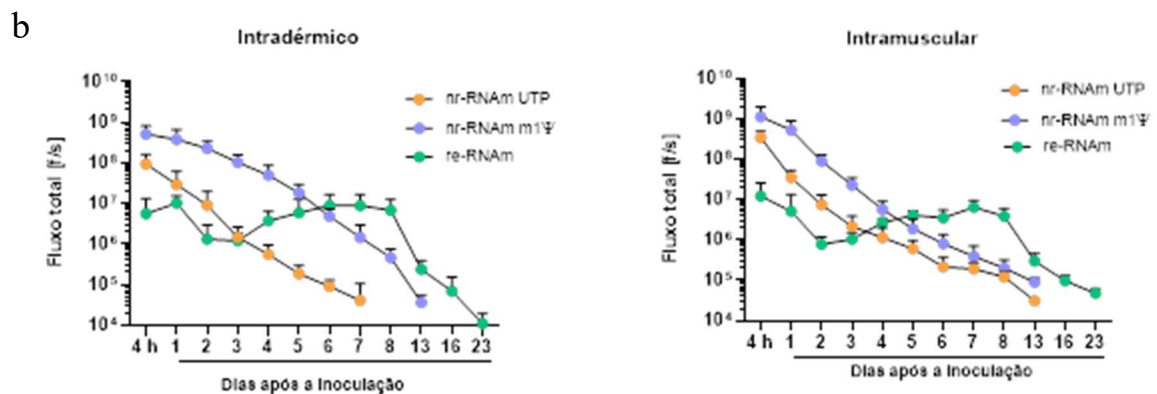
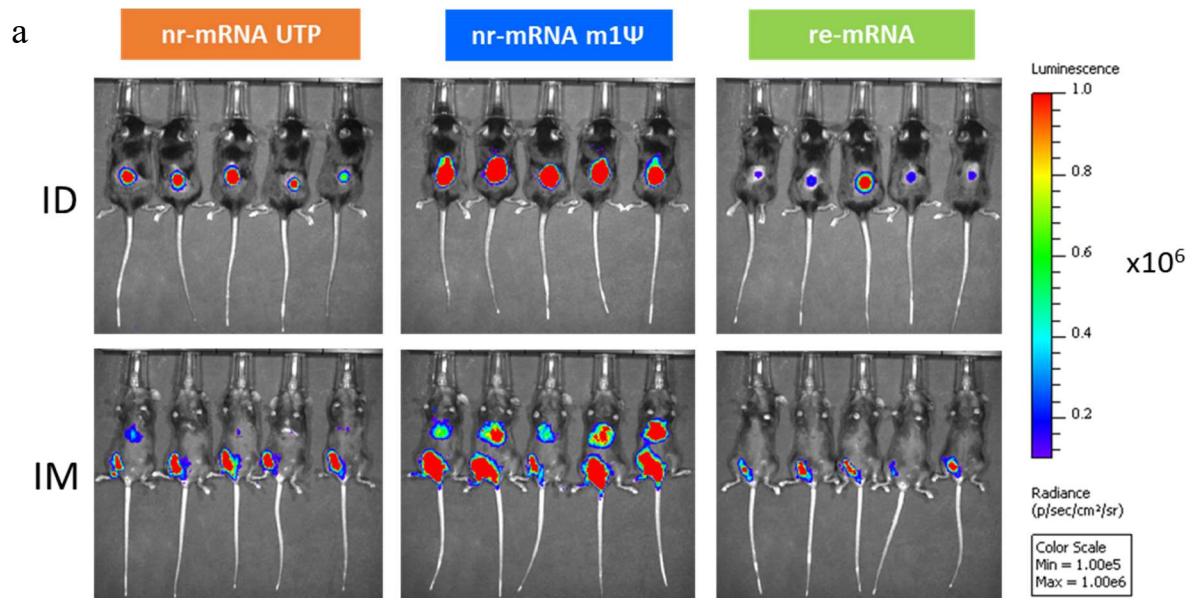


Figura 8. Avaliação da luminescência *in vivo* de camundongos inoculados com nr-RNAm e re-RNAm.

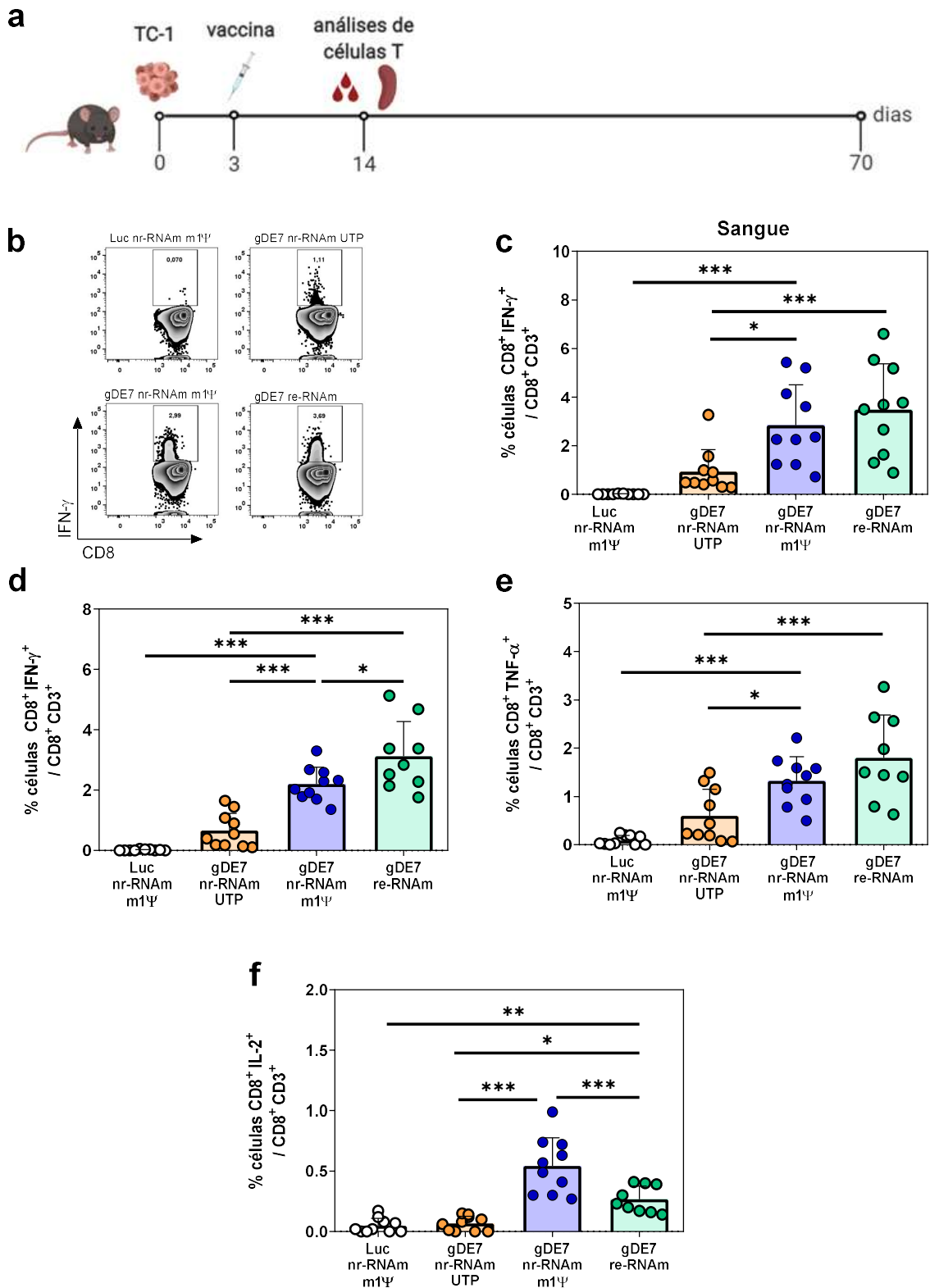
Camundongos C57Bl /6 foram inoculados por via intramuscular (i.m.) ou intradérmica (i.d.) com 3 µg de re-RNAm (não purificado) ou nr-RNAm (UTP e m1Ψ) que codifica Luc formulada em LNPs e a bioluminescência foi mensurada em diferentes tempo pós-injeção, usando o espectro IVIS. **(a)** Imagem representativa 24 h após a injeção das diferentes formulações de RNAm-LNP. **(b)**: Quantificação da luminescência expressa em fótons por segundo (p/s) da inoculação i.d. e i.m.. Resultados apresentados são de dois experimentos independentes, n=10.

Após otimização da síntese das vacinas de RNAm e caracterização *in vitro*, iniciamos a produção de lotes de 10 mg de RNAm para cada formulação codificando para o antígeno gDE7 (nr-RNAm UTP, nr-RNAm m1Ψ e re-RNAm não purificado). Todos os RNAm foram novamente avaliados em gel de agarose quanto à sua integridade, expressão *in vitro* do antígeno e confirmação de ausência de LPS, como controle de qualidade. Todos os RNAm produzidos foram enviados para a empresa Acuitas para o encapsulamento nos LNPs. Com isso, obtivemos lotes da vacina de RNAm suficientes para os testes *in vivo* e que seguem parâmetros de qualidade e uniformidade entre as doses.

4.2 Imunização terapêutica com diferentes vacinas de gDE7 RNAm-LNPs

4.2.1 Vacinas gDE7 RNAm-LNPs induzem ativação robusta de respostas de células T CD8⁺ E7-específicas

A resposta de células T CD8⁺ E7-específicas desempenha um papel relevante na resposta antitumoral, sendo um parâmetro indicativo de imunogenicidade e proteção terapêutica induzida pelas formulações vacinais testadas no modelo de tumores que expressam as oncoproteínas E6 e E7 do HPV-16. Portanto, avaliamos a resposta celular E7-específica após a imunização com as diferentes vacinas de RNAm-LNP em camundongos transplantados com as células TC-1. Animais C57BL/6 foram inoculados com uma única dose de 30 µg de gDE7-RNAm-LNPs pela via i.m. 3 dias após o transplante das células TC-1 (**Figura 9a**). Como controle, os camundongos foram imunizados com a formulação Luc m1Ψ nr-RNAm-LNP. Inicialmente, foi medida a porcentagem de células T CD8⁺ produtoras de IFN-γ circulantes no sangue por meio da técnica de ICS, duas semanas após a imunização. Como demonstrado na **Figura 9b-c**, altas frequências de células T CD8⁺ produtoras de IFN-γ E7-específicas foram detectadas no sangue de camundongos vacinados com as formulações gDE7 - m1Ψ nr-RNAm-LNP e re-RNAm-LNP (**Figura 9b-c**). Por outro lado, camundongos imunizados com a vacina gDE7 UTP nr-RNAm-LNP apresentaram baixas porcentagens de linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN-γ e frequências similares ao grupo controle Luc m1Ψ nr-RNAm-LNP (**Figura 9b-c**).



9g

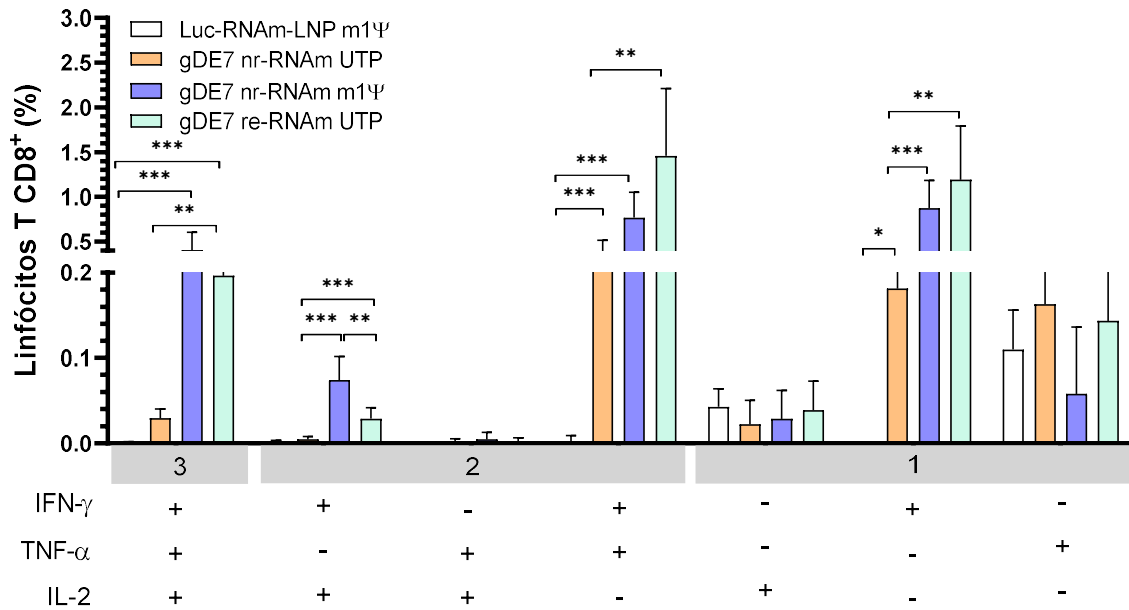


Figura 9. Imunização com gDE7 RNAm-LNP induz resposta robusta de células T CD8⁺ E7-específica contra tumores induzidos por HPV em camundongos

(a) Camundongos C57BL/6 foram desafiados com 1×10^5 células TC-1 e imunizados por via i.m. 3 dias depois com uma dose de 30 μ g de RNAm não replicante (nr) não modificado (UTP), nucleosídeo modificado (m1 Ψ) ou com o RNAm autorreplicativo (re-RNAm) que codifica a proteína gDE7, formulados em LNP. Camundongos do grupo controle foram vacinados com 30 μ g de Luc m1 Ψ nr-RNAm-LNP. Duas semanas depois, o sangue e o baço dos animais foram coletados para análise da resposta das células imunológicas. (b-c) Porcentagem de células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ no sangue determinadas por citometria de fluxo, após estimulação *in vitro* com peptídeo MHC de classe I E7₄₉₋₅₇ (RAHYNIVTF). (d-f) Porcentagens de células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ , TNF- α e IL-2 respectivamente, após estimulação *in vitro* com peptídeo E7₄₉₋₅₇. (g) Frequências de combinações de citocinas produzidas simultaneamente por células T CD8⁺. Dados de dois experimentos independentes. Cada símbolo representa um animal (n=10) Barra de erro é demonstrada como SEM. Análise estatística: ANOVA, pós-teste: Bonferroni. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

Subsequentemente, investigamos se as vacinas baseadas em gDE7 RNAm-LNPs eram capazes de promover respostas de células T CD8⁺ polifuncionais no baço. Similar aos resultados observados no sangue, a dose única das vacinas gDE7 m1 Ψ nr-RNAm ou sa-RNAm-LNPs induziu um aumento significativo das frequências de células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ , TNF- α e IL-2, enquanto os animais vacinados com a formulação gDE7 nr-RNAm UTP não apresentaram aumento significativo na ativação de células T CD8⁺ produtoras dessas citocinas (**Figura 9d-f**). Além disso, a maioria das células T CD8⁺ responsivas obtidas nos diferentes grupos vacinais, foi capaz de produzir múltiplas citocinas simultaneamente, (**Figura 9g**). Dessa forma, é possível observar que as vacinas gDE7 m1 Ψ nr-RNAm ou sa-RNAm-LNPs, além de aumentar significativamente a frequência de linfócitos T CD8⁺ IFN- γ ⁺, são capazes de

promover a produção de outras citocinas simultaneamente, evidenciando um perfil polifuncional de ativação de linfócitos T CD8⁺.

Para confirmar os resultados obtidos no ICS, avaliamos as células secretoras de IFN- γ no baço dos animais imunizados com as diferentes formulações, pela técnica de ELISpot, seguindo o mesmo protocolo de imunização demonstrado na **Figura 9a**. Como observado na **Figura 10a-b**, todas as formulações testadas utilizando a gDE7 RNAm-LNP induziram um aumento significativo do número de células secretoras IFN- γ em comparação com os camundongos do grupo controle tratados com Luc m1 Ψ nr-RNAm-LNP (**Fig. 10a-b**). Em particular, os grupos de animais imunizados com gDE7 m1 Ψ nr-RNAm-LNP e sa-RNAm-LNP aumentaram significativamente o número de células secretoras de IFN- γ (2 e 2,5 vezes, respectivamente) em comparação com a vacina gDE7 UTP nr-RNAm (**Fig. 10a-b**).

Além disso, avaliamos também a frequência de células T CD8⁺ induzidas pelas diferentes formulações vacinais e capazes de reconhecer o peptídeo E7-específico. Em concordância com os resultados anteriores, os animais imunizados com as formulações m1 Ψ nr-RNAm-LNP e re-RNAm-LNP apresentaram um aumento robusto das frequências de células T CD8⁺ E7-Dextr⁺ em comparação com a formulação UTP nr-RNAm-LNP ou com o grupo controle (**Figura 11a-b**). Os animais imunizados com a vacina UTP nr-RNAm-LNP demonstraram baixas frequências ou níveis indetectáveis de linfócitos T CD8⁺ E7-Dextr⁺, sem diferença estatística em relação ao grupo controle.

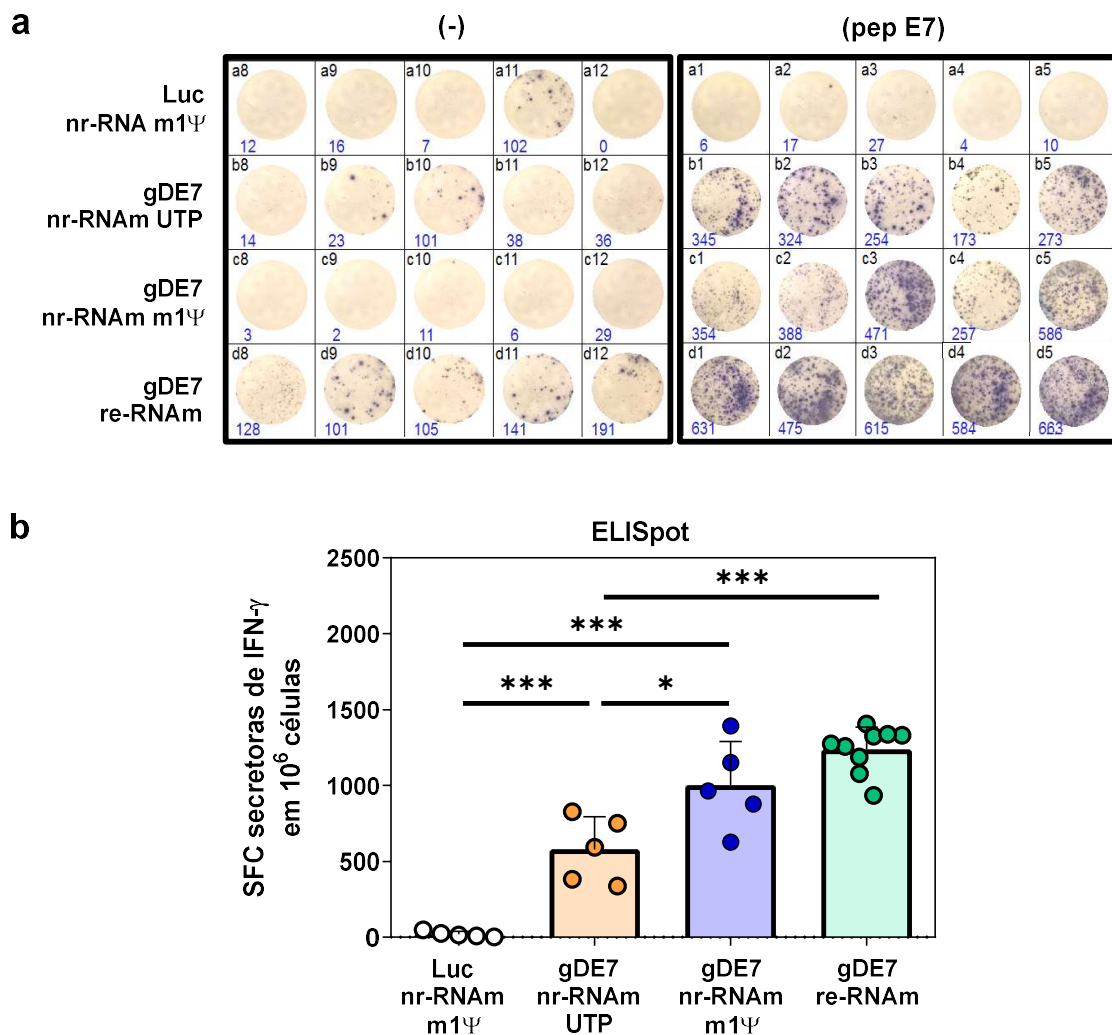


Figura 10. Imunização com gDE7 RNAm-LNP induz aumento de células T CD8⁺ E7-específicas secretoras de IFN- γ em modelo de tumores induzidos por HPV-16.

Camundongos C57BL/6 foram desafiados com 1×10^5 células TC-1 e imunizados por via i.m. 3 dias depois com uma dose de 30 μ g de RNAm não replicante (nr) não modificado (UTP), nucleosídeo modificado (m1Ψ) ou com RNAm autorreplicativo (re-RNAm) que codifica a proteína gDE7, formulados em LNP. Camundongos do grupo controle foram vacinados com 30 μ g de Luc m1Ψ nr-RNAm-LNP. Duas semanas depois, o baço dos animais foi coletado para análise de ELISpot. **(a-b)** Análise imunoenzimática (ELISpot) de células secretoras de IFN- γ determinadas pelo número de células formadoras de spot (do inglês *spot-forming-cells* – SFC), após estimulação *in vitro* com peptídeo E7 MHC de classe I E7₄₉₋₅₇ (RAHYNIVTF). Células não estimuladas foram utilizadas como controle e os valores obtidos foram subtraídos das amostras estimuladas. Cada símbolo representa um animal. (n = 5-10). Barra de erro é demonstrada como SEM. Análise estatística: ANOVA, pós-teste: Bonferroni. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

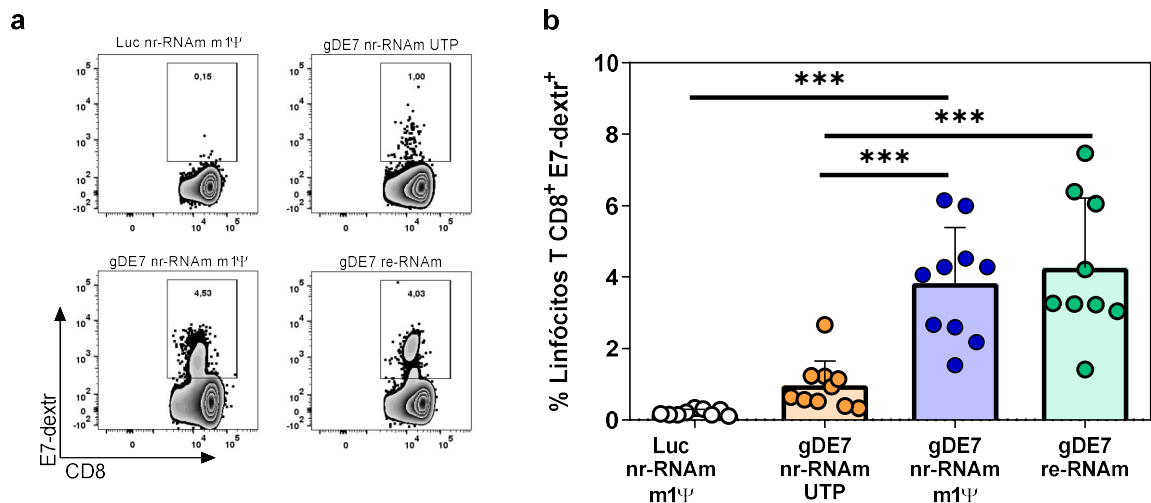


Figura 11. Análise de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos em animais imunizados com diferentes formulações de gDE7 RNAi-LNP em modelo de tumores induzidos por HPV-16.

Camundongos C57BL/6 foram desafiados com 1×10^5 células TC-1 e imunizados por via i.m. 3 dias depois com uma dose de 30 μ g de RNAi não replicante (nr) não modificado (UTP), nucleosídeo modificado (m1 Ψ) ou com RNAi autorreplicativo (re-RNAi) que codifica a proteína gDE7, formulados em LNP. Camundongos do grupo controle foram vacinados com 30 μ g de Luc m1 Ψ nr-RNAi-LNP. **(a)** *Dot plot* e **(b)** frequências das células T CD8⁺ E7-específicas avaliadas duas semanas após a imunização, em células do baço marcadas com dextrâmero MHC-I contendo o peptídeo CD8-específico para a proteína E7 (RAHYNIVTF). Cada símbolo representa um animal. (n = 10). Barra de erro é demonstrada como SEM. Análise estatística: ANOVA, pós-teste: Bonferroni. *** p < 0,001.

Em seguida, buscamos investigar a funcionalidade efetora das células T, por meio do ensaio de citotoxicidade *in vivo* mediada por linfócito T CD8⁺ E7-específico. O ensaio foi realizado de acordo esquema demonstrado na **Figura 12a**. Resumidamente, esplenócitos de camundongos não imunizados foram marcados com duas concentrações distintas de CFSE. As células marcadas com a maior concentração de CFSE foram pulsadas com o peptídeo CD8-específico para a proteína E7, tornando-as células-alvo para lise mediada por linfócitos T CD8⁺ citotóxicos. Células marcadas com CFSE em baixa concentração e não pulsadas com o peptídeo foram utilizadas como controle. Uma quantidade igual das células pulsadas e não pulsadas foi inoculada em camundongos previamente desafiados com as células TC-1 e imunizados com as diferentes vacinas testadas. Após 18 h, os esplenócitos dos camundongos vacinados foram avaliados para detectar a diminuição da frequência das células-alvo, como indicativo da resposta citotóxica de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos. Como esperado, os resultados mostraram que ambas as vacinas m1 Ψ nr-RNAi-LNP e re-RNAi-LNP induziram um aumento robusto nas

frequências de morte de células alvo E7-específicas (aproximadamente 90% de lise), demonstrado pela redução do número de esplenócitos pulsados com peptídeo E7 (Figura 12b-c). Por outro lado, quando as células marcadas com CFSE e pulsadas com peptídeo E7 foram injetadas em camundongos imunizados com a vacina gDE7 nr-RNA_m UTP, as frequências de lise celular E7-específica encontradas foram semelhantes ao grupo controle (imunizado com Luc m1Ψ nr-RNA_m-LNP) (Figura 12b-c).

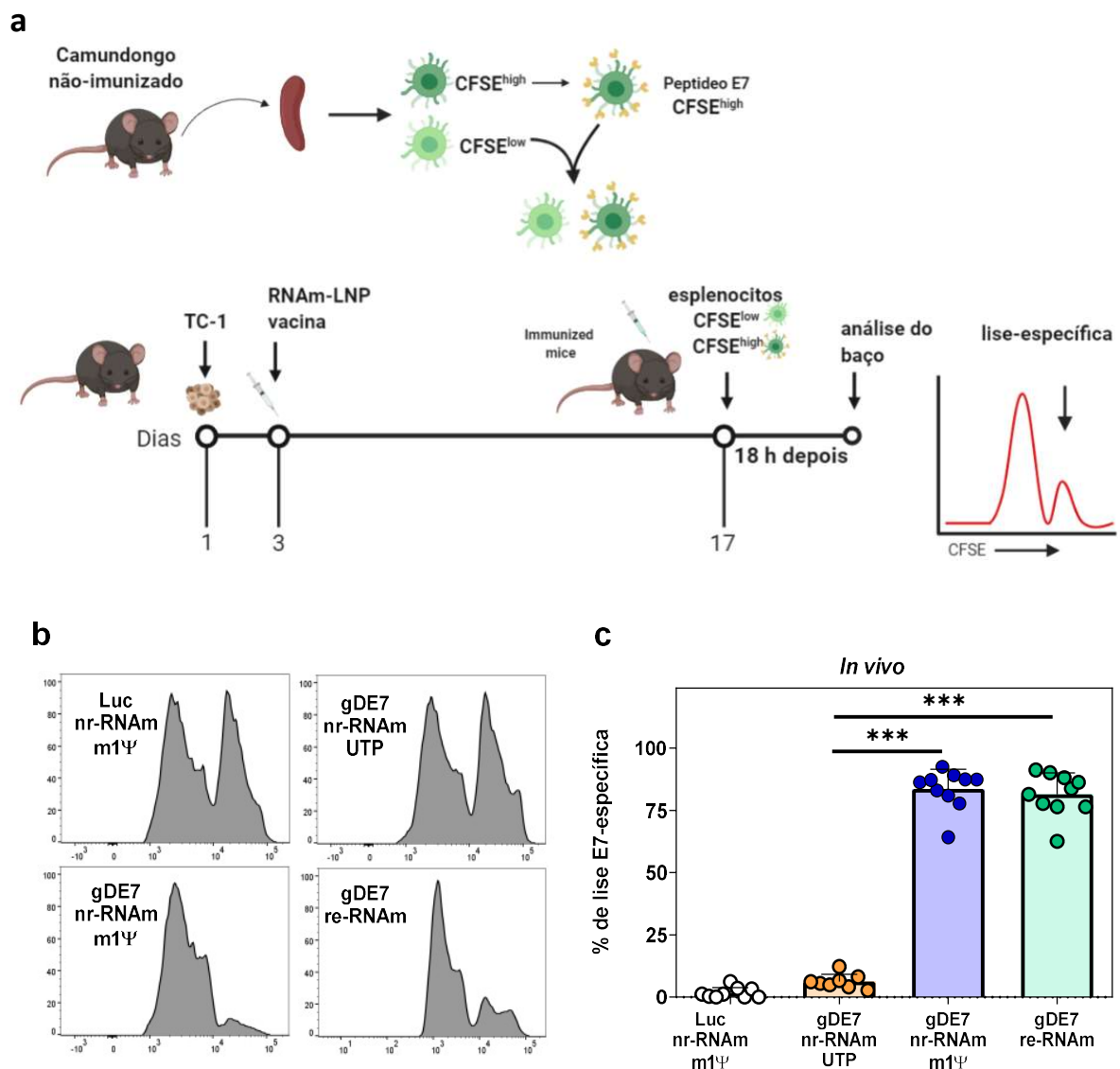


Figura 12. Imunização com gDE7 RNA_m-LNP induz atividade citotóxica *in vivo* mediada por células T CD8⁺ E7-específicas em modelo de tumores induzidos por HPV-16.

Camundongos C57BL/6 foram desafiados com 1×10^5 células TC-1 e imunizados por via i.m. 3 dias depois com uma dose de 30 μ g de RNA_m não replicante (nr) não modificado (UTP) ou modificado com nucleosídeo (m1Ψ) ou com RNA_m autorreplicativo (sa-RNA_m) que codifica a proteína gDE7, formulados em LNP. Camundongos do grupo controle foram vacinados com 30 μ g de Luc m1Ψ nr-RNA_m-LNP. (a) Desenho esquemático do ensaio de citotoxicidade *in vivo*. (b) Histograma e (c) porcentagem de lise específica de células alvo *in vivo* determinada 18 h após a transferência adotiva

de esplenócitos marcados com CFSE pulsados ou não com o peptídeo E7₄₉₋₅₇. Cada símbolo representa um animal. (n =10). Barra de erro é demonstrada como SEM. Análise estatística: ANOVA, pós-teste: Bonferroni. *** p <0,001.

De forma geral, os resultados demonstram que as vacinas m1Ψ nr-RNA_m-LNP e re-RNA_m-LNP promoveram um aumento robusto de ativação de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos secretores de múltiplas citocinas e com atividade citotóxica *in vivo*.

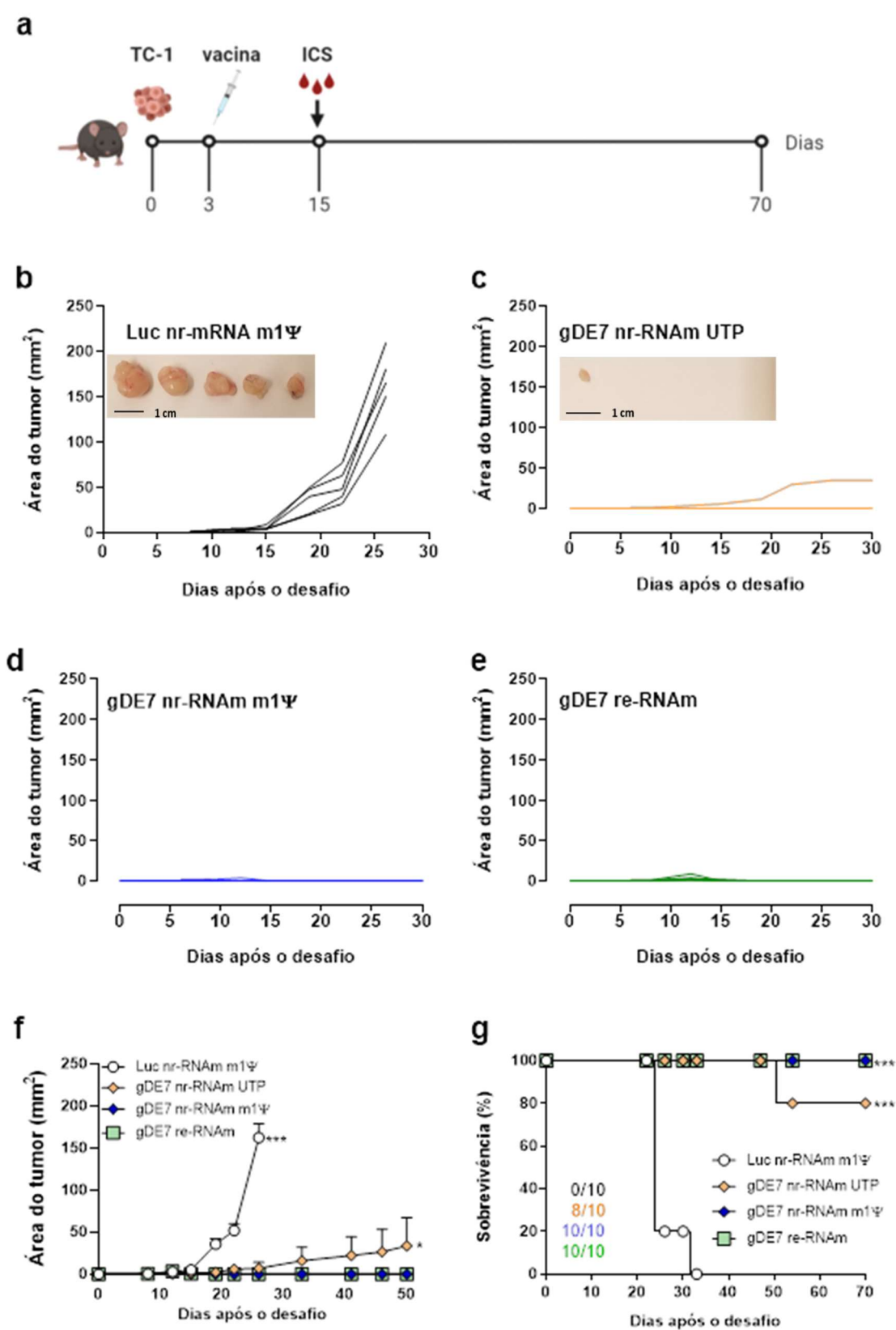
4.2.2 Eficácia terapêutica e proteção antitumoral das vacinas RNA_m-LNP codificando gDE7 *in vivo*

Na etapa seguinte, avaliamos a eficácia antitumoral terapêutica *in vivo* das vacinas de RNA_m-LNP no modelo terapêutico de tumores induzido por HPV-16. Para isso, camundongos C57BL/6 foram inoculados com 1 x 10⁵ células TC-1 pela via s.c.. Três dias após o implante tumoral, os animais foram vacinados com uma dose de 30 µg das vacinas nr-RNA_m-LNP (UTP ou m1Ψ) ou re-RNA_m-LNP codificando gDE7 pela via i.m.. Grupos de animais vacinados com Luc m1Ψ nr-RNA_m-LNP foram utilizados como controle (**Figura 13a**). Como esperado, todos os camundongos tratados com Luc m1Ψ nr-RNA_m-LNP (grupo controle) apresentaram um crescimento tumoral progressivo e tiveram que ser sacrificados em aproximadamente 30 dias após o desafio do tumor (**Figura 13b, f-g**). Interessantemente, apesar de não induzir um aumento significativo na ativação de linfócitos T CD8⁺ (**Figura 9, 11-12**), a vacinação com gDE7 UTP nr-RNA_m-LNP promoveu 80% de rejeição completa do tumor, e 20% dos camundongos que tiveram tumores, controlaram o crescimento do tumoral e sobreviveram até 50 dias após o desafio (**Figura 13c, f-g**). Por outro lado, em concordância com os dados obtidos para a ativação de células T CD8⁺ (**Figura 9-12**), os animais imunizados com uma única dose de gDE7 m1Ψ nr-RNA_m-LNP e re-RNA_m-LNPs demonstraram completa proteção antitumoral terapêutica e permaneceram livres de tumor até o final do período de observação (**Figura 13d-e, f-g**).

Em seguida, investigamos se a redução da dose vacinal de 30 µg de RNA_m-LNP, utilizada anteriormente, para 5 µg poderia promover proteção antitumoral terapêutica eficaz em condições pré-clínicas. Para isso, os camundongos foram desafiados com as células TC-1 s.c. e imunizados 3 dias depois com 5 µg das três diferentes vacinas de gDE7 RNA_m-LNPs, seguindo o mesmo protocolo vacinal utilizado anteriormente

(**Figura 13a**). Resultados semelhantes à dose de 30 µg foram observados para os animais imunizados com a dose menor, de 5 µg, de gDE7 RNAm-LNP (**Figura 13i-h**). Conforme mostrado na **Figura 13h**, todas as formulações testadas foram capazes de promover completa proteção antitumoral em 100% dos camundongos imunizados, que permaneceram livres de tumor até o final do período de observação. No entanto, camundongos do grupo controle tratados com Luc m1Ψ nr-RNAm-LNP, demonstraram crescimento tumoral progressivo e tiveram que ser sacrificados 35 dias após o desafio (**Figura 13h**).

De maneira similar, camundongos vacinados uma dose de 5 ou de 30 µg das vacinas gDE7 m1Ψ nr-RNAm ou gDE7 re-RNAm promoveram uma robusta ativação de células T CD8⁺ produtoras de IFN-γ circulantes, em comparação com o grupo de controle ou com o grupo imunizado com gDE7 UTP nr-RNAm-LNP (**Figura 13i**). Por outro lado, apesar da alta proteção antitumoral, os animais imunizados com gDE7 UTP nr-RNAm apresentaram moderadas ou baixas frequências de linfócitos T CD8⁺ produtoras de IFN-γ e não houve diferença estatística em comparação com as frequências encontradas para o grupo Luc m1Ψ nr-RNAm-LNP (**Figura 13i**). Em conjunto, esses resultados demonstram que uma única dose de 5 µg das vacinas gDE7 é capaz de gerar altas frequências de células T CD8⁺ produtoras de IFN-γ e induzir completa proteção terapêutica antitumoral nas condições avaliadas.



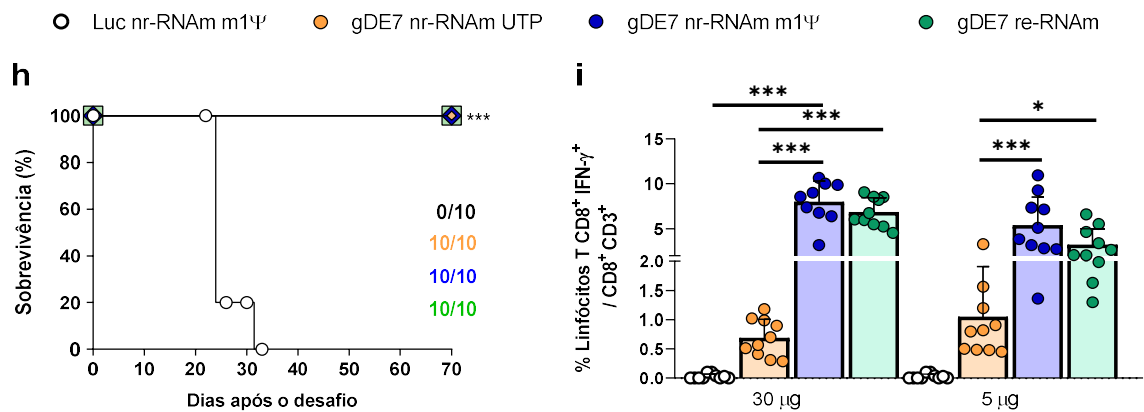


Figura 13. Avaliação da proteção terapêutica das diferentes vacinas baseadas em gDE7 RNAm-LNP no modelo de tumores induzidos por HPV.

Camundongos C57BL/6 foram desafiados com 1×10^5 células TC-1 pela via s.c.. Três dias após o desafio, os animais foram imunizados com 30 ou 5 μg de gDE7 nr-RNAm (UTP ou m1 Ψ), ou re-RNAm formulados em LNPs pela via i.m.. Grupos de camundongos foram vacinados com Luc m1 Ψ nr-RNAm-LNP como grupo controle. (a) Protocolo de imunização. (b-e) Área tumoral em mm^2 analisada individualmente de animais vacinados com a dose de 30 μg . (f) Área do tumor de animais vacinados com a dose de 30 μg , representada de forma agrupada. Cada ponto representa a área média do tumor do grupo de imunização testado. (g-h) Porcentagens de camundongos sobreviventes ao longo do tempo de animais vacinados com a dose de (g) 30 μg ou (h) 5 μg de RNAm-LNP. Os números de camundongos livres de tumor foram indicados ao lado de cada curva de sobrevivência (X/N em que X representa os animais sobreviventes enquanto N representa o total de animais testados). (i) Frequência de linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN- γ E7-específicos duas semanas após a imunização de camundongos com as doses de 30 μg , ou 5 μg das diferentes formulações de RNAm-LNP, no modelo terapêutico. As porcentagens foram mensuradas a partir de células de sangue periférico após estimulação *in vitro* com o peptídeo E7₍₄₉₋₅₇₎. Cada símbolo representa um animal. As barras de erro são SEM. Os dados foram reunidos a partir de dois experimentos independentes. n = 10 animais por grupo. Análises estatísticas: (f) ANOVA two-way. (g-h) Mantel-Cox, log-rank; (i) ANOVA de one-way e two-way, pós-teste: Bonferroni; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

4.2.3 Imunização com dose única de gDE7 RNAm-LNP induz proteção de longo prazo contra recidivas de tumores associados ao HPV-16

Para avaliar se as vacinas poderiam promover proteção contra recidivas tumorais, os camundongos livres de tumores foram desafiados com um segundo implante de células TC-1 90 dias após o primeiro desafio (Figura 14a). Nossos resultados mostraram que, em camundongos imunizados com as doses 5 ou 30 μg , houve uma rápida expansão das respostas de células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ circulantes em comparação com camundongos não tratados, observadas duas semanas após a reinoculação das células TC-1 (Figura 14b-c).

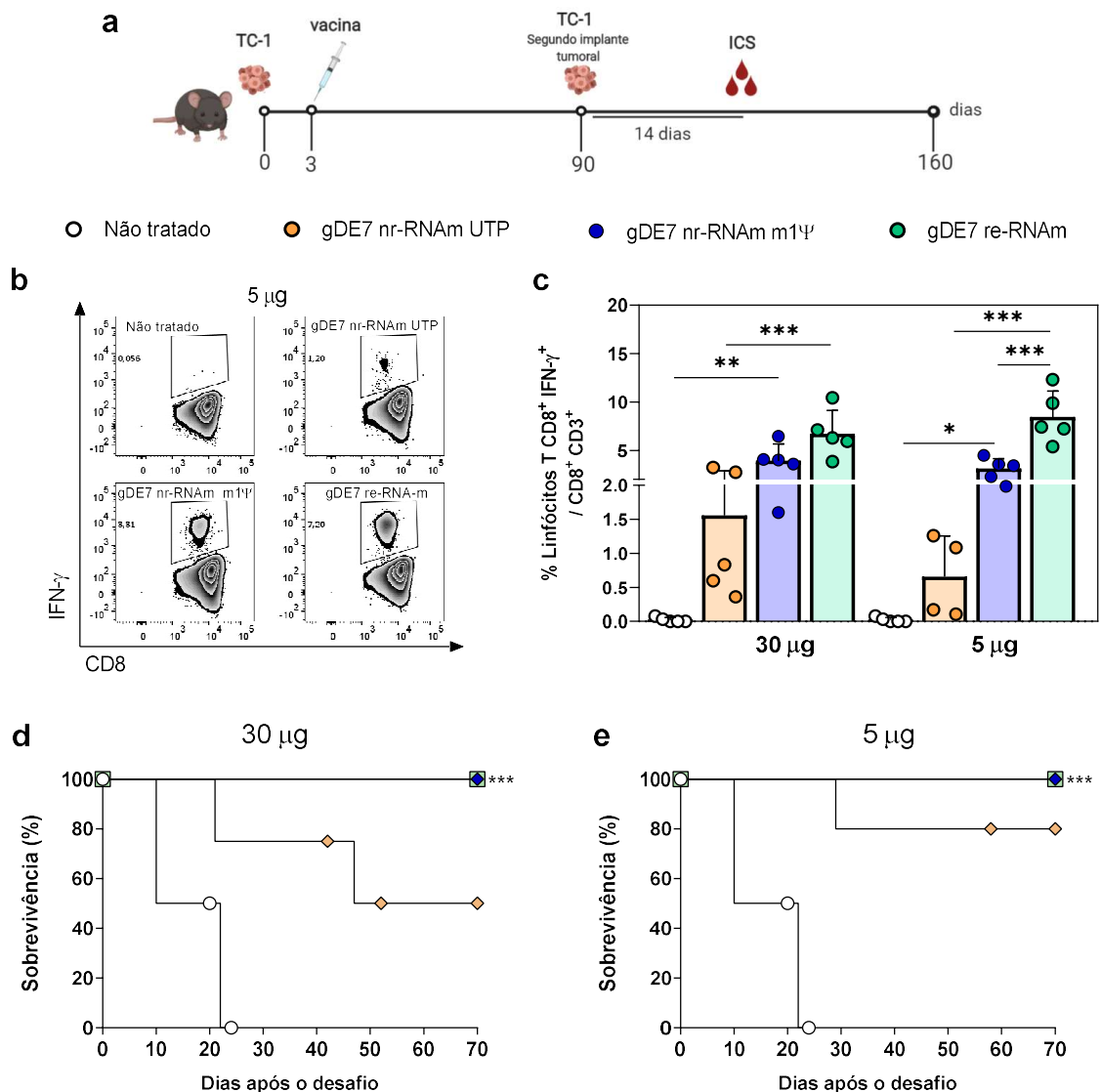


Figura 14. Imunização com dose única de gDE7 RNAi-LNP induz proteção de longo prazo contra recidivas de tumores associados ao HPV-16.

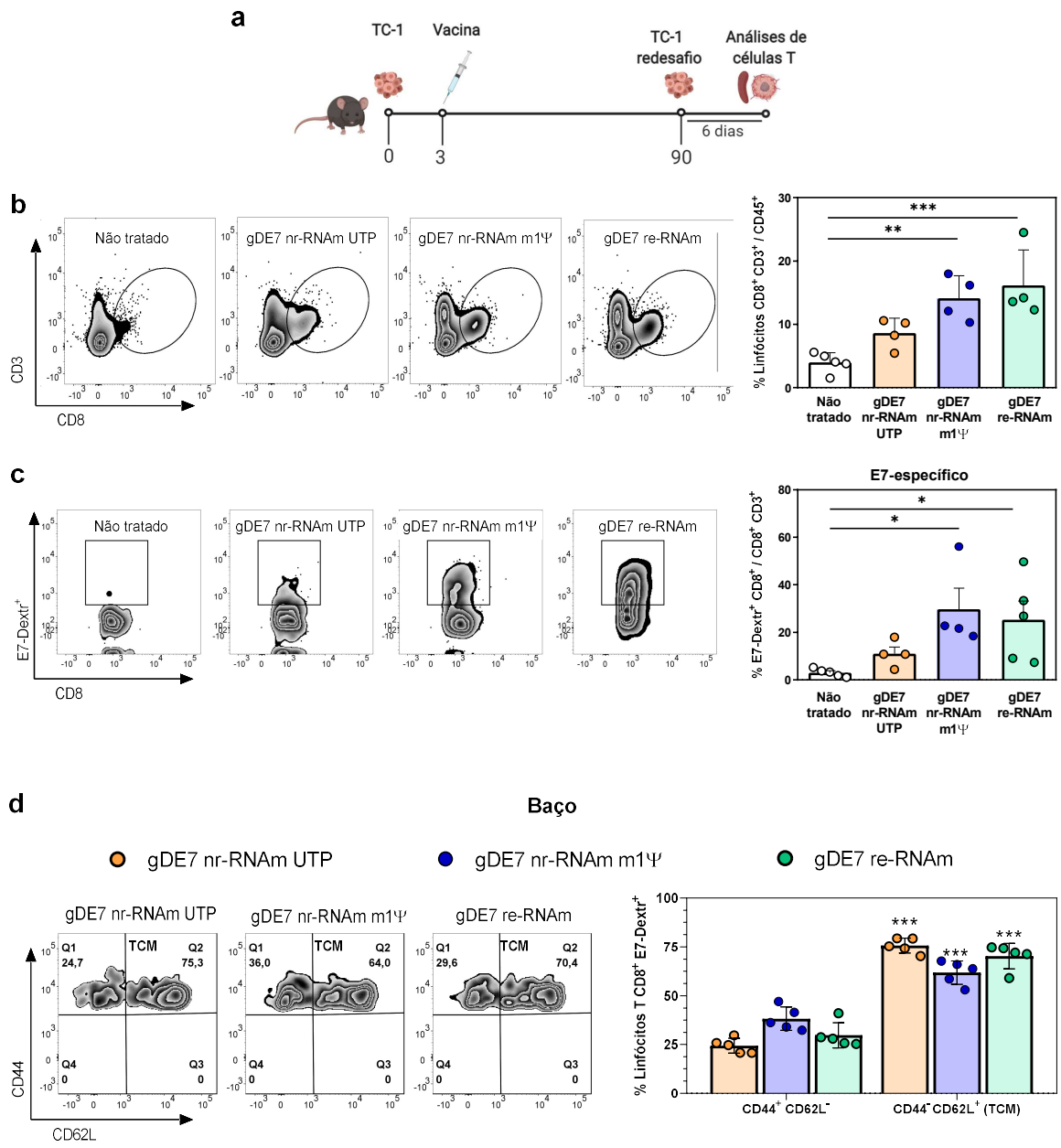
(a) Camundongos C57BL/6 foram desafiados com 1×10^5 células TC-1 e imunizados por via i.m. 3 dias depois com uma dose de 5 µg de RNAi não replicante (nr)- não modificado (UTP) ou nucleosídeo modificado (m1Ψ) ou com o RNAi replicativo (re)-RNAi que codifica a proteína gDE7, formulado em LNP. Camundongos do grupo controle foram vacinados com Luc m1Ψ nr-RNAi-LNP. No dia 90 após, os camundongos sobreviventes livres de tumores receberam um segundo desafio de 1×10^6 células TC-1. (b) *Dot plot* e (c) Frequências de células T CD8⁺ produtoras de IFN-γ de camundongos previamente imunizados, duas semanas após o redesafio. Análises estatísticas: ANOVA, pós-teste: Bonferroni, n=5. (d-e) Porcentagens de sobrevivência após o redesafio de camundongos vacinados previamente (com 30 µg ou 5 µg de RNAi-LNP, respectivamente). Análises estatísticas: Mantel-Cox, teste de log-rank (n = 5). * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

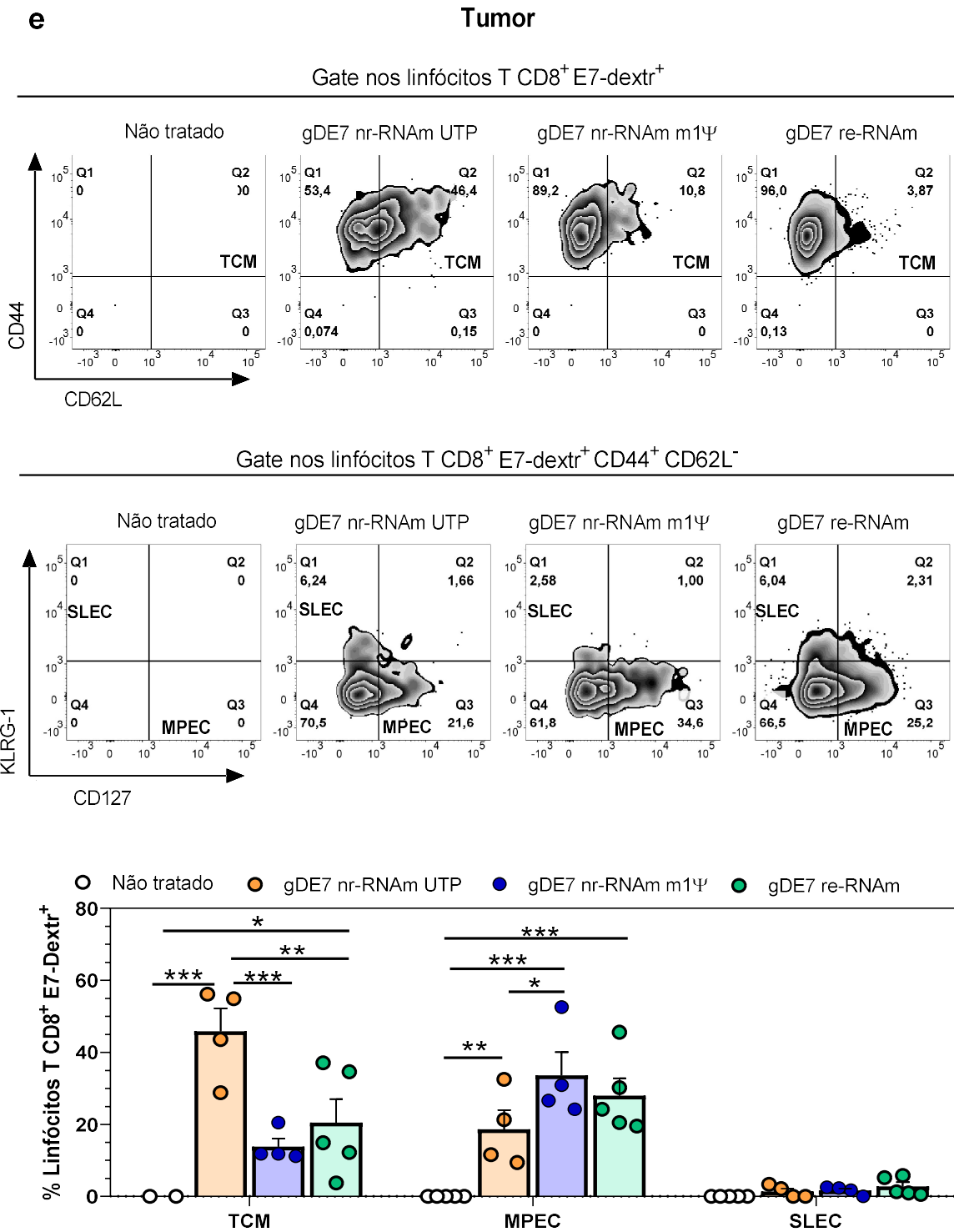
Destaca-se que no grupo previamente imunizado com 30 µg de gDE7 UTP nr-RNAi-LNP apenas 50% dos camundongos permaneceram livres de tumor, porém a diminuição da dose para 5 µg aumentou a proteção completa de tumores contra recidivas para 80% de sobrevivência no final do período de observação (Figura 14d-

e). No entanto, independentemente da dose utilizada, os camundongos imunizados com gDE7 m1Ψ nr-RNA_m-LNP ou gDE7 re-RNA_m-LNP mostraram proteção total contra a recorrência do tumor e 100% da sobrevivência dos camundongos no período de observação, demonstrando proteção de longa duração contra recidivas tumoral (**Figura 14d-e**). Com base nesses resultados, escolhemos a dose única de 5 μg como o regime vacinal.

Posteriormente, investigamos as populações de células T CD8⁺ de memória envolvidas na proteção antitumoral de longo prazo. Para isso, os camundongos imunizados livres de tumor, receberam um segundo desafio tumoral com células TC-1 incorporadas em matrigel, 90 dias após o primeiro implante das células tumorais (**Figura 15a**). Seis dias após a reintrodução do tumor, foi avaliado o fenótipo das células esplênicas e infiltrantes no tumor. Como demonstrado na **Figura 15 b-c**, os camundongos previamente tratados com gDE7 nr-RNA_m UTP mostraram baixas frequências de células T CD8⁺ totais e E7-específicas infiltrantes no tumor, avaliadas por meio da expressão do E7-Dextr⁺. Por outro lado, camundongos imunizados com as vacinas gDE7 nr-RNA_m-m1Ψ ou re-RNA_m mostraram intensa infiltração de células T CD8⁺, que na sua grande maioria foram positivas para E7-Dextr⁺ (**Figura 15b-c**), sugerindo que a imunidade antitumoral está relacionada com a eficácia de infiltração intratumoral de células T E7-específicas.

Em seguida, buscamos caracterizar as células T CD8⁺ E7-específicas presentes no infiltrado intratumoral. Como esperado, para todas as vacinas avaliadas, a maioria das células T CD8⁺ E7-esplênicas específicas apresentaram um fenótipo de memória central (TCM: CD44⁺ CD62L⁺) (**Figura 15d**). Em relação ao infiltrado intratumoral, os camundongos imunizados com gDE7 nr-RNA_m UTP mostraram frequências aumentadas de linfócitos E7-específicos infiltrantes no tumor com um fenótipo de memória central (TCM), definido pelos marcadores CD44⁺ e CD62L⁺ em relação aos outros grupos (**Figura 15e**). Entretanto, em todos os grupos, uma grande fração das células T CD8⁺ E7-específicas que se infiltravam no tumor eram células efetoras CD44⁺ e CD62L⁻, diferenciadas em fenótipos de células precursoras de memória (MPEC: CD127⁺ KLRG1⁻). Por outro lado, células com perfil efector de vida curta não foram detectadas no tumor (SLEC⁻ CD127⁻ KLRG1⁺) (**Figura 15e**).





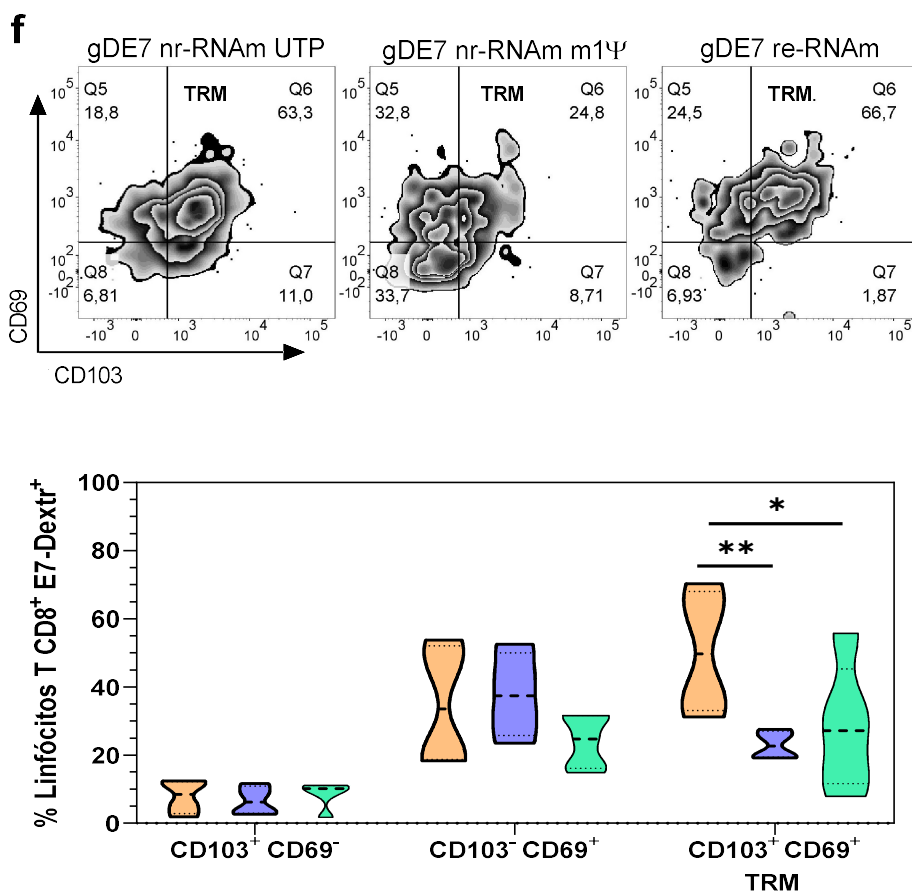


Figura 15. Imunização com dose única de gDE7 RNA m-LNP induz infiltração de células T CD8⁺ E7-específicas de memória no modelo de tumores associados ao HPV-16.

(a) Camundongos C57BL/6 foram desafiados com 1×10^5 células TC-1 e imunizados por via i.m. 3 dias depois com dose única de 5 μ g de RNA m não replicante (nr)- não modificado (UTP) ou nucleosídeo modificado (m1Ψ) ou RNA m autorreplicativo (re)- RNA m que codifica a proteína gDE7 e formulado com LNP. Camundongos do grupo controle foram vacinados com Luc m1Ψ nr-RNA m-LNP. No dia 90, os camundongos imunizados livres de tumores receberam um segundo implante tumoral de células TC-1 diluídas em matrigel e 6 dias depois, os tumores foram coletados e as células infiltradas na matriz foram analisadas para determinar as frequências (b) de células T CD8⁺ infiltrantes no tumor (TIL) e (c) células T CD8⁺ E7-específicas -TIL. *Dot plot* representativos foram apresentados. (d) *Dot plot* representativo e frequência das células TCM (CD62L⁺ e CD44⁺) a partir das células T CD8⁺ E7-específicas presentes no baço. (e) Caracterização de células de memória E7-específicas infiltrantes no tumor em relação à frequência de TCM (CD62L⁺ e CD44⁺), MPEC (CD62L⁻ CD44⁺ KLRG1⁻ CD127⁺) e SLEC (CD62L⁻ CD44⁺ KLRG1⁺ CD127⁻) a partir de células T CD8⁺ E7-específicas. (f) Caracterização do fenótipo das células de memória residente (TRM- CD103⁺ e CD69⁺) infiltrantes no tumor após o redesafio. Análise estatística: ANOVA, pós-teste: Bonferroni, (n = 5). SLEC: células efectoras de vida curta; MPEC: células efectoras precursoras de memória; TCM: células T de memória central. TRM: células T residentes de memória. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

Esses resultados sugerem que as células T CD8⁺ com perfil MPEC são a população de células com características efectoras que tendem a permanecer mais na circulação e nos tecidos periféricos para vigilância imunológica. Curiosamente, a imunização gDE7 nr-RNA m UTP e gDE7 re-RNA m induziu a expansão significativa

de células T de memória residentes específicas de E7 (TRM definido como CD103⁺ e CD69⁺) no tumor, enquanto camundongos tratados com gDE7 nr-RNA_m m1Ψ demonstraram porcentagens modestas de células desse fenótipo (**Figura 15e**). Importante destacar que todas as vacinas baseadas em gDE7 RNA_m-LNP induziram altas frequências de T CD8⁺ E7-específicas ativados, observados pelo marcador CD69⁺ independentemente da expressão do marcador CD103 (**Figura 15f**). Tomados em conjunto, esses resultados sugerem diferenciação de células T E7-específicas em um fenótipo de memória residente pelas vacinas gDE7 nr-RNA_m UTP e gDE7 re-RNA_m.

4.2.4 Proteção antitumoral das vacinas gDE7 RNA_m-LNP são mediadas primariamente por respostas de células T CD8⁺ e parcialmente por respostas de células T CD4⁺

Com o propósito de investigar o papel das células T na proteção antitumoral terapêutica, camundongos geneticamente deficientes em células T CD8⁺ e CD4⁺, foram previamente transplantados com células TC-1 e imunizados, três dias depois, com 5 µg das diferentes formulações vacinais de gDE7 RNA_m-LNP via i.m. (**Figura 16a**). Como observado na **Figura 16b-c**, os camundongos deficientes em células T CD8⁺ e imunizados com as diferentes vacinas baseadas em gDE7 RNA_m-LNP, tiveram crescimento tumoral progressivo semelhante aos camundongos controle (Luc m1Ψ nr-RNA_m-LNP), independente da formulação testada, tendo a proteção antitumoral terapêutica completamente perdida nesses camundongos (**Figura 16b-c**). Por outro lado, a imunização de animais deficientes em CD4⁺ resultou na inibição significativa do crescimento do tumor em comparação com camundongos do grupo controle e sobrevida prolongada em 50% e 70% em camundongos tratados com gDE7 nr-RNA_m-LNP (UTP e m1Ψ) ou re-RNA_m-LNP, respectivamente (**Figura 16d-e**). Em conjunto, esses resultados demonstram que a proteção terapêutica antitumoral induzida pelas vacinas gDE7 RNA_m-LNP é completamente dependente de resposta mediada por células T CD8⁺ e parcialmente dependente da resposta imune mediada por células T CD4⁺.

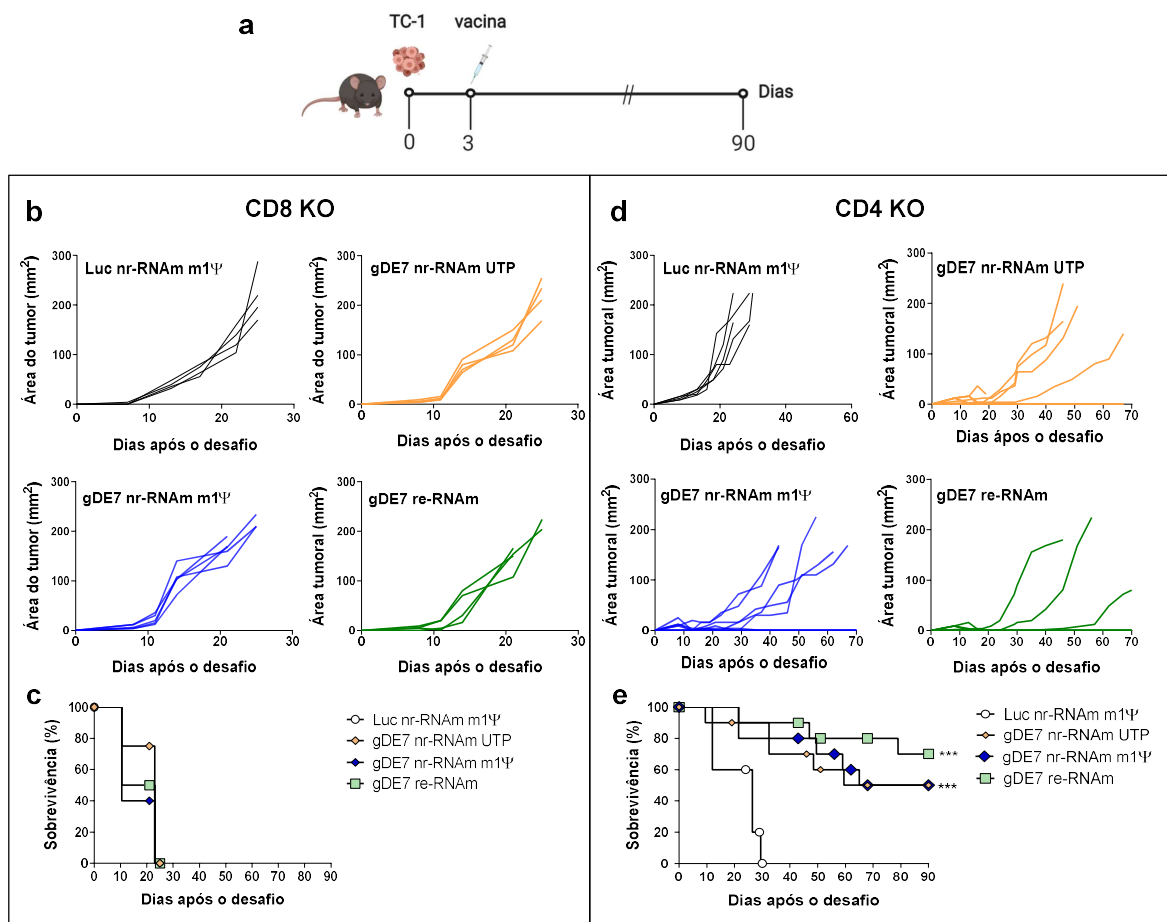


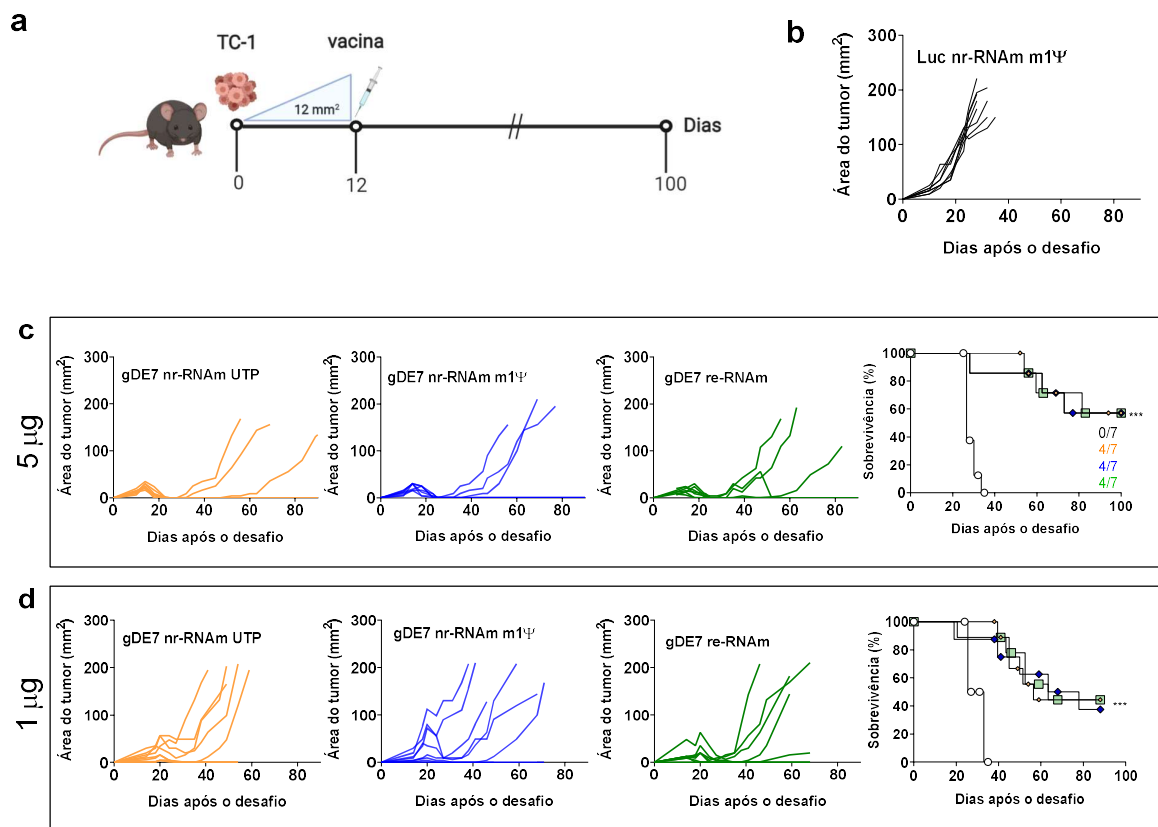
Figura 16. A eficácia da proteção tumoral das vacinas de gDE7 RNAi-LNP requer células T CD8⁺ e depende parcialmente das respostas imunes das células T CD4⁺.

(a) Camundongos CD8 e CD4 KO foram transplantados com 1×10^5 células tumorais TC-1 e imunizados pela via i.m. 3 dias depois com uma única dose de 5 μ g de não modificado (UTP) ou nucleosídeo modificado (m1 Ψ) de não replicação de (nr)-RNAi ou UTP autorreplicativo (re)-RNAi que codifica a proteína gDE7, formulados com LNP. Um grupo de camundongos foi vacinado com 5 μ g de Luc m1 Ψ nr-RNAi-LNP como controle. (b;d) cinética do crescimento tumoral representada pela área tumoral em mm² analisada individualmente de camundongos CD8 e CD4 KO respectivamente, tratados com diferentes vacinas terapêuticas baseadas em gDE7 RNAi-LNPs. (c;e) Porcentagens de sobrevivência global de camundongos CD8 e CD4 KO, respectivamente. Análises estatísticas: Mantel-Cox, teste de log-rank (n = 4-10).

4.2.5 As vacinas gDE7 RNAi-LNPs em baixas doses conferem regressão de tumores em estágios mais avançados de crescimento

Em seguida, avaliamos a proteção antitumoral em estágios de tumores mais avançados de desenvolvimento. Para isso, os camundongos foram desafiados com as células TC-1 e a imunoterapia iniciada quando os tumores atingiram aproximadamente 12 mm² (Figura 17a). Nossos dados mostraram que em camundongos com tumores avançados, a imunização com dose única de 5 μ g das formulações baseadas em gDE7 RNAi-LNP levou à erradicação completa do tumor

em 70% dos camundongos vacinados e prolongou a sobrevivência em tempo superior a 100 dias (**Figura 17c**). Por outro lado, os camundongos do grupo controle, tratados com Luc m1 Ψ nr-RNA m -LNP na mesma dose apresentaram crescimento tumoral progressivo e tiveram que ser sacrificados em 35 dias (**Figura 17b**). Relevantemente, a redução da dose para 1 μ g ou mesmo 0,1 μ g atrasou significativamente o crescimento do tumor em comparação com os camundongos do grupo de controle e prolongou a sobrevivência dos camundongos para todas as formulações testadas (**Figura 17c-d**). Além disso, os camundongos tratados com as vacinas gDE7 RNA m -LNP conferiram 40% e 20% de regressão completa do tumor nas doses de 1 μ g e 0,1 μ g, respectivamente (**Figura 17c-d**). Em conjunto, nossos dados demonstram que a imunização com as formulações baseadas em gDE7 RNA m -LNPs é capaz de promover regressão de tumores e controlar a progressão tumoral com apenas uma dose da vacina, mesmo em um estágio mais avançado de crescimento tumoral, e sem a necessidade de incorporação de adjuvantes adicionais.



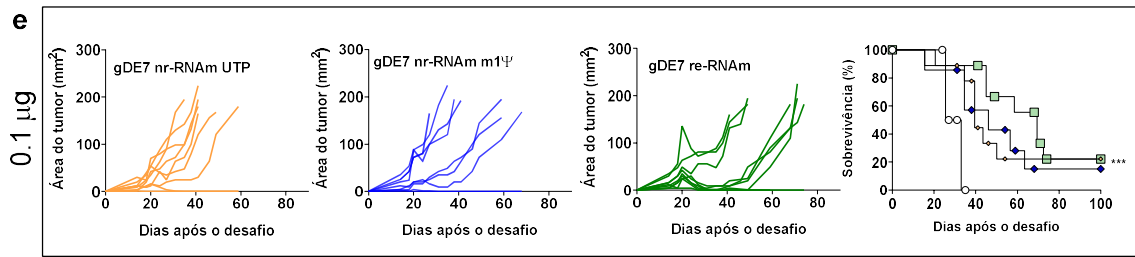


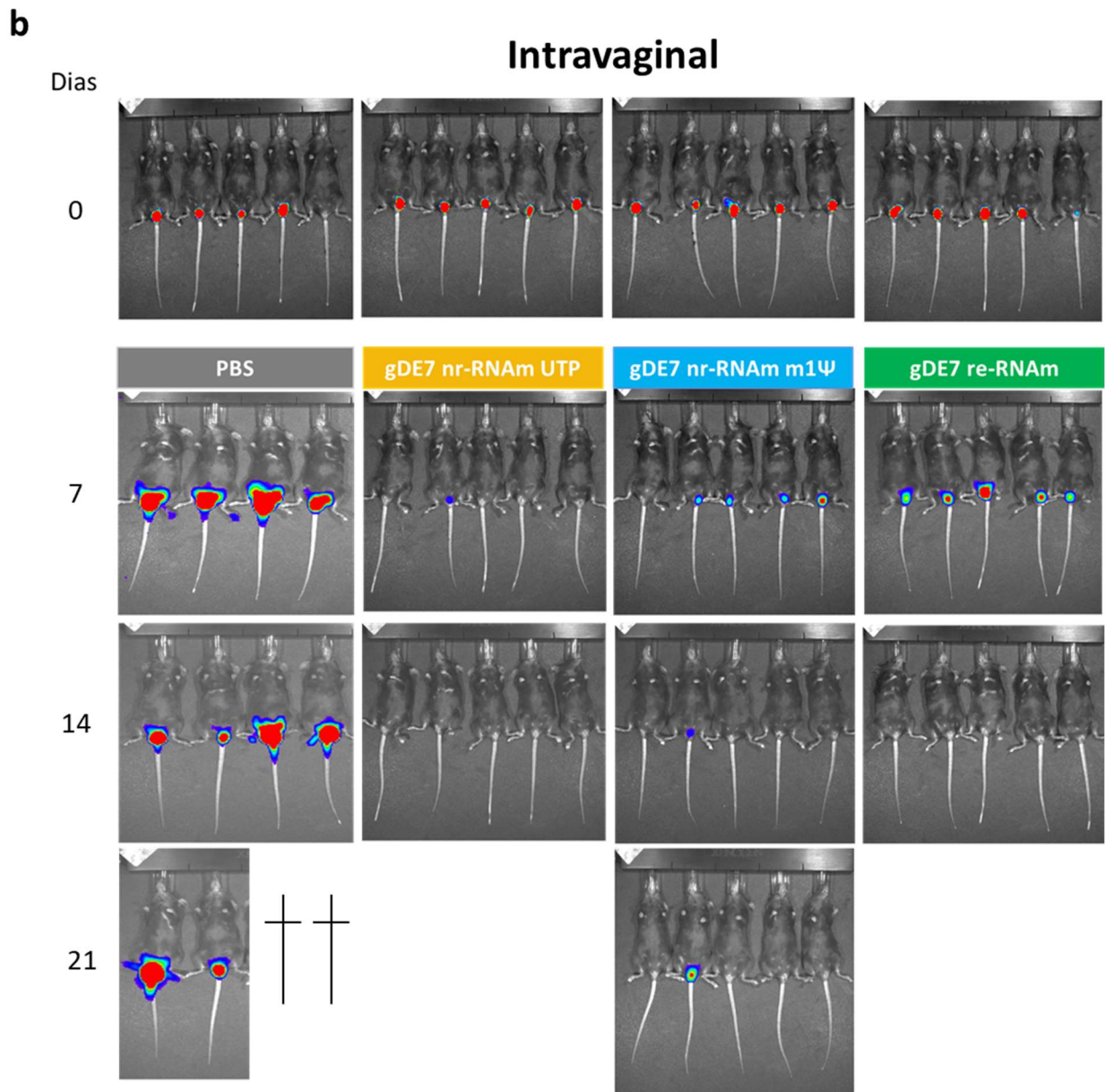
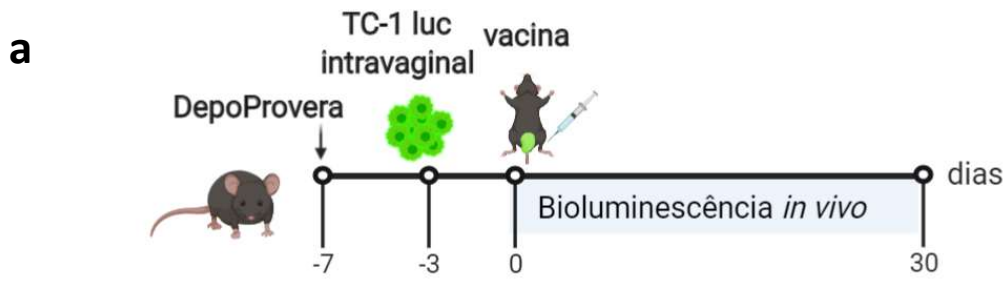
Figura 17. Imunização com baixas doses das vacinas baseadas em gDE7 RNAi-LNP induzem regressão parcial de tumores estabelecidos.

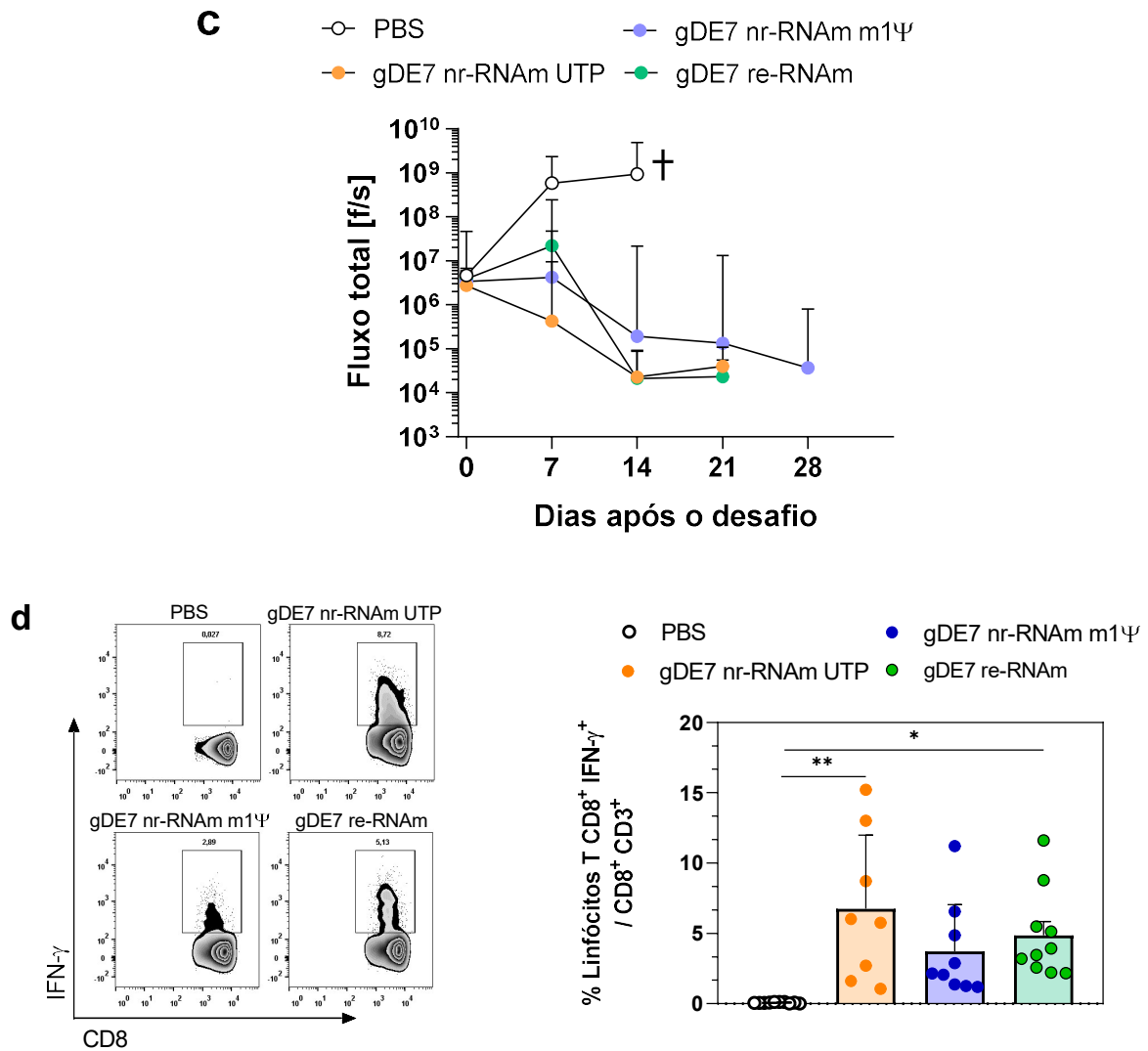
(a) Os camundongos foram desafiados com 1×10^5 células TC-1, Aproximadamente 12 dias depois, quando o tamanho médio dos tumores atingiu $\sim 12 \text{ mm}^2$, os camundongos foram imunizados (im) com diferentes doses das vacinas de RNAi não replicante (nr) não modificado (UTP) ou nucleosídeo modificado (m1Ψ) ou com o RNAi autorreplicativo (re)- RNAi que codifica a proteína gDE7, formulado com LNP. (b) Cinética de crescimento do tumor de camundongos vacinados com Luc m1Ψ nr-RNAi-LNP como um controle utilizando a dose de $5 \mu\text{g}$. (c-e) Cinética de crescimento tumoral e sobrevivência de camundongos imunizados com uma única dose de 5, 1 ou $0,1 \mu\text{g}$ de gDE7 RNAi-LNP respectivamente, pela via i.m., 12 dias após o desafio tumoral. Dados de dois experimentos independentes. A significância foi determinada usando Mantel-Cox, teste de log-rank ($n = 7-10$). *** $p < 0,001$ x grupo Luc m1Ψ nr-RNAi-LNP.

4.3 As vacinas baseadas em gDE7 RNAm-LNPs induzem proteção antitumoral em dois modelos de tumores ortotópicos

Para reproduzir, em condições experimentais, as características de tumores de colo de útero e tumores de cabeça e pescoço associados ao HPV, avaliamos a eficácia terapêutica das vacinas de gDE7 RNAm-LNPs em dois modelos ortotópicos de implantação do tumor: intravaginal e sublingual. Para os experimentos envolvendo o modelo de tumor intravaginal, os camundongos tiveram o ciclo estral sincronizado 4 dias antes da implantação das células TC-1-luc na submucosa vaginal (**Figura 18a**). Após a implantação de células TC-1-luc (intravaginal), os animais foram avaliados quanto à emissão de bioluminescência *in vivo* para monitorar a implantação do tumor. A imunização foi realizada quando a bioluminescência atingiu aproximadamente 5×10^6 f/s (**Figura 18a**). De acordo com o observado nos nossos resultados anteriores, no modelo de tumor s.c., os camundongos imunizados com as vacinas gDE7 nr-RNAm UTP ou gDE7 re-RNAm -LNP mostraram potentes efeitos antitumorais e promoveram rapidamente a regressão completa dos tumores no modelo de tumor intravaginal (**Figura 18b-c**). Nesses dois grupos, todos os camundongos se mostraram livres de tumores 14 dias após a imunização (**Figura 18b-c**). Curiosamente, a proteção antitumoral dos animais imunizados com a formulação gDE7 nr-RNAm m1 Ψ foi menor (80% de animais livres de tumores) quando comparada aos outros grupos e com os resultados obtidos para esse mesmo grupo no modelo s.c.. Além disso, o grupo controle tratado com PBS demonstrou um rápido e progressivo crescimento tumoral e sobrevida de até aproximadamente 21 dias pós tratamento (**Figura 18c**). Como esperado, os efeitos antitumorais se correlacionaram com frequências aumentadas de linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN- γ ⁺ induzidas pelas vacinas gDE7 RNAm-LNP em comparação aos camundongos do grupo controle tratados com PBS (**Figura 18d**).

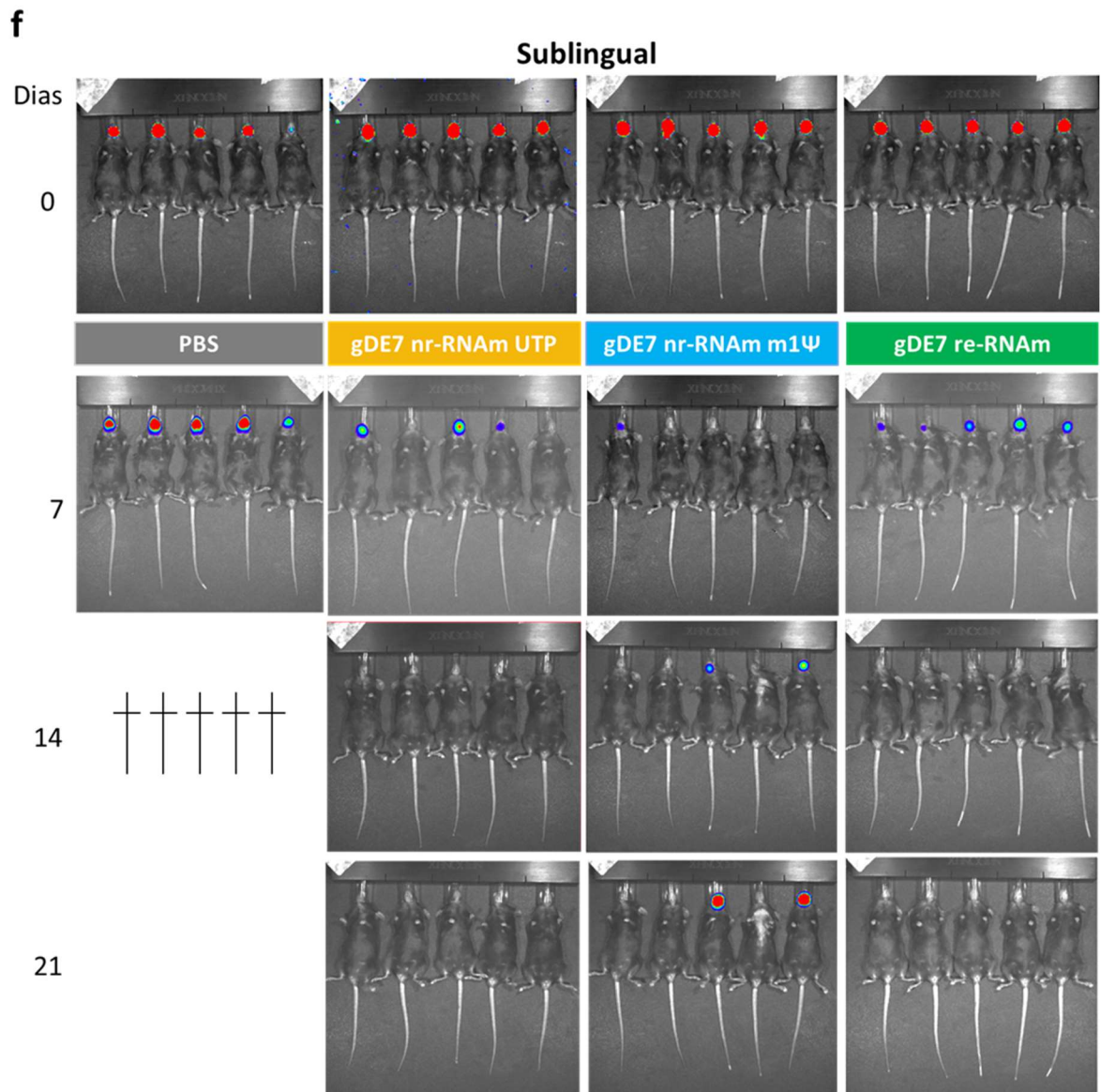
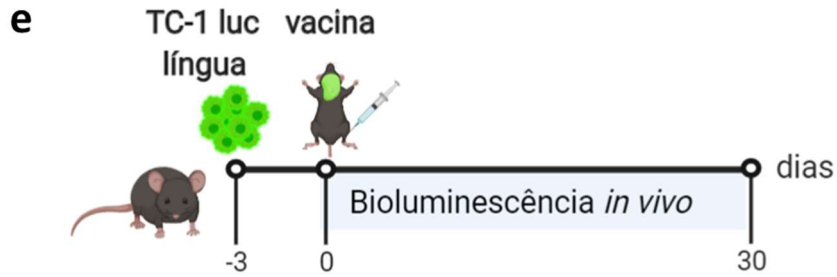
Por fim, avaliamos a proteção terapêutica no modelo sublingual, utilizando as células TC-1-luc implantadas na submucosa na base da língua (**Figura 18e**). O implante do tumor foi confirmado três dias após o desafio, a partir no monitoramento da emissão de bioluminescência *in vivo* e os grupos de animais foram divididos de forma a apresentar valores similares (aproximadamente 1×10^7 f/s) (**Figura 18e-f**).





De forma semelhante aos resultados encontrados no modelo intravaginal, poucos dias após a imunização de dose única com as formulações gDE7 nr-RNA_m UTP ou gDE7 re-RNA_m, observamos a regressão completa dos tumores em 100% dos camundongos tratados (**Figura 18f-g**). Por outro lado, os camundongos imunizados com a gDE7 nr-RNA_m m1Ψ permaneceram parcialmente protegidos, com 60% de animais livres de tumor no final do período de observação (**Figura 18 f-g**). Destaca-se que todas as vacinas avaliadas foram capazes de induzir frequências aumentadas de linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN- γ em comparação com o grupo de controle de PBS (**Figura 18h**). Tomados em conjunto, esses dados destacam as características específicas das respostas imunológicas associadas aos modelos ortotópicos e sugerem que a proteção antitumoral nesses modelos se correlaciona

não apenas ao aumento da ativação de células T CD8⁺, mas também com a infiltração eficaz dessas células T no tumor.



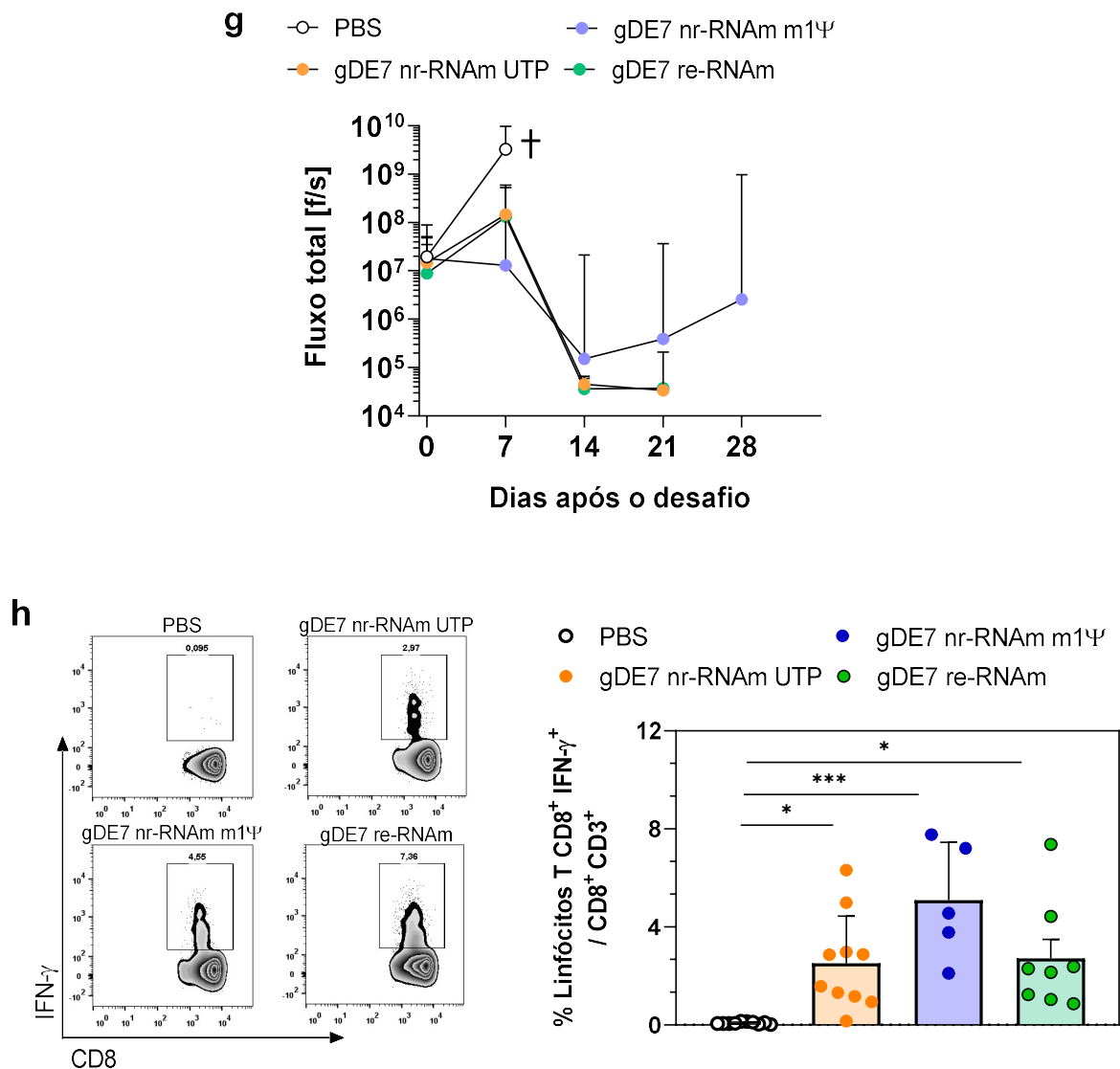


Figura 18. As vacinas baseadas em gDE7 RNA_m-LNPs induzem proteção antitumoral em dois modelos de tumores ortotópicos.

(a) Os camundongos foram inoculados com acetato de medroxiprogesterona (nome comercial DepoProvera) para sincronizar o ciclo estral dos animais e quatro dias depois os animais foram transplantados com as células tumorais TC-1-luc na parede da submucosa intravaginal. A imunização foi realizada três dias depois, quando a bioluminescência atingiu a média de 5×10^6 fótons/segundo (f/s). A imunização foi realizada pela via i.m. com uma única dose de 5 μ g de UTP ou m1Ψ nr-RNA_m-LNPs ou re-RNA_m-LNPs que codificam a gDE7. Camundongos controle foram vacinados com PBS.

(b) Imagens representativas de camundongos e (c) cinética de crescimento do tumor medida por bioluminescência *in vivo*. (d) Duas semanas após a imunização, a porcentagem de células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ foi determinada no sangue periférico dos animais após estimulação das células *in vitro* com peptídeo E7₄₉₋₅₇. (e) As células tumorais TC-1-luc transplantadas na base da língua (sublingual) e então os animais foram imunizados três dias depois com uma única dose de 5 μ g de UTP ou m1Ψ nr-RNA_m-LNPs ou re-RNA_m-LNPs que codificam a gDE7. (f) Imagens representativas de camundongos e (g) cinética de crescimento do tumor medida por bioluminescência *in vivo*. (h) Frequências de células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ no sangue periférico dos animais, duas semanas após o desafio (c;g) Cada símbolo representa a mediana da bioluminescência *in vivo* e os valores são expressos como a mediana \pm SEM. n = 10 animais por grupo. (d;h) Cada símbolo representa um animal. O símbolo † representa a eutanásia do animal. Análise estatística: ANOVA, pós-teste: Bonferroni, barras de erro são apresentadas como SEM. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Após décadas de desenvolvimento, as primeiras vacinas baseadas em RNAm receberam aprovação formal para uso em humanos (FDA, 2021a), anunciando uma nova era no desenvolvimento de vacinas. Essa modalidade de imunização, a partir da utilização de material genético na forma de RNAm, tem o potencial de ser amplamente utilizada para a geração de vacinas seguras e eficazes não só contra doenças infecciosas, mas também na terapia contra o câncer. O desenvolvimento de vacinas baseadas em RNAm está baseado em duas plataformas tecnológicas: os RNAm não replicantes (nr) e os RNAm autorreplicativos (re). Embora vários estudos tenham demonstrado que vacinas baseadas em nr- e re-RNAm sejam altamente imunogênicas e possam induzir respostas imunológicas robustas (GEALL et al., 2012; LACZKÓ et al., 2020; PARDI et al., 2017), nenhum estudo comparativo de eficácia protetora no contexto de imunoterapia para tratamento de câncer foi publicado até o momento. Neste trabalho, desenvolvemos o desenvolvimento de três vacinas terapêuticas inéditas baseadas na plataforma de RNAm formulados em LNP (produzidas com re-RNAm, ou nr-RNAm contendo UTP ou m1Ψ), e estudamos seus efeitos antitumorais em modelo pré-clínico de tumores associados ao HPV-16. Todas as formulações aqui testadas codificam para a mesma proteína quimérica gDE7 e permitem uma comparação direta do desempenho das vacinas na forma de RNAm-LNP (gDE7 nr-RNAm-UTP, gDE7 nr-RNAm-m1Ψ, e gDE7 re-RNAm) com as outras vacinas desenvolvidas previamente no nosso laboratório, baseadas no mesmo antígeno vacinal (de DNA - pgDE7h - ou de proteína recombinante - gDE7) (DINIZ et al., 2013; PORCHIA et al., 2011, 2017; SALES et al., 2017; SILVA et al., 2019).

Os resultados apresentados neste trabalho incluem uma análise comparativa e detalhada dos efeitos antitumorais e imunológicos promovidos pelas três vacinas propostas. Como um diferencial, demonstramos uma potente ativação de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos com capacidade citotóxica, e de linfócitos T CD8⁺ produtores de citocinas com uma única dose vacinal. A ativação de respostas celulares se correlacionou com a imunidade protetora antitumoral, conforme demonstrado pela regressão completa de tumores em diferentes estágios de desenvolvimento e localizados em sítios anatômicos distintos (dorsal, língua e vagina). Destaca-se que as vacinas foram capazes de promover a expansão de células T de memória, o que

resultou em proteção em longo prazo contra recidivas tumorais entre os camundongos vacinados. Em conjunto, nossos dados evidenciam o potencial deste novo tipo de vacina como estratégia imunoterapêutica contra tumores induzidos por HPV.

Para caracterizar as vacinas aqui desenvolvidas, inicialmente, comparamos a capacidade de tradução dos diferentes tipos de RNAm, gerados por IVT e purificados com celulose, em ensaios de transfecção de células *in vitro*. Como esperado, altas quantidades de proteína foram produzidas por todas as formulações de RNAm nas células HEK 293T. Por outro lado, observamos diferenças marcantes na capacidade de tradução dos RNAm em mo-DC primárias, células que expressam diversos receptores de detecção de RNA exógeno (ALEXOPOULOU et al., 2001; SEN; SARKAR, 2005). A purificação dos RNAm por colunas de celulose foi capaz de remover os contaminantes de dsRNA gerados pela IVT (BAIERSDÖRFER et al., 2019b), mas não suprimiu as propriedades inflamatórias dos intermediários de dsRNA produzidos durante a replicação intracelular do re-RNAm (ALEXOPOULOU et al., 2001). Além disso, os RNAm sintetizados com o nucleosídeo UTP são naturalmente inflamatórios por ativar receptores do tipo Toll (do inglês *Toll-like receptors*) 7 e 8 (TANJI et al., 2015; ZHANG et al., 2016). A combinação desses fatores pode afetar negativamente a eficiência da tradução de RNAm especialmente em DCs. De fato, camundongos imunizados com re-RNAm pela via i.d. apresentaram uma baixa expressão do antígeno de interesse, visto que essa via privilegia a transfecção de DCs presente na derme (HUYSMANS et al., 2019). Uma alternativa para sanar esse efeito biológico é a alteração da molécula de re-RNAm por mutações genéticas com a finalidade de evitar as vias de sinalização de IFN do tipo I. De fato, essas mutações se mostraram capazes de suprimir as respostas inflamatórias desencadeadas pelos re-RNAm e aumentar a expressão do antígeno de interesse (SIMMONS et al., 2009).

Como já mencionado anteriormente, os RNAs modificados por incorporação de nucleosídeos apresentam uma vantagem em relação aos outros, porque suprimem a resposta inflamatória da molécula em DCs, garantindo uma maior estabilidade biológica e aumento da expressão do antígeno de interesse (KARIKÓ et al., 2008, 2012). Em nosso estudo, os nr-RNAm m1Ψ mostraram uma capacidade de tradução superior às outras formulações, quando testadas em células primárias *in vitro*, mas a imunização pela via i.m. com nr-RNAm-LNP m1Ψ induziu efeitos *in vivo* semelhantes com a sensibilização (*prime*) eficiente de linfócitos T CD8⁺, quando comparados aos resultados alcançados pelas vacinas re-RNAm-LNP ou nr-RNAm-LNP UTP. Sendo

assim, esses resultados sugerem que os efeitos inflamatórios induzidos por RNAm dependem de vários aspectos, como via de administração e os tipos de células transfectadas e apenas a quantidade de tradução da proteína *in vitro* não reflete necessariamente a eficácia da vacina *in vivo*. Os resultados a serem obtidos em ensaios clínicos em andamento utilizando estratégias baseadas em re-RNAm (NCT05037097, NCT04668339, NCT05012943) ou nr-RNAm UTP (NCT04652102, NCT04848467) serão fundamentais para entender o benefício clínico da resposta inflamatória inata desencadeada por essa molécula, na geração de uma imunidade protetora, bem como para avaliar a toxicidade *in vivo* dessa estratégia.

O tratamento eficaz de tumores induzidos por HPV, utilizando o modelo de células TC-1 implantados por via s.c., foi demonstrado anteriormente com vacinas baseadas em nr-RNAm (U- ou m1Ψ) que codificam o antígeno E7 (BIALKOWSKI et al., 2016; GRUNWITZ et al., 2019; KRANZ et al., 2016; VAN LINT et al., 2012). Entretanto a regressão completa de tumores só foi alcançada após a imunização com múltiplas doses, com concentrações de RNAm mais altas (três ou mais doses de 15 µg ou 40 µg por animal) e / ou em combinação com quimioterapia ou inibidores de *checkpoint* (BIALKOWSKI et al., 2016; GRUNWITZ et al., 2019; KRANZ et al., 2016; MIAO et al., 2019; TSE et al., 2021). Além disso, ao contrário do que foi observado em estudos com vacinas que utilizam a gDE7, seja com proteína purificada (PORCHIA et al., 2011, 2017) ou DNA plasmidial (AVILA et al., 2016; DINIZ et al., 2013, 2016; MORENO et al., 2018; RAMOS DA SILVA et al., 2021; SALES et al., 2017), as vacinas de RNAm-LNP demonstraram efeitos antitumorais superiores e indução de proteção antitumoral completa em camundongos imunizados com uma única dose, em baixa concentração, e sem necessidade adicional de adjuvante. Essas diferenças destacam ainda mais a potencialidade das vacinas de RNAm-LNP gDE7 sobre as plataformas vacinais previamente testadas em condições pré-clínicas (BIALKOWSKI et al., 2016; GRUNWITZ et al., 2019; KRANZ et al., 2016; MIAO et al., 2019; RAMOS DA SILVA et al., 2021; SALES et al., 2017; SILVA et al., 2021; TSE et al., 2021). A superioridade dos efeitos antitumorais observados nas vacinas baseadas em RNAm-LNP pode ser resultado de diferenças na síntese, produção e otimização de RNAm, do método de entrega *in vivo* baseado em LNP, dos efeitos adjuvantes da gD ou, mais provavelmente, a combinação desses fatores.

Embora os tratamentos clínicos contra o câncer ou lesões induzidas por HPV, (cirurgia, radioterapia, quimioterapia à base de cisplatina, associação com anticorpos

monoclonais ou uma combinação dessas modalidades de tratamento) demonstrem resultados promissores no controle da progressão tumoral, ainda é comum, após o tratamento, o surgimento de recidivas ou resistência (FAKHR; MODIC; CID-ARREGUI, 2021; HILL, 2020). De fato, a recorrência do tumor com focos de metástase representa um desafio frequente à clínica médica (PITT et al., 2016; RANDALL et al., 2021). Dessa forma, nossos achados são encorajadores, uma vez que todas as três vacinas de RNAm-LNP baseadas na gDE7 induziram uma forte infiltração intratumoral de células T CD8⁺ E7-específicas com fenótipo de linfócitos T de memória efetora, após o redesafio tumoral. Sendo assim, esses resultados indicam o desenvolvimento de uma imunidade antitumoral de longo prazo envolvida na proteção contra recidivas tumorais. Esses achados corroboram os resultados encontrados por outros grupos com vacinas baseadas em RNAm contra o câncer induzido por HPV em condições pré-clínicas (BIALKOWSKI et al., 2016; GRUNWITZ et al., 2019). Particularmente, os resultados de menor proteção após o redesafio observados em camundongos imunizados com a formulação nr-RNAm-LNP UTP podem ser atribuídos a uma menor ativação de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos, um menor número de linfócitos que se infiltram no tumor dos animais desse grupo, e pelo fenótipo das células de memória infiltrantes no tumor desses animais (% de linfócitos infiltrantes no tumor: TCM > MPECs no grupo nr-RNAm-LNP UTP) em relação aos outros grupos de imunização (TCM < MPECs nos grupos nr-RNAm-LNP m1Ψ ou re-RNAm-LNP).

Buscamos também, investigar os mecanismos de imunidade celular induzidos pelas vacinas de RNAm-LNP em camundongos CD8 ou CD4 KO. Como esperado, a proteção antitumoral induzida pelas vacinas foi completamente perdida em camundongos CD8 KO, demonstrando o papel crucial dessas células na imunidade antitumoral. Curiosamente, nossos achados demonstraram que a proteção antitumoral também foi parcialmente dependente das respostas das células T CD4⁺. Em contrapartida, estudos anteriores do nosso grupo demonstraram que as respostas antitumorais em camundongos imunizados com gDE7, baseados em DNA ou proteína purificada, eram exclusivamente dependentes de células T CD8⁺ (PORCHIA et al., 2017; RAMOS DA SILVA et al., 2021). Esses resultados destacam diferenças nos mecanismos de ativação imunológica das vacinas baseadas em DNA, proteína ou RNAm. Outros estudos também demonstraram que as vacinas de RNAm são capazes de promover a ativação não só de linfócitos T CD8⁺, mas também de células T CD4⁺ a partir da apresentação de antígenos via MHC de classe I ou MHC de classe II,

respectivamente (HEINE; JURANEK; BROSSART, 2021). De fato, o desencadeamento de resposta imunológica mista, composta pela ativação de linfócitos T CD8⁺ e T CD4⁺, tem sido utilizado como indicativo de eficácia de vacinas terapêuticas em ensaios clínicos (KOMDEUR et al., 2021; WELTERS et al., 2008). Esse fenômeno é correlacionado ao controle mais eficiente da progressão de tumores e com prognóstico positivo entre pacientes com câncer cervical avançado ou outras doenças malignas associadas ao HPV (NORDFORS et al., 2013; SANIF; NURWANY, 2019). Coletivamente, esses achados evidenciam o potencial dessa modalidade vacinal para uso terapêutico em condições clínicas.

Nesse estudo, todas as três plataformas de RNAm-LNP foram capazes de promover potentes efeitos antitumorais com pequenas diferenças de acordo com a localização anatômica do tumor. Tumores de mucosa representam um desafio adicional na eficácia das imunoterapias devido às dificuldades de infiltração adequada de linfócitos nesses sítios (BIALKOWSKI et al., 2016). Camundongos imunizados com nr-RNAm-LNP UTP e re-RNAm-LNP mostraram uma maior expansão de células T residentes de memória infiltrantes no tumor, o que tem sido associado com o aumento da proteção induzida frente a tumores de mucosa (NIZARD et al., 2017). Isso pode ter contribuído para a proteção completa dos tumores localizados na mucosa obtido apenas com as vacinas de RNAm-LNP não modificadas (nr-RNAm-LNP UTP e re-RNAm-LNP). Dessa forma, isso demonstra que, diferente dos tumores s.c., a proteção antitumoral para esses sítios anatômicos pode não estar apenas relacionada à ativação de linfócitos T CD8⁺, mas também a outros mecanismos imunológicos modulados pela presença de nucleosídeos não modificados. Como mencionado anteriormente, as vacinas de RNAm contendo UTP são capazes de induzir uma forte resposta de IFN do tipo I, o que pode ser benéfico para a indução de imunidade contra tumores (KRANZ et al., 2016; POLLARD et al., 2013). Por exemplo, a forte resposta inflamatória, mediada por mecanismos da imunidade inata, pode promover a ativação das células NK (GUAN et al., 2014; MIZUTANI et al., 2012), bem como de outros mediadores imunológicos que desempenham papel importante na imunidade da mucosa contra tumores. Outros trabalhos revelaram que os re-RNAm regulam positivamente a expressão de vários genes relacionados com resposta imune inata (DE ALWIS et al., 2021) e apresentam propriedades adjuvantes em mucosas (THOMPSON et al., 2006). Estudos adicionais são necessários para investigar a correlação entre a capacidade das vacinas de RNAm sintetizada com UTP de ativar

mecanismos da resposta inata e a imunidade protetora de tumores localizados em mucosa.

Neste estudo, conduzimos a primeira comparação de três vacinas baseadas em RNAm-LNP que codificam o mesmo antígeno alvo contra tumores induzidos por HPV. Em comparação com a vacina baseada em nr-RNAm-LNP UTP, as vacinas re-RNAm-LNP e nr-RNAm-LNP m1Ψ foram capazes de induzir uma maior ativação de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos no modelo de tumores s.c. Apesar da vacina nr-RNAm-LNP UTP promover baixas respostas de ativação de células T CD8⁺, os efeitos terapêuticos protetores observados foram similares aos obtidos com outras as formulações testadas. Esses achados sugerem que a magnitude da resposta imune alcançada por todas as vacinas foi suficiente para promover a proteção completa de tumores implantados s.c. Além disso, a diminuição da dose de 30 µg para 5 µg não afetou a proteção antitumoral, mas quando utilizamos a dose na faixa de ng observamos a redução da porcentagem de animais livres de tumores, mesmo para a vacina re-RNAm-LNP, que em geral requer baixas doses para imunização (DE ALWIS et al., 2021; VOGEL et al., 2018b). Em resumo, nossos resultados destacam as diferenças e particularidades imunológicas de cada uma das vacinas de RNAm-LNP de uma forma inédita e que abrem perspectivas promissoras para o tratamento clínico de tumores induzidos por HPV localizados em diferentes sítios anatômicos.

6 CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Em conclusão, as vacinas baseadas em RNAm representam uma plataforma tecnológica inovadora para o desenvolvimento de vacinas seguras e eficazes para seres humanos, conforme demonstrado pelo desempenho das vacinas de RNAm COVID-19. Até onde sabemos, o presente estudo é o primeiro que compara a imunogenicidade e eficácia terapêutica de três vacinas de RNAm usando nr-RNAm (UTP ou m¹Ψ) e re-RNAm que codificam para o mesmo antígeno-alvo, e o primeiro a desenvolver uma vacina de re-RNAm para tratamento de tumores. Nossos resultados destacam aspectos relevantes da imunogenicidade e da capacidade de indução de imunidade antitumoral das diferentes vacinas baseadas em RNAm-LNP contra o câncer e subsidiam o desenvolvimento de vacinas contra tumores associados ao HPV.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

ABU BAKAR, Farhana; NG, Lisa. Nonstructural Proteins of Alphavirus—Potential Targets for Drug Development. **Viruses**, [S. l.], v. 10, n. 2, p. 71, 2018. DOI: 10.3390/v10020071. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1999-4915/10/2/71>.

AJBANI, Seema P.; VELHAL, Shilpa M.; KADAM, Ravindra B.; PATEL, Vainav V.; BANDIVDEKAR, Atmaram H. Immunogenicity of Semliki Forest virus based self-amplifying RNA expressing Indian HIV-1C genes in mice. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 81, p. 794–802, 2015. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2015.09.010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.09.010>.

AKINC, Akin et al. The Onpattro story and the clinical translation of nanomedicines containing nucleic acid-based drugs. **Nature Nanotechnology**, [S. l.], v. 14, n. 12, p. 1084–1087, 2019. DOI: 10.1038/s41565-019-0591-y. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41565-019-0591-y>.

ALEXOPOULOU, Lena; HOLT, Agnieszka Czopik; MEDZHITOV, Ruslan; FLAVELL, Richard A. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. **Nature**, [S. l.], v. 413, n. 6857, p. 732–738, 2001. DOI: 10.1038/35099560. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/35099560>.

ANDERSON, Bart R.; MURAMATSU, Hiromi; NALLAGATLA, Subba R.; BEVILACQUA, Philip C.; SANSING, Lauren H.; WEISSMAN, Drew; KARIKÓ, Katalin. Incorporation of pseudouridine into mRNA enhances translation by diminishing PKAnderson, B. R., Muramatsu, H., Nallagatla, S. R., Bevilacqua, P. C., Sansing, L. H., Weissman, D., & Karikó, K. (2010). Incorporation of pseudouridine into mRNA enhances trans. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 38, n. 17, p. 5884–5892, 2010. DOI: 10.1093/nar/gkq347.

APS, Luana R. M. M.; DINIZ, Mariana O.; PORCHIA, Bruna F. M. M.; SALES, Natiely S.; MORENO, Ana Carolina R.; FERREIRA, Luís C. S. Bacillus subtilis spores as adjuvants for DNA vaccines. **Vaccine**, [S. l.], v. 33, n. 20, p. 2328–34, 2015. DOI: 10.1016/j.vaccine.2015.03.043. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25819710>. Acesso em: 4 jun. 2016.

AVILA, L. A. et al. Gene delivery and immunomodulatory effects of plasmid DNA associated with Branched Amphiphilic Peptide Capsules. **Journal of Controlled Release**, [S. l.], v. 241, p. 15–24, 2016. DOI: 10.1016/j.jconrel.2016.08.042. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016836591630640X>.

BADEN, Lindsey R. et al. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 384, n. 5, p. 403–416, 2021. DOI: 10.1056/NEJMoa2035389. Disponível em: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa2035389>.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2021

- BAIERSDÖRFER, Markus; BOROS, Gábor; MURAMATSU, Hiromi; MAHINY, Azita; VLATKOVIC, Irena; SAHIN, Ugur; KARIKÓ, Katalin. A Facile Method for the Removal of dsRNA Contaminant from In Vitro-Transcribed mRNA. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, [S. l.], v. 15, n. April, p. 26–35, 2019. a. DOI: 10.1016/j.omtn.2019.02.018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.02.018>.
- BAIERSDÖRFER, Markus; BOROS, Gábor; MURAMATSU, Hiromi; MAHINY, Azita; VLATKOVIC, Irena; SAHIN, Ugur; KARIKÓ, Katalin. A Facile Method for the Removal of dsRNA Contaminant from In Vitro-Transcribed mRNA. **Molecular therapy. Nucleic acids**, [S. l.], v. 15, p. 26–35, 2019. b. DOI: 10.1016/j.omtn.2019.02.018. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30933724>.
- BEUCKELAER, Ans De; GROOTEN, Johan; KOKER, Stefaan De. Type I Interferons Modulate CD8 + T Cell Immunity to mRNA Vaccines. **Trends in Molecular Medicine**, [S. l.], v. 23, n. 3, p. 216–226, 2017. DOI: 10.1016/j.molmed.2017.01.006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2017.01.006>.
- BIALKOWSKI, Lukasz et al. Intralymphatic mRNA vaccine induces CD8 T-cell responses that inhibit the growth of mucosally located tumours. **Scientific reports**, [S. l.], v. 6, n. November 2015, p. 22509, 2016. DOI: 10.1038/srep22509. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26931556>.
- BLAKNEY, Anna K.; IP, Shell; GEALL, Andrew J. An Update on Self-Amplifying mRNA Vaccine Development. **Vaccines**, [S. l.], v. 9, n. 2, 2021. DOI: 10.3390/vaccines9020097. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33525396>.
- BOGERS, Willy M. et al. Potent Immune Responses in Rhesus Macaques Induced by Nonviral Delivery of a Self-amplifying RNA Vaccine Expressing HIV Type 1 Envelope With a Cationic Nanoemulsion. [S. l.], v. 211, p. 947–955, 2015. DOI: 10.1093/infdis/jiu522.
- BRITO, Luis A. et al. A cationic nanoemulsion for the delivery of next-generation RNA vaccines. **Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy**, [S. l.], v. 22, n. 12, p. 2118–29, 2014. a. DOI: 10.1038/mt.2014.133. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4429691&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- BRITO, Luis A. et al. A Cationic Nanoemulsion for the Delivery of Next-generation RNA Vaccines. **Molecular Therapy**, [S. l.], v. 22, n. 12, p. 2118–2129, 2014. b. DOI: 10.1038/mt.2014.133. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25027661>. Acesso em: 5 set. 2018.
- BROMBERG, J. F.; HORVATH, C. M.; WEN, Z.; SCHREIBER, R. D.; DARNELL, J. E. Transcriptionally active Stat1 is required for the antiproliferative effects of both interferon alpha and interferon gamma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 93, n. 15, p. 7673–8, 1996. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8755534>. Acesso em: 7 set. 2018.
- BROOS, Katrijn et al. Particle-mediated Intravenous Delivery of Antigen mRNA

- Results in Strong Antigen-specific T-cell Responses Despite the Induction of Type I Interferon. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, [S. l.], v. 5, p. e326, 2016. DOI: 10.1038/mtna.2016.38. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2162253117300525>.
- BURD, Eileen M. Human Papillomavirus and Cervical Cancer. **Clinical Microbiology Reviews**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 1–17, 2003. DOI: 10.1128/CMR.16.1.1-17.2003. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.16.1.1-17.2003>.
- CANTARA, W. A.; CRAIN, P. F.; ROZENSKI, J.; MCCLOSKEY, J. A.; HARRIS, K. A.; ZHANG, X.; VENDEIX, F. A. P.; FABRIS, D.; AGRIS, P. F. The RNA modification database, RNAMDB: 2011 update. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 39, n. Database, p. D195–D201, 2011. DOI: 10.1093/nar/gkq1028. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkq1028>.
- CAPUT, D.; BEUTLER, B.; HARTOG, K.; THAYER, R.; BROWN-SHIMER, S.; CERAMI, A. Identification of a common nucleotide sequence in the 3'-untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 83, n. 6, p. 1670–4, 1986. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2419912>. Acesso em: 4 set. 2018.
- CHENG, Liqin; WANG, Yan; DU, Juan. Human Papillomavirus Vaccines: An Updated Review. **Vaccines**, [S. l.], v. 8, n. 3, p. 391, 2020. DOI: 10.3390/vaccines8030391. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-393X/8/3/391>.
- CHEUNG, T. C. et al. Unconventional ligand activation of herpesvirus entry mediator signals cell survival. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 106, n. 15, p. 6244–6249, 2009. DOI: 10.1073/pnas.0902115106. Disponível em: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0902115106>.
- COMPAAN, Deanne M.; GONZALEZ, Lino C.; TOM, Irene; LOYET, Kelly M.; EATON, Dan; HYMOWITZ, Sarah G. Attenuating lymphocyte activity: the crystal structure of the BTLA-HVEM complex. **The Journal of biological chemistry**, [S. l.], v. 280, n. 47, p. 39553–61, 2005. DOI: 10.1074/jbc.M507629200. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16169851>. Acesso em: 8 ago. 2016.
- CU, Yen et al. Enhanced Delivery and Potency of Self-Amplifying mRNA Vaccines by Electroporation in Situ. **Vaccines**, [S. l.], v. 1, n. 3, p. 367–383, 2013. DOI: 10.3390/vaccines1030367. Disponível em: <http://www.mdpi.com/2076-393X/1/3/367>.
- CURTSINGER, Julie M.; VALENZUELA, Javier O.; AGARWAL, Pujya; LINS, Debra; MESCHER, Matthew F. Type I IFNs provide a third signal to CD8 T cells to stimulate clonal expansion and differentiation. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, [S. l.], v. 174, n. 8, p. 4465–9, 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15814665>. Acesso em: 7 set. 2018.
- DAEMEN, Toos; RIEZEBOS-BRILMAN, Annelies; BUNGENER, Laura; REGTS, Joke; DONTJE, Bert; WILSCHUT, Jan. Eradication of established HPV16-transformed tumours after immunisation with recombinant Semliki Forest virus expressing a fusion protein of E6 and E7. **Vaccine**, [S. l.], v. 21, n. 11–12, p. 1082–1088, 2003. DOI: 10.1016/S0264-410X(02)00558-3. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X02005583>.

- DE ALWIS, Ruklanthi et al. A single dose of self-transcribing and replicating RNA-based SARS-CoV-2 vaccine produces protective adaptive immunity in mice. **Molecular Therapy**, [S. l.], v. 29, n. 6, p. 1970–1983, 2021. DOI: 10.1016/j.ymthe.2021.04.001. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S152500162100188X>.
- DE BEUCKELAER, Ans; GROOTEN, Johan; DE KOKER, Stefaan. Type I Interferons Modulate CD8+T Cell Immunity to mRNA Vaccines. **Trends in Molecular Medicine**, [S. l.], v. 23, n. 3, p. 216–226, 2017. DOI: 10.1016/j.molmed.2017.01.006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2017.01.006>.
- DE MARTEL, Catherine; GEORGES, Damien; BRAY, Freddie; FERLAY, Jacques; CLIFFORD, Gary M. Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. **The Lancet Global Health**, [S. l.], v. 8, n. 2, p. e180–e190, 2020. DOI: 10.1016/S2214-109X(19)30488-7.
- DINIZ, M. O.; LASARO, M. O.; ERTL, H. C.; FERREIRA, L. C. S. Immune Responses and Therapeutic Antitumor Effects of an Experimental DNA Vaccine Encoding Human Papillomavirus Type 16 Oncoproteins Genetically Fused to Herpesvirus Glycoprotein D. **Clinical and Vaccine Immunology**, [S. l.], v. 17, n. 10, p. 1576–1583, 2010. DOI: 10.1128/CVI.00264-10. Disponível em: <http://cvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/CVI.00264-10>.
- DINIZ, Mariana O.; CARIRI, Francisco A. M. O.; APS, Luana R. M. M.; FERREIRA, Luís C. S. Enhanced Therapeutic Effects Conferred by an Experimental DNA Vaccine Targeting Human Papillomavirus-Induced Tumors. **Human Gene Therapy**, [S. l.], v. 24, n. 10, p. 861–870, 2013. DOI: 10.1089/hum.2013.102. Disponível em: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/hum.2013.102>.
- DINIZ, Mariana O.; SALES, Natiely S.; SILVA, Jamile R.; FERREIRA, Luís Carlos S. Protection against HPV-16-Associated Tumors Requires the Activation of CD8+ Effector Memory T Cells and the Control of Myeloid-Derived Suppressor Cells. **Molecular cancer therapeutics**, [S. l.], v. 15, n. 8, p. 1920–30, 2016. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-15-0742. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27222537>. Acesso em: 8 ago. 2016.
- DYSON, N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. **Genes & Development**, [S. l.], v. 12, n. 15, p. 2245–2262, 1998. DOI: 10.1101/gad.12.15.2245. Disponível em: <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.12.15.2245>.
- EDWARDS, Darin K.; JASNY, Edith; YOON, Heesik; HORSCROFT, Nigel; SCHANEN, Brian; GETER, Tanya; FOTIN-MLECZEK, Mariola; PETSCH, Benjamin; WITTMAN, Vaughan. Adjuvant effects of a sequence-engineered mRNA vaccine: translational profiling demonstrates similar human and murine innate response. **Journal of Translational Medicine**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 1, 2017. DOI: 10.1186/s12967-016-1111-6. Disponível em: <http://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12967-016-1111-6>.
- FAKHR, Elham; MODIC, Živa; CID-ARREGUI, Angel. Recent developments in immunotherapy of cancers caused by human papillomaviruses. **Immunology**, [S. l.], v. 163, n. 1, p. 33–45, 2021. DOI: 10.1111/imm.13285.
- FDA. **U.S. Food and Drug administration**. 2021a. Disponível em:

<https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-covid-19-vaccine>. Acesso em: 23 set. 2021.

FDA. **FDA In Brief: FDA Authorizes Longer Time for Refrigerator Storage of Thawed Pfizer-BioNTech COVID-19 Vaccine Prior to Dilution, Making Vaccine More Widely Available**. 2021b. Disponível em: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-brief-fda-authorizes-longer-time-refrigerator-storage-thawed-pfizer-biontech-covid-19-vaccine>. Acesso em: 22 out. 2021.

FOTIN-MLECZEK, Mariola; DUCHARDT, Katharina M.; LORENZ, Christina; PFEIFFER, Regina; OJKIĆ-ZRNA, Sanja; PROBST, Jochen; KALLEN, Karl-Josef. Messenger RNA-based Vaccines With Dual Activity Induce Balanced TLR-7 Dependent Adaptive Immune Responses and Provide Antitumor Activity. **Journal of Immunotherapy**, [S. l.], v. 34, n. 1, p. 1–15, 2011. DOI: 10.1097/CJI.0b013e3181f7dbe8. Disponível em: <https://journals.lww.com/00002371-201101000-00001>.

FOTIN-MLECZEK, Mariola; ZANZINGER, Kai; HEIDENREICH, Regina; LORENZ, Christina; THESS, Andreas; DUCHARDT, Katharina M.; KALLEN, Karl-Josef. Highly potent mRNA based cancer vaccines represent an attractive platform for combination therapies supporting an improved therapeutic effect. **The Journal of Gene Medicine**, [S. l.], v. 14, n. 6, p. 428–439, 2012. DOI: 10.1002/jgm.2605. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jgm.2605>.

FREYN, Alec W. et al. A Multi-Targeting, Nucleoside-Modified mRNA Influenza Virus Vaccine Provides Broad Protection in Mice. **Molecular Therapy**, [S. l.], v. 28, n. 7, p. 1569–1584, 2020. DOI: 10.1016/j.ymthe.2020.04.018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.04.018>.

GADDUCCI, Angiolo; TANA, Roberta; COSIO, Stefania; CIONINI, Luca. Treatment options in recurrent cervical cancer (Review). [S. l.], p. 3–11, 2010. DOI: 10.3892/ol.

GALLIE, Daniel R.; TANGUAY, Robert L.; LEATHERS, Valerie. **The tobacco etch viral 5' leader and poly(A) tail are functionally synergistic regulators of translationGene**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: https://ac.els-cdn.com/0378111995005217/1-s2.0-0378111995005217-main.pdf?_tid=169ccb78-876d-4410-9abe-9c2d5b9e4836&acdnat=1536070931_ba58feac70084d5a96fc805d72bb83c6. Acesso em: 4 set. 2018.

GEALL, Andrew J. et al. Nonviral delivery of self-amplifying RNA vaccines. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 109, n. 36, p. 14604–9, 2012. DOI: 10.1073/pnas.1209367109. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3437863&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

GEALL, Andrew J.; MANDL, Christian W.; ULMER, Jeffrey B. RNA: the new revolution in nucleic acid vaccines. **Seminars in immunology**, [S. l.], v. 25, n. 2, p. 152–9, 2013. DOI: 10.1016/j.smim.2013.05.001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23735226>.

GIMENO, R.; LEE, C. K.; SCHINDLER, C.; LEVY, D. E. Stat1 and Stat2 but Not Stat3

Arbitrate Contradictory Growth Signals Elicited by Alpha/Beta Interferon in T Lymphocytes. **Molecular and Cellular Biology**, [S. l.], v. 25, n. 13, p. 5456–5465, 2005. DOI: 10.1128/MCB.25.13.5456-5465.2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15964802>. Acesso em: 7 set. 2018.

GRUNWITZ, Christian; SALOMON, Nadja; VASCOTTO, Fulvia; SELMI, Abderaouf; BUKUR, Thomas; DIKEN, Mustafa; KREITER, Sebastian; TÜRECI, Özlem; SAHIN, Ugur. HPV16 RNA-LPX vaccine mediates complete regression of aggressively growing HPV-positive mouse tumors and establishes protective T cell memory. **Oncolmmunology**, [S. l.], v. 8, n. 9, p. 1–11, 2019. DOI: 10.1080/2162402X.2019.1629259. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/2162402X.2019.1629259>.

GUAN, Jean; MIAH, S. M. Shahjahan; WILSON, Zachary S.; ERICK, Timothy K.; BANH, Cindy; BROSSAY, Laurent. Role of type I interferon receptor signaling on NK cell development and functions. **PloS one**, [S. l.], v. 9, n. 10, p. e111302, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0111302.

HAJJ, Khalid A.; WHITEHEAD, Kathryn A. Tools for translation: non-viral materials for therapeutic mRNA delivery. **Nature Reviews Materials**, [S. l.], v. 2, n. 10, p. 17056, 2017. DOI: 10.1038/natrevmats.2017.56. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/natrevmats201756>.

HAUSEN HZ. Papillomavirus infections — a major cause of human cancers. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, [S. l.], v. 1288, n. 2, p. F55–F78, 1996. DOI: 10.1016/0304-419X(96)00020-0.

HAUSEN, Harald Zur. Papillomavirus infections — a major cause of human cancers. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, [S. l.], v. 1288, n. 2, p. F55–F78, 1996. DOI: 10.1016/0304-419X(96)00020-0. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0304419X96000200>.

HEIL, F.; HEMMI, Hiroaki; HOCHREIN, Hubertus; AMPENBERGER, Franziska; KIRSCHNING, Carsten; AKIRA, Shizuo; LIPFORD, Grayson; WAGNER, Hermann; BAUER, Stefan. Species-Specific Recognition of Single-Stranded RNA via Toll-like Receptor 7 and 8. **Science**, [S. l.], v. 303, n. 5663, p. 1526–1529, 2004. DOI: 10.1126/science.1093620. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14976262>. Acesso em: 7 set. 2018.

HEINE, Annkristin; JURANEK, Stefan; BROSSART, Peter. Clinical and immunological effects of mRNA vaccines in malignant diseases. **Molecular Cancer**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 52, 2021. DOI: 10.1186/s12943-021-01339-1. Disponível em: <https://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12943-021-01339-1>.

HEKELE, Armin et al. Rapidly produced SAM® vaccine against H7N9 influenza is immunogenic in mice. **Emerging Microbes & Infections**, [S. l.], v. 2, n. 8, p. e52, 2013. DOI: 10.1038/emi.2013.54.

HILL, EMILY K. Updates in Cervical Cancer Treatment. **Clinical Obstetrics & Gynecology**, [S. l.], v. 63, n. 1, p. 3–11, 2020. DOI: 10.1097/GRF.0000000000000507.

HOU, Xucheng; ZAKS, Tal; LANGER, Robert; DONG, Yizhou. Lipid nanoparticles for mRNA delivery. **Nature Reviews Materials**, [S. l.], 2021. DOI: 10.1038/s41578-021-00358-0. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41578-021-00358-0>.

- HUYSMANS, Hanne et al. Expression Kinetics and Innate Immune Response after Electroporation and LNP-Mediated Delivery of a Self-Amplifying mRNA in the Skin. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, [S. l.], v. 17, n. 20, p. 867–878, 2019. DOI: 10.1016/j.omtn.2019.08.001. Disponível em: <http://jvi.asm.org/>. Acesso em: 29 mar. 2020.
- IAVARONE, Carlo; O'HAGAN, Derek T.; YU, Dong; DELAHAYE, Nicolas F.; ULMER, Jeffrey B. Expert Review of Vaccines Mechanism of action of mRNA-based vaccines. **Expert Review of Vaccines**, [S. l.], v. 0, 2017. DOI: 10.1080/14760584.2017.1355245. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=iev20>. Acesso em: 5 set. 2018.
- JAYARAMAN, Muthusamy et al. Maximizing the Potency of siRNA Lipid Nanoparticles for Hepatic Gene Silencing In Vivo. **Angewandte Chemie International Edition**, [S. l.], v. 51, n. 34, p. 8529–8533, 2012. DOI: 10.1002/anie.201203263. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22782619>. Acesso em: 14 jan. 2019.
- KALLEN, Karl-Josef et al. A novel, disruptive vaccination technology: self-adjuvanted RNAActive(®) vaccines. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, [S. l.], v. 9, n. 10, p. 2263–2276, 2013. DOI: 10.4161/hv.25181.
- KARIKÓ, K.; KUO, A.; BARNATHAN, E. S. Overexpression of urokinase receptor in mammalian cells following administration of the in vitro transcribed encoding mRNA. **Gene Therapy**, [S. l.], v. 6, n. 6, p. 1092–1100, 1999. DOI: 10.1038/sj.gt.3300930. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10455412>. Acesso em: 14 jan. 2019.
- KARIKÓ, Katalin; BUCKSTEIN, Michael; NI, Houping; WEISSMAN, Drew. Suppression of RNA Recognition by Toll-like Receptors: The Impact of Nucleoside Modification and the Evolutionary Origin of RNA. **Immunity**, [S. l.], v. 23, n. 2, p. 165–175, 2005. DOI: 10.1016/j.immuni.2005.06.008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16111635>. Acesso em: 14 jan. 2019.
- KARIKÓ, Katalin; MURAMATSU, Hiromi; KELLER, Jason M.; WEISSMAN, Drew. Increased erythropoiesis in mice injected with submicrogram quantities of pseudouridine-containing mRNA encoding erythropoietin. **Molecular Therapy**, [S. l.], v. 20, n. 5, p. 948–953, 2012. DOI: 10.1038/mt.2012.7. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/mt.2012.7/nature06264>.
- KARIKÓ, Katalin; MURAMATSU, Hiromi; LUDWIG, János; WEISSMAN, Drew. Generating the optimal mRNA for therapy: HPLC purification eliminates immune activation and improves translation of nucleoside-modified, protein-encoding mRNA. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 39, n. 21, p. 1–10, 2011. DOI: 10.1093/nar/gkr695.
- KARIKÓ, Katalin; MURAMATSU, Hiromi; WELSH, Frank A.; LUDWIG, János; KATO, Hiroki; AKIRA, Shizuo; WEISSMAN, Drew. Incorporation of Pseudouridine Into mRNA Yields Superior Nonimmunogenic Vector With Increased Translational Capacity and Biological Stability. [S. l.], 2008. DOI: 10.1038/mt.2008.200. Disponível em: www.moleculartherapy.org. Acesso em: 4 set. 2018.
- KARIKÓ, Katalin; NI, Houping; CAPODICCI, John; LAMPHIER, Marc; WEISSMAN, Drew. mRNA Is an Endogenous Ligand for Toll-like Receptor 3. **Journal of Biological**

Chemistry, [S. l.], v. 279, n. 13, p. 12542–12550, 2004. DOI: 10.1074/jbc.M310175200.

KEAM, Susan J.; HARPER, Diane M. Human papillomavirus types 16 and 18 vaccine (recombinant, AS04 adjuvanted, adsorbed) [Cervarix]. **Drugs**, [S. l.], v. 68, n. 3, p. 359–72, 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18257611>. Acesso em: 4 jun. 2016.

KIM, Daejin; HUNG, Chien-Fu; WU, T. C. Monitoring the Trafficking of Adoptively Transferred Antigen-Specific CD8-Positive T Cells In Vivo , Using Noninvasive Luminescence Imaging. **Human Gene Therapy**, [S. l.], v. 18, n. 7, p. 575–588, 2007. DOI: 10.1089/hum.2007.038. Disponível em: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/hum.2007.038>.

KIM, Jeonghwan; EYGERIS, Yulia; GUPTA, Mohit; SAHAY, Gaurav. Self-assembled mRNA vaccines Jeonghwan. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S. l.], v. 170, n. January, p. 83–112, 2020.

KOFLER, Regina M.; ABERLE, Judith H.; ABERLE, Stephan W.; ALLISON, Steven L.; HEINZ, Franz X.; MANDL, Christian W. Mimicking live flavivirus immunization with a noninfectious RNA vaccine. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 101, n. 7, p. 1951–1956, 2004. DOI: 10.1073/pnas.0307145101. Disponível em: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.0307145101>.

KOMDEUR, Fenne L. et al. First-in-Human Phase I Clinical Trial of an SFV-Based RNA Replicon Cancer Vaccine against HPV-Induced Cancers. **Molecular Therapy**, [S. l.], v. 29, n. 2, p. 611–625, 2021. DOI: 10.1016/j.ymthe.2020.11.002. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1525001620306006>.

KOWALSKI, Piotr S.; RUDRA, Arnab; MIAO, Lei; ANDERSON, Daniel G. Delivering the Messenger: Advances in Technologies for Therapeutic mRNA Delivery. **Molecular Therapy**, [S. l.], v. 27, n. 4, p. 710–728, 2019. DOI: 10.1016/j.ymthe.2019.02.012. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S152500161930053X>.

KRANZ, Lena M. et al. Systemic RNA delivery to dendritic cells exploits antiviral defence for cancer immunotherapy. **Nature**, [S. l.], v. 534, n. 7607, p. 396–401, 2016. DOI: 10.1038/nature18300. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nature18300>.

KÜBLER, H. et al. Final analysis of a phase I/IIa study with CV9103, an intradermally administered prostate cancer immunotherapy based on self-adjuvanted mRNA. **Journal of Clinical Oncology**, [S. l.], v. 29, n. 15_suppl, p. 4535–4535, 2011. DOI: 10.1200/jco.2011.29.15_suppl.4535. Disponível em: http://ascopubs.org/doi/10.1200/jco.2011.29.15_suppl.4535.

LACZKÓ, Dorottya et al. A Single Immunization with Nucleoside-Modified mRNA Vaccines Elicits Strong Cellular and Humoral Immune Responses against SARS-CoV-2 in Mice. **Immunity**, [S. l.], v. 53, n. 4, p. 724–732.e7, 2020. DOI: 10.1016/j.immuni.2020.07.019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761320303265>.

LAMB, Yvette N. BNT162b2 mRNA COVID-19 Vaccine: First Approval. **Drugs**, [S. l.], v. 81, n. 4, p. 495–501, 2021. DOI: 10.1007/s40265-021-01480-7. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s40265-021-01480-7>.

- LASARO, Marcio O.; DINIZ, Mariana O.; REYES-SANDOVAL, Arturo; ERTL, Hildegund C.; FERREIRA, Luis C. S. Anti-tumor DNA vaccines based on the expression of human papillomavirus-16 E6/E7 oncoproteins genetically fused with the glycoprotein D from herpes simplex virus-1. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, [S. l.], v. 7, n. 15, p. 1541–50, 2005. DOI: 10.1016/j.micinf.2005.05.024. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16213178>. Acesso em: 4 jun. 2016.
- LAZZARO, Sandra et al. CD8 T-cell priming upon mRNA vaccination is restricted to bone-marrow-derived antigen-presenting cells and may involve antigen transfer from myocytes. **Immunology**, [S. l.], v. 146, n. 2, p. 312–326, 2015. DOI: 10.1111/imm.12505.
- LI, Yingzhong et al. Multifunctional oncolytic nanoparticles deliver self-replicating IL-12 RNA to eliminate established tumors and prime systemic immunity. **Nature Cancer**, [S. l.], v. 1, n. 9, p. 882–893, 2020. DOI: 10.1038/s43018-020-0095-6. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s43018-020-0095-6>.
- LIN, K. Y.; GUARNIERI, F. G.; STAVELEY-O'CARROLL, K. F.; LEVITSKY, H. I.; AUGUST, J. T.; PARDOLL, D. M.; WU, T. C. Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. **Cancer research**, [S. l.], v. 56, n. 1, p. 21–6, 1996. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8548765>.
- LJUNGBERG, Karl; LILJESTRÖM, Peter. Self-replicating alphavirus RNA vaccines. **Expert Review of Vaccines**, [S. l.], v. 14, n. 2, p. 177–194, 2015. DOI: 10.1586/14760584.2015.965690.
- LUNDSTROM, Kenneth. Alphavirus-based vaccines. **Viruses**, [S. l.], v. 6, n. 6, p. 2392–2415, 2014. DOI: 10.3390/v6062392.
- MAIER, Martin A. et al. Biodegradable Lipids Enabling Rapidly Eliminated Lipid Nanoparticles for Systemic Delivery of RNAi Therapeutics. **Molecular Therapy**, [S. l.], v. 21, n. 8, p. 1570–1578, 2013. DOI: 10.1038/mt.2013.124. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23799535>. Acesso em: 14 jan. 2019.
- MCCULLOUGH, Kenneth C.; BASSI, Isabelle; MILONA, Panagiota; SUTER, Rolf; THOMANN-HARWOOD, Lisa; ENGLEZOU, Pavlos; DÉMOULINS, Thomas; RUGGLI, Nicolas. Self-replicating Replicon-RNA Delivery to Dendritic Cells by Chitosan-nanoparticles for Translation In Vitro and In Vivo. **Molecular therapy. Nucleic acids**, [S. l.], v. 3, n. 7, p. e173, 2014. DOI: 10.1038/mtna.2014.24. Disponível em: <http://www.nature.com/doi/10.1038/mtna.2014.24%5Cnpapers3://publication/doi/10.1038/mtna.2014.24>.
- MIAO, Lei et al. Delivery of mRNA vaccines with heterocyclic lipids increases anti-tumor efficacy by STING-mediated immune cell activation. **Nature Biotechnology**, [S. l.], v. 37, n. 10, p. 1174–1185, 2019. DOI: 10.1038/s41587-019-0247-3. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41587-019-0247-3>.
- MIRAS, Manuel; MILLER, W. Allen; TRUNIGER, Verónica; ARANDA, Miguel A. Non-canonical Translation in Plant RNA Viruses. **Frontiers in Plant Science**, [S. l.], v. 8, n. April, 2017. DOI: 10.3389/fpls.2017.00494. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2017.00494/full>.

- MIZUTANI, Tatsuaki et al. Conditional IFNAR1 ablation reveals distinct requirements of Type I IFN signaling for NK cell maturation and tumor surveillance. **Oncoimmunology**, [S. l.], v. 1, n. 7, p. 1027–1037, 2012. DOI: 10.4161/onci.21284.
- MORENO, Ana C. R. et al. The Combined Use of Melatonin and an Indoleamine 2,3-Dioxygenase-1 Inhibitor Enhances Vaccine-Induced Protective Cellular Immunity to HPV16-Associated Tumors. **Frontiers in immunology**, [S. l.], v. 9, n. August, p. 1914, 2018. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01914.
- MORSE, Michael A. et al. An alphavirus vector overcomes the presence of neutralizing antibodies and elevated numbers of Tregs to induce immune responses in humans with advanced cancer. **Journal of Clinical Investigation**, [S. l.], v. 120, n. 9, p. 3234–3241, 2010. DOI: 10.1172/JCI42672. Disponível em: <http://www.jci.org/articles/view/42672>.
- NIETFELD, W.; MENTZEL, H.; PIELER, T. The *Xenopus laevis* poly(A) binding protein is composed of multiple functionally independent RNA binding domains. **The EMBO journal**, [S. l.], v. 9, n. 11, p. 3699–705, 1990. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=552125&tool=pmcentrez&endertype=abstract>.
- NIZARD, Mevyn et al. Induction of resident memory T cells enhances the efficacy of cancer vaccine. **Nature Communications**, [S. l.], v. 8, n. May, 2017. DOI: 10.1038/ncomms15221.
- NORBERT PARDI, HIROMI MURAMATSU, Drew Weissman and Katalin Karikó. **Synthetic Messenger RNA and Cell Metabolism Modulation**. Totowa, NJ: Humana Press, 2013. v. 969 DOI: 10.1007/978-1-62703-260-5. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-62703-260-5>.
- NORDFORS, Cecilia et al. CD8+ and CD4+ tumour infiltrating lymphocytes in relation to human papillomavirus status and clinical outcome in tonsillar and base of tongue squamous cell carcinoma. **European Journal of Cancer**, [S. l.], v. 49, n. 11, p. 2522–2530, 2013. DOI: 10.1016/j.ejca.2013.03.019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959804913002220>.
- PARDI, Norbert et al. Zika virus protection by a single low-dose nucleoside-modified mRNA vaccination. **Nature**, [S. l.], v. 543, n. 7644, p. 248–251, 2017. DOI: 10.1038/nature21428. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nature21428>.
- PARDI, Norbert et al. Nucleoside-modified mRNA vaccines induce potent T follicular helper and germinal center B cell responses. **The Journal of Experimental Medicine**, [S. l.], v. 215, n. 6, p. 1571–1588, 2018. a. DOI: 10.1084/jem.20171450. Disponível em: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20171450>.
- PARDI, Norbert et al. Nucleoside-modified mRNA immunization elicits influenza virus hemagglutinin stalk-specific antibodies. **Nature Communications**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 3361, 2018. b. DOI: 10.1038/s41467-018-05482-0. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41467-018-05482-0>. Acesso em: 11 jan. 2019.
- PARDI, Norbert; HOGAN, Michael J.; PORTER, Frederick W.; WEISSMAN, Drew. mRNA vaccines - a new era in vaccinology. **Nature reviews. Drug discovery**, [S. l.], v. 17, n. 4, p. 261–279, 2018. c. DOI: 10.1038/nrd.2017.243. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29326426>. Acesso em: 14 jan. 2019.

- PARDI, Norbert; MURAMATSU, Hiromi; WEISSMAN, Drew; KARIKÓ, Katalin. In Vitro Transcription of Long RNA Containing Modified Nucleosides. *In: Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. [s.l.: s.n.]. v. 969p. 29–42. DOI: 10.1007/978-1-62703-260-5_2. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23296925>. Acesso em: 7 set. 2018.
- PARDI, Norbert; TUYISHIME, Steven; MURAMATSU, Hiromi; KARIKO, Katalin; MUI, Barbara L.; TAM, Ying K.; MADDEN, Thomas D.; HOPE, Michael J.; WEISSMAN, Drew. Expression kinetics of nucleoside-modified mRNA delivered in lipid nanoparticles to mice by various routes. *Journal of Controlled Release*, [S. l.], v. 217, p. 345–351, 2015. DOI: 10.1016/j.jconrel.2015.08.007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.08.007>.
- PEPINI, Timothy et al. Induction of an IFN-Mediated Antiviral Response by a Self-Amplifying RNA Vaccine: Implications for Vaccine Design. *The Journal of Immunology*, [S. l.], v. 198, n. 10, p. 4012–4024, 2017. DOI: 10.4049/jimmunol.1601877. Disponível em: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1601877>. Acesso em: 29 mar. 2020.
- PERRI, Silvia et al. An alphavirus replicon particle chimera derived from venezuelan equine encephalitis and sindbis viruses is a potent gene-based vaccine delivery vector. *Journal of Virology*, [S. l.], v. 77, n. 19, p. 10394–10403, 2003.
- PIROG, Edyta C. et al. HPV prevalence and genotypes in different histological subtypes of cervical adenocarcinoma, a worldwide analysis of 760 cases. *Modern Pathology*, [S. l.], v. 27, n. 12, p. 1559–1567, 2014. DOI: 10.1038/modpathol.2014.55. Disponível em: <http://www.nature.com/doi/10.1038/modpathol.2014.55>.
- PITT, Jonathan M. et al. Resistance Mechanisms to Immune-Checkpoint Blockade in Cancer: Tumor-Intrinsic and -Extrinsic Factors. *Immunity*, [S. l.], v. 44, n. 6, p. 1255–1269, 2016. DOI: 10.1016/j.immuni.2016.06.001. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761316302047>.
- POLACK, Fernando P. et al. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *New England Journal of Medicine*, [S. l.], v. 383, n. 27, p. 2603–2615, 2020. DOI: 10.1056/NEJMoa2034577. Disponível em: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa2034577>.
- POLLARD, Charlotte et al. Type I IFN counteracts the induction of antigen-specific immune responses by lipid-based delivery of mRNA vaccines. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, [S. l.], v. 21, n. 1, p. 251–9, 2013. DOI: 10.1038/mt.2012.202.
- PORCHIA, Bruna F. M. M.; DINIZ, Mariana O.; CARIRI, Francisco A. M. O.; SANTANA, Vinícius C.; AMORIM, Jaime H.; BALAN, Andrea; BRAGA, Catarina J. M.; FERREIRA, Luís Carlos S. Purified herpes simplex type 1 glycoprotein D (gD) genetically fused with the type 16 human papillomavirus E7 oncoprotein enhances antigen-specific CD8+ T cell responses and confers protective antitumor immunity. *Molecular pharmaceuticals*, [S. l.], v. 8, n. 6, p. 2320–30, 2011. DOI: 10.1021/mp200194s. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21985578>. Acesso em: 4 jun. 2016.

PORCHIA, Bruna F. M. M.; MORENO, Ana Carolina R.; RAMOS, Rodrigo N.; DINIZ, Mariana O.; DE ANDRADE, Laís Helena T. M.; ROSA, Daniela S.; BARBUTO, Jose Alexandre M.; BOSCARDIN, Silvia B.; FERREIRA, Luís Carlos S. Herpes simplex virus glycoprotein D targets a specific dendritic cell subset and improves the performance of vaccines to human papillomavirus-associated tumors. **Molecular Cancer Therapeutics**, [S. l.], v. 16, n. 9, p. 1922–1933, 2017. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-17-0071.

RAMOS DA SILVA, Jamile et al. A therapeutic DNA vaccine and gemcitabine act synergistically to eradicate HPV-associated tumors in a preclinical model. **Onc Immunology**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 1949896, 2021. DOI: 10.1080/2162402x.2021.1949896. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/2162402X.2021.1949896>.

RANDALL, Leslie M.; WALKER, Amanda J.; JIA, Angela Y.; MILLER, Devin T.; ZAMARIN, Dmitriy. Expanding Our Impact in Cervical Cancer Treatment: Novel Immunotherapies, Radiation Innovations, and Consideration of Rare Histologies. **American Society of Clinical Oncology Educational Book**, [S. l.], n. 41, p. 252–263, 2021. DOI: 10.1200/EDBK_320411. Disponível em: https://ascopubs.org/doi/10.1200/EDBK_320411.

RICHNER, Justin M. et al. Modified mRNA Vaccines Protect against Zika Virus Infection. **Cell**, [S. l.], v. 168, n. 6, p. 1114–1125.e10, 2017. DOI: 10.1016/j.cell.2017.02.017. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867417301952>.

RITTIG, Susanne M. et al. Intradermal vaccinations with RNA coding for TAA generate CD8 and CD4 immune responses and induce clinical benefit in vaccinated patients. **Molecular Therapy**, [S. l.], v. 19, n. 5, p. 990–999, 2011. DOI: 10.1038/mt.2010.289. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/mt.2010.289>.

ROSS, J.; SULLIVAN, T. D. Half-lives of beta and gamma globin messenger RNAs and of protein synthetic capacity in cultured human reticulocytes. **Blood**, [S. l.], v. 66, n. 5, p. 1149–54, 1985. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4052630>. Acesso em: 4 set. 2018.

SAHIN, Ugur; KARIKÓ, Katalin; TÜRECI, Özlem. mRNA-based therapeutics — developing a new class of drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, [S. l.], v. 13, n. 10, p. 759–780, 2014. DOI: 10.1038/nrd4278. Disponível em: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrd4278>.

SALES, Natiely S.; SILVA, Jamile R.; APS, Luana R. M. M.; SILVA, Mariângela O.; PORCHIA, Bruna F. M. M.; FERREIRA, Luís Carlos S.; DINIZ, Mariana O. In vivo electroporation enhances vaccine-mediated therapeutic control of human papilloma virus-associated tumors by the activation of multifunctional and effector memory CD8 + T cells. **Vaccine**, [S. l.], 2017. DOI: 10.1016/j.vaccine.2017.11.011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.11.011>.

SANIF, Rizal; NURWANY, Raissa. Prognostic significance of CD4/CD8 ratio in patients with advanced cervical cancer. **Journal of Physics: Conference Series**, [S. l.], v. 1246, p. 012053, 2019. DOI: 10.1088/1742-6596/1246/1/012053. Disponível em: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1742-6596/1246/1/012053>.

SCHIFFMAN, Mark; CASTLE, Philip E.; JERONIMO, Jose; RODRIGUEZ, Ana C.; WACHOLDER, Sholom. Human papillomavirus and cervical cancer. **Lancet**, [S. l.], v. 370, n. 9590, p. 890–907, 2007. DOI: 10.1016/S0140-6736(07)61416-0. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17826171>. Acesso em: 24 mar. 2015.

SCHLAKE, Thomas; THESS, Andreas; FOTIN-MLECZEK, Mariola; KALLEN, Karl-Josef. Developing mRNA-vaccine technologies. **RNA biology**, [S. l.], v. 9, n. 11, p. 1319–30, 2012. DOI: 10.4161/rna.22269. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23064118> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3597572>.

SEBASTIAN, Martin et al. A phase I/IIa study of the mRNA-based cancer immunotherapy CV9201 in patients with stage IIIB/IV non-small cell lung cancer. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, [S. l.], v. 68, n. 5, p. 799–812, 2019. DOI: 10.1007/s00262-019-02315-x. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00262-019-02315-x>.

SELMİ, Abderraouf; VASCOTTO, Fulvia; KAUTZ-NEU, Kordula; TÜRECI, Özlem; SAHİN, Ugur; VON STEBUT, Esther; DIKEN, Mustafa; KREITER, Sebastian. Uptake of synthetic naked RNA by skin-resident dendritic cells via macropinocytosis allows antigen expression and induction of T-cell responses in mice. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, [S. l.], v. 65, n. 9, p. 1075–1083, 2016. DOI: 10.1007/s00262-016-1869-7.

SEN, G.; SARKAR, S. Transcriptional signaling by double-stranded RNA: role of TLR3. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 1–14, 2005. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2005.01.006. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359610105000067>.

SHI, L. et al. GARDASIL®: Prophylactic Human Papillomavirus Vaccine Development – From Bench Top to Bed-side. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, [S. l.], v. 81, n. 2, p. 259–264, 2007. DOI: 10.1038/sj.clpt.6100055. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1038/sj.clpt.6100055>.

SILVA, Jamile R.; SALES, Natiely S.; SILVA, Mariângela O.; APS, Luana R. M. M.; MORENO, Ana C. R.; RODRIGUES, Elaine G.; FERREIRA, Luís C. S.; DINIZ, Mariana O. Expression of a soluble IL-10 receptor enhances the therapeutic effects of a papillomavirus-associated antitumor vaccine in a murine model. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, [S. l.], v. 68, n. 5, p. 753–763, 2019. DOI: 10.1007/s00262-018-02297-2. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00262-018-02297-2>.

SILVA, Mariângela O. et al. Antigen Delivery to DEC205 + Dendritic Cells Induces Immunological Memory and Protective Therapeutic Effects against HPV-Associated Tumors at Different Anatomical Sites. **International Journal of Biological Sciences**, [S. l.], v. 17, n. 11, p. 2944–2956, 2021. DOI: 10.7150/ijbs.57038.

SIMMONS, Jason D.; WHITE, Laura J.; MORRISON, Thomas E.; MONTGOMERY, Stephanie A.; WHITMORE, Alan C.; JOHNSTON, Robert E.; HEISE, Mark T. Venezuelan Equine Encephalitis Virus Disrupts STAT1 Signaling by Distinct Mechanisms Independent of Host Shutoff Downloaded from. **JOURNAL OF VIROLOGY**, [S. l.], v. 83, n. 20, p. 10571–10581, 2009. DOI: 10.1128/JVI.01041-09. Disponível em: <http://jvi.asm.org/>. Acesso em: 29 mar. 2020.

STILES, Katie M.; WHITBECK, J. Charles; LOU, Huan; COHEN, Gary H.; EISENBERG, Roselyn J.; KRUMMENACHER, Claude. Herpes Simplex Virus Glycoprotein D Interferes with Binding of Herpesvirus Entry Mediator to Its Ligands through Downregulation and Direct Competition. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 84, n. 22, p. 11646–11660, 2010. DOI: 10.1128/JVI.01550-10. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.01550-10>.

SYRJÄNEN, Stina M.; SYRJÄNEN, Kari J. New Concepts on the Role of Human Papillomavirus in Cell Cycle Regulation. **Annals of Medicine**, [S. l.], v. 31, n. 3, p. 175–187, 1999. DOI: 10.3109/07853899909115976. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/07853899909115976>.

TANJI, Hiromi; OHTO, Umeharu; SHIBATA, Takuma; TAOKA, Masato; YAMAUCHI, Yoshio; ISOBE, Toshiaki; MIYAKE, Kensuke; SHIMIZU, Toshiyuki. Toll-like receptor 8 senses degradation products of single-stranded RNA. **Nature structural & molecular biology**, [S. l.], v. 22, n. 2, p. 109–15, 2015. DOI: 10.1038/nsmb.2943. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25599397>.

THOMPSON, J. M.; WHITMORE, A. C.; KONOPKA, J. L.; COLLIER, M. L.; RICHMOND, E. M. B.; DAVIS, N. L.; STAATS, H. F.; JOHNSTON, R. E. Mucosal and systemic adjuvant activity of alphavirus replicon particles. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 103, n. 10, p. 3722–3727, 2006. DOI: 10.1073/pnas.0600287103. Disponível em: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0600287103>.

TINDLE, Robert W. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. **Nature Reviews Cancer**, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 59–64, 2002. DOI: 10.1038/nrc700. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nrc700>.

TSE, Sze-Wah; MCKINNEY, Kristine; WALKER, William; NGUYEN, Mychael; IACOVELLI, Jared; SMALL, Clayton; HOPSON, Kristen; ZAKS, Tal; HUANG, Eric. mRNA-encoded, constitutively active STINGV155M is a potent genetic adjuvant of antigen-specific CD8+ T cell response. **Molecular Therapy**, [S. l.], v. 29, n. 7, p. 2227–2238, 2021. DOI: 10.1016/j.ymthe.2021.03.002. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1525001621001313>.

TSENG, Jen-yu; YEN, Ming-shien; TWU, Nae-fong; LAI, Chiung-ru; HORNG, Huann-cheng. Prognostic nomogram for overall survival in stage IIB-IVA cervical cancer patients treated with concurrent chemoradiotherapy. **YMOB**, [S. l.], v. 202, n. 2, p. 174.e1-174.e7, 2010. DOI: 10.1016/j.ajog.2009.09.028. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2009.09.028>.

VAN DE WALL, Stephanie; LJUNGBERG, Karl; IP, Peng Peng; BOERMA, Annemarie; KNUDSEN, Maria L.; NIJMAN, Hans W.; LILJESTRÖM, Peter; DAEMEN, Toos. Potent therapeutic efficacy of an alphavirus replicon DNA vaccine expressing human papilloma virus E6 and E7 antigens. **Oncolmmunology**, [S. l.], v. 7, n. 10, p. e1487913, 2018. DOI: 10.1080/2162402X.2018.1487913. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/2162402X.2018.1487913>.

VAN LINT, Sandra et al. Preclinical Evaluation of TriMix and Antigen mRNA-Based Antitumor Therapy. **Cancer Research**, [S. l.], v. 72, n. 7, p. 1661–1671, 2012. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2957. Disponível em: <http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/0008-5472.CAN-11-2957>.

- VOGEL, Annette B. et al. Self-Amplifying RNA Vaccines Give Equivalent Protection against Influenza to mRNA Vaccines but at Much Lower Doses. **Molecular Therapy**, [S. l.], v. 26, n. 2, p. 446–455, 2018. a. DOI: 10.1016/j.ymthe.2017.11.017. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1525001617305944>.
- VOGEL, Annette B. et al. Self-Amplifying RNA Vaccines Give Equivalent Protection against Influenza to mRNA Vaccines but at Much Lower Doses. **Molecular Therapy**, [S. l.], v. 26, n. 2, p. 446–455, 2018. b. DOI: 10.1016/j.ymthe.2017.11.017. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1525001617305944>.
- WEIDE, Benjamin et al. Direct Injection of Protamine-protected mRNA: Results of a Phase 1/2 Vaccination Trial in Metastatic Melanoma Patients. **Journal of Immunotherapy**, [S. l.], v. 32, n. 5, p. 498–507, 2009. DOI: 10.1097/CJI.0b013e3181a00068. Disponível em: <https://journals.lww.com/00002371-200906000-00008>.
- WEISSMAN, D. et al. HIV gag mRNA transfection of dendritic cells (DC) delivers encoded antigen to MHC class I and II molecules, causes DC maturation, and induces a potent human in vitro primary immune response. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, [S. l.], v. 165, n. 8, p. 4710–4717, 2000. DOI: 10.4049/jimmunol.1202464.
- WELTERS, M. J. P. et al. Induction of Tumor-Specific CD4+ and CD8+ T-Cell Immunity in Cervical Cancer Patients by a Human Papillomavirus Type 16 E6 and E7 Long Peptides Vaccine. **Clinical Cancer Research**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 178–187, 2008. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1880. Disponível em: <http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-07-1880>.
- WERNES, Bruce A.; LEVINE, Arnold J.; HOWLEY, Peter M. Association of Human Papillomavirus Types 16 and 18 E6 Proteins with p53. **Science**, [S. l.], v. 248, n. 4951, p. 76–79, 1990. DOI: 10.1126/science.2157286. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.2157286>.
- WIGLE, Jannah; COAST, Ernestina; WATSON-JONES, Deborah. Human papillomavirus (HPV) vaccine implementation in low and middle-income countries (LMICs): Health system experiences and prospects. **Vaccine**, [S. l.], v. 31, n. 37, p. 3811–3817, 2013. DOI: 10.1016/j.vaccine.2013.06.016. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X13007858>.
- WOLFF, J. A.; MALONE, R. W.; WILLIAMS, P.; CHONG, W.; ACSADI, G.; JANI, A.; FELGNER, P. L. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. **Science (New York, N.Y.)**, [S. l.], v. 247, n. 4949 Pt 1, p. 1465–1468, 1990.
- WOODMAN, Ciaran B. J.; COLLINS, Stuart I.; YOUNG, Lawrence S. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. **Nature reviews. Cancer**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 11–22, 2007. DOI: 10.1038/nrc2050. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2050>. Acesso em: 4 jun. 2016.
- YONEZAWA, Sei; KOIDE, Hiroyuki; ASAI, Tomohiro. Recent advances in siRNA delivery mediated by lipid-based nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S. l.], v. 154–155, p. 64–78, 2020. DOI: 10.1016/j.addr.2020.07.022. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X2030106X>.
- YU, Ai-Ming; JIAN, Chao; YU, Allan H.; TU, Mei-Juan. RNA therapy: Are we using the

right molecules? **Pharmacology & Therapeutics**, [S. l.], v. 196, p. 91–104, 2019. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2018.11.011. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016372581830216X>.

YU, J.; RUSSELL, J. E. Structural and functional analysis of an mRNP complex that mediates the high stability of human beta-globin mRNA. **Molecular and cellular biology**, [S. l.], v. 21, n. 17, p. 5879–88, 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11486027>. Acesso em: 4 set. 2018.

ZHANG, Zhikuan et al. Structural Analysis Reveals that Toll-like Receptor 7 Is a Dual Receptor for Guanosine and Single-Stranded RNA. **Immunity**, [S. l.], v. 45, n. 4, p. 737–748, 2016. DOI: 10.1016/j.immuni.2016.09.011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27742543>.

APÊNDICES E ANEXOS

APÊNDICE A – Súmula Curricular

JAMILE RAMOS DA SILVA

1. Formação

Ano	Título	Instituição
2014	Graduação - Bacharelado	Universidade Federal da Bahia- UFBA (Vitória da Conquista, BA)
2016	Mestrado	Instituto de ciências Biomédicas II, Universidade de São Paulo (São Paulo, SP)
2021	Doutorado (PhD)	Instituto de ciências Biomédicas II, Universidade de São Paulo (São Paulo, SP)

2. Histórico profissional

- **Pós-graduação em Ciências na modalidade de Doutorado** no Laboratório De Desenvolvimento de Vacinas/ Instituto de Ciências Biomédicas II – Universidade de São Paulo. **Título:** Vacinas de RNA mensageiro formuladas em nanopartículas lipídicas para tratamento de tumores induzidos pelo HPV-16. Projeto Fapesp. **Orientador:** Luís Carlos de Souza Ferreira. 2016-2021.
- **Pós-graduação em Microbiologia na modalidade de Mestrado** no Laboratório De Desenvolvimento de Vacinas/ Instituto de Ciências Biomédicas II – Universidade de São Paulo. **Título:** Co-expressão do receptor de IL-10 como estratégia para potencializar os efeitos de uma vacina de DNA voltada para o controle de tumores induzidos pelo HPV-16. Projeto Fapesp. **Orientador:** Luís Carlos de Souza Ferreira. 2014-2016.
- **Estágio BEPE.** Doutorado sanduiche realizado na Universidade da Pensilvania, com desenvolvimento do projeto intitulado “mRNA-based vaccines targeting HPV-induced tumors” sob a orientação do Prof. Norbert Pardi, **no período de 20 de maio de 2019 a 19 de fevereiro de 2021. Projeto fapesp nº 2019/01523-3.**
- **Monitoria no Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE)** Disciplina: Micologia Médica (Biomédicas)- Instituto de Ciências Biomédicas – 120 horas
- **Estágio de Iniciação Científica** no Laboratório De Desenvolvimento de Vacinas/ Instituto de Ciências Biomédicas II – Universidade de São Paulo (2013 e 2014). **Título:** Avaliação dos efeitos do receptor de IL-10 na resposta imunológica induzida por uma vacina de DNA contra tumores induzidos por HPV. **Orientador:** Luís Carlos de Souza Ferreira e Mariana de Oliveira Diniz. **480 horas.**
- **Estágio de Iniciação Científica** no Laboratório de Histopatologia, Biologia Molecular, Microbiologia e Imunologia da Universidade Federal da Bahia (2010/2012 e 2013/2014). **Título:** “Desenvolvimento de um modelo experimental para *Ureaplasma diversum*”. **PIBIC/CNPq** **Orientador:** Prof. Dr. Robson Amaro Augusto da Silva Vitória da Conquista, Bahia - **3360 horas.**

- **Monitoria de Histologia e Embriologia**, no Laboratório de Histopatologia da Universidade Federal da Bahia (2010/2012). **1840 horas**.

Prêmios

- 2017- *In vivo* neutralization of IL-10 enhances the antitumor effects of a therapeutic vaccine to HPV-associated tumor. **Melhor apresentação de pôster do trabalho** no 3rd ICGEB Workshop on Human Papillomavirus and associated malignancies: biology, prevention and therapy. São Paulo.
- 2016- Protection against HPV-16-associated tumors requires the activation of CD8+ effector memory T cells and the control of myeloid-derived suppressor cells. **Prêmio destaque em publicação científica**. XVI Reunião Científica BMM. Universidade de São Paulo.
- 2014- Extrato etanólico de *Anadenanthera macrocarpa* é capaz de reduzir infiltrado neutrofílico na infecção experimental por *Staphylococcus aureus*, Universidade Federal da Bahia. **Melhor pôster**.
- 2012- Atividade anti-inflamatória do extrato alcoólico de *Anadenanthera macrocarpa* em camundongos infectados com *Staphylococcus aureus*, UFBA. **Melhor pôster**.
- 2012- Imunidade protetora contra *Ureaplasma diversum* no modelo murino é mediada por neutrófilos e ambiente inflamatório, UFBA. **Melhor pôster**.

3. Resultados de pesquisa mais relevantes (10 trabalhos mais relevantes).

1. **Jamile Ramos da Silva**, Ana Carolina Ramos Moreno, Natiely Silva Sales, Mariângela de Oliveira Silva, Luana R. M. M. Aps, Bruna F.M.M. Porchia, Karine Bitencourt Rodrigues, Natália Cestari Moreno, Aléxia Adrienne Vesneslau-Carvalho, Carlos Frederico M. Menck, Mariana de Oliveira Diniz, Luís Carlos de Souza Ferreira. A therapeutic DNA vaccine and gemcitabine act synergistically to eradicate HPV-associated tumours in a preclinical model. *Oncolimmunology*. Aceito para publicação. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2021.1949896>. Junho 2021.
2. **Jamile R. Silva**, Natiely S. Sales, Mariângela O. Silva, Luana R. M. M. Aps, Ana C. R. Moreno, Elaine G. Rodrigues, Luís C. S. Ferreira, Mariana O. Diniz. Expression of a soluble IL-10 receptor enhances the therapeutic effects of a papillomavirus-associated antitumor vaccine in a murine model. *Cancer Immunology, Immunotherapy* (2019), <https://doi.org/10.1007/s00262-018-02297-2>.
3. Natiely S. Sales, **Jamile R. Silva**, Luana R.M.M. Aps, Bruna F.M.M. Porchia, Mariângela O. Silva, Luís Carlos S. Ferreira and Mariana O. Diniz. *In vivo* electroporation enhances vaccine-mediated therapeutic control of human papilloma virus-associated tumors by the activation of multifunctional and effector memory CD8⁺ T cells. *Vaccine*. Nov, 2017. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.11.011.

4. Alec W. Freyn, **Jamile Ramos da Silva**, Victoria C. Rosado, Carly M. Bliss, Matthew Pine, Barbara L. Mui, Ying K. Tam, Thomas D. Madden, Luís Carlos de Souza Ferreira, Drew Weissman, Florian Krammer, Lynda Coughlan, Peter Palese, Norbert Pardi, and Raffael Nachbagauer. A Multi-Targeting, Nucleoside-Modified mRNA Influenza Virus Vaccine Provides Broad Protection in Mice. *Molecular Therapy* (2020), <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.04.018>.
5. Silva, M.O.; Almeida, B.S.; Sales, N.S.; Diniz, M.O.; Aps, L.R.M.M.; Rodrigues, K.B.; **Silva, J.R.**; Moreno, A.C.R.; Porchia, B.F.M.M.; Sulczewski, F.B.; Boscardin, S.B.; Ferreira, L.C.S. Antigen Delivery to DEC205+ Dendritic Cells Induces Immunological Memory and Protective Therapeutic Effects Against HPV-Associated Tumors at Different Anatomical Sites. *International Journal of Biological Sciences*, 2021. Aceito para publicação. <https://doi:10.7150/ijbs.57038>. Maio 2021.
6. Bruna Felício Milazzotto Maldonado Porchia, Luana Raposo de Melo Moraes Aps, Ana Carolina Ramos Moreno, **Jamile Ramos da Silva**, Mariângela de Oliveira Silva, Natiely Silva Sales, Runes Prince dos Santos Alves, Clarissa Ribeiro Reily Rocha, Matheus Molina Silva, Karine Bitencourt Rodrigues, Tácia Borges Barros, Roberta Liberato Pagni, Patrícia da Cruz Souza, Mariana de Oliveira Diniz, Luís Carlos de Souza Ferreira. Active immunization combined with cisplatin confers enhanced therapeutic protection and prevents relapse of HPV-induced tumor at different anatomical sites. *International Journal of Biological Sciences*, 2021.
7. Aléxia A. Venceslau-Carvalho; Marianna T. Pinho Favaro; Mônica J. Rodrigues-Jesus; Lennon R. Pereira.; Samuel S. Pereira; Robert Andreatta-Santos; Rúbens P. S. Alves; Maria F. Castro-Amarante; Karine B. Rodrigues; **Jamile R. Silva**; Rafael R. G. Machado, Wesley L. Fotoran; M. P. Cunha; Edison L. Durigon; Gerhard Wunderlich; Paolo M. A. Zanotto; Luís C. S. Ferreira. Nanomultilamellar lipid vesicles loaded with a recombinant form of the chikungunya virus E2 protein improve the induction of virus-neutralizing antibodies. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. Aceito para publicação. Julho, 2021.
8. Diniz, M.O., Sales, N.S., **Silva, J.R.**, Ferreira, L.C.S. Protection against HPV-16-associated tumors requires the activation of CD8+ effector memory T cells and the control of myeloid-derived suppressor cells. *Molecular Cancer Therapeutics*. Mol Cancer Ther. 2016.
9. **Silva, J.R.**, Oliveira, P.V.; Andrade, L.F., Valeriano, I.N., Pereira, I., Santos, D.P., Timenesky, J., Miranda, L.M., Figueiredo, T.B., Silva, R.A. Intra-uterine experimental infection by *Ureaplasma diversum* induces TNF- α mediated womb inflammation in mice. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* (Online), 2015.
10. Almeida, R.R., Raposo, R.A., Coirada, F.C., **da Silva, J.R.**, de Souza Ferreira, L.C., Kalil, J., Nixon, D.F., Cunha-Neto, E. (2015). Modulating APOBEC expression enhances DNA vaccine immunogenicity. *Immunol Cell Biol*. doi: 10.1038/icb.2015.53

Em redação ou submetidos:

1. **Jamile Ramos da Silva**, Karine Bitencourt Rodrigues, Bruna F.M.M. Porchia, Mariângela de Oliveira Silva, Natiely Silva Sales, Ana Carolina Ramos Moreno, Aléxia Adrienne Vesncslau-Carvalho, Luana R. M. M. Aps, Wesley Luzetti Fotoran, István Tombácz, Drew Weissman, Barbara L. Mui, Ying K. Tam, Mariana de Oliveira Diniz, Norbert Pardi, Luís Carlos de Souza Ferreira. gDE7 encoding by three different mRNA-LNPs platforms confer complete protection of HPV-associated tumors using a single low dose. Manuscrito em elaboração para submissão inicial na *Science Translational Medicine*.
2. Roberta Liberato Pagni, Patrícia da Cruz Souza, Rafael Pegoraro, Bruna Felício Milazzotto Maldonado Porchia, **Jamile Ramos da Silva**, Luana Raposo de Melo Moraes Aps, Mariângela de Oliveira Silva, Karine Bitencourt Rodrigues, Natiely Silva Sales, Luís Carlos de Souza Ferreira, Ana Carolina Ramos Moreno. Interleukin-6 and indoleamine-2,3-dioxygenase as a combined therapeutic target to enhance cancer vaccine efficacy to treat Human Papillomavirus (HPV)-related tumors. Manuscrito em fase final de redação.
3. Patrícia da Cruz Souza, Roberta Liberato Pagni, Rafael Pegoraro, Bruna Felício Milazzotto Maldonado Porchia, **Jamile Ramos da Silva**, Mariângela de Oliveira Silva, Luana Raposo de Melo Moraes Aps, Karine Bitencourt Rodrigues, Natiely Silva Sales, Robert Andreatta Santos, Russel J. Reiter, Luís Carlos de Souza Ferreira¹, Ana Carolina Ramos Moreno. Oral administration of melatonin displays synergistic immunotherapeutic effects with a DNA vaccine to treat HPV-16-associated tumors in a pre-clinical model. Manuscrito em fase final de redação.
4. Karine B. Rodrigues, Natiely S. Sales, Mariângela O. Silva, **Jamile Ramos da Silva**, Maria Fernanda C. Amarante, Luana R. M. M. Aps, Ana Carolina R. Moreno, Robert A. Santos, Rúbens P. S. Alves, Elizabeth Alexandra Flatow, Jose Alexandre M. Barbuto,, Luís Carlos S. Ferreira, Bruna F. M. M. Porchia. Active immunotherapy based on dendritic cells induces a robust T cell response and tumor regression in a pre-clinical HPV-16 tumor model. Manuscrito em fase final de redação.

4. Lista de financiamentos à pesquisa vigente:

Projeto de Doutorado do curso de Pós-graduação pelo departamento de Microbiologia
 Título: “**Vacina de RNA auto-amplificante como estratégia imunoterapêutica para o controle de tumores induzidos por HPV-16**”, financiado pela FAPESP (Processo N° 2016/11594-7). Instituição: Universidade de São Paulo, 2015-atual.

5. Lista de orientações em andamento, com bolsa:

Guilherme Formoso Pelegrin. Título do trabalho: “Caracterização do efeito antitumoral da combinação do mRNA codificante para anti-CTLA-4 com uma vacina de DNA específica para tumores associados ao HPV-16”. Início: 2021. **Iniciação científica** (Graduando em Ciências Biomédicas) - Universidade de São Paulo, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. (co-orientadora).

6. Indicadores quantitativos

Citações: 92 Índice H: 5 Publicações: 12

7) Links to the web pages

ORCID: 0000-0002-1945-7049

CV Lattes - <http://lattes.cnpq.br/1346908828839979>

Linkedin: <https://www.linkedin.com/in/jamile-ramos-silva/>

8. Outras informações

Aulas e palestras ministradas.

- Ministrou a aula: “Vacinas Genéticas” no evento IV Jamboré Brasuca – iGEM, realizado na Universidade de São Paulo. 16 de março de 2017.
- Ministrou a “Da célula saudável ao Câncer: como o HPV induz a formação de tumores” no Curso de inverno em Microbiologia e Biologia Molecular Aplicada, realizado na Universidade de São Paulo. 21 de julho de 2017.
- Ministrante do mini-curso de “Aula Prática de ELISA” no evento Dias de práticas e habilidades biomédicas realizado na Faculdade Metropolitanas Unidas. São Paulo, 24 de outubro de 2016.
- Ministrou a aula “Da célula saudável ao Câncer: como o HPV induz a formação de tumores” para a turma de Biomedicina e Medicina realizado na UniFG (Centro Universitário FG de Guanambi), Guanambi, Bahia, 22 de abril de 2019.
- Ministrou a aula “mRNA: a nova era no desenvolvimento de vacinas.” 2021 no Curso de inverno em Microbiologia e Biologia Molecular Aplicada, realizado na Universidade de São Paulo.

Organização de eventos

- Organização e ministrante do **Curso teórico e Prático de Terapias e vacinas baseadas em RNA mensageiro**, como disciplina da pós-graduação, código BTC5854 com modulo teórico e prático. **Módulo Prático: Training Course on mRNA Vaccines and Therapies** realizado na Universidade de São Paulo, março de 2020. Língua inglesa.

Participação de Eventos

- Participou do evento 3rd ICGEB Workshop on Human Papillomavirus and associated malignancies: biology, prevention and therapy, com apresentação do trabalho intitulado “*In vivo* neutralization of IL-10 enhances the antitumor effects of a therapeutic vaccine to HPV-associated tumor”. São Paulo, SP, 2017.
- Participou do evento International Symposium on Immunotherapy, com apresentação do trabalho intitulado “Control of immunosuppression as a strategy to enhance the effects of a DNA vaccine against HPV-16-induced tumors”. Londres, Reino Unido, 2017.
- Participou do evento XLII Congress of the Brazilian Society of Immunology 2017, com apresentação do trabalho intitulado “Combination of gemcitabine and IL-10 inhibition enhances the immune therapeutic effects of a vaccine targeting HPV-associated tumors”. Salvador, Brasil, 2007.
- Participou do evento 6th International mRNA Health Conference, com apresentação do trabalho intitulado “Tattooing device as an efficient strategy to deliver liposomes carrying mRNA”, Boston, EUA, Novembro de 2018.
- Participou do evento 7th International mRNA Health Conference, com apresentação do trabalho intitulado “RNA-based vaccines for the control of HPV-16 induced tumors”, Berlin, Germany, Novembro de 2019.

Supervisão de estudante da graduação:

- **Kathyanne Hosokawa Costa.** Vacinas terapêuticas para controle de tumores induzido por HPV. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Biomedicina) - Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas.

APÊNDICE B – Artigos científicos de primeira autoria publicados durante o período do doutorado

Artigo no prelo

Comparative evaluation of self-amplifying and non-replicating mRNA-LNP vaccine platforms in an HPV-associated mouse tumor model

Jamile Ramos da Silva^{1,2}, Karine Bitencourt Rodrigues¹, Natiely Silva Sales¹, Hiromi Muramatsu², Mariângela de Oliveira Silva¹, Bruna F.M.M. Porchia^{3,4}, Ana Carolina Ramos Moreno¹, Luana Raposo M.M. Aps^{1,4}, Aléxia Adrienne Venceslau-Carvalho¹, István Tombácz², Wesley Luzetti Fotoran⁵, Katalin Karikó⁶, Paulo J. C. Lin⁷, Ying K. Tam⁷, Mariana de Oliveira Diniz¹, Norbert Pardi^{2#‡*} and Luís Carlos de Souza Ferreira^{1‡*}

1. Vaccine Development Laboratory, Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.
2. Department of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA USA.
3. Laboratory of Tumor Immunology, Department of Immunology, Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil
4. ImunoTera Soluções Terapêuticas Ltda., Sao Paulo, 05508-000, Brazil.
5. Department of Parasitology, Institute for Biomedical Sciences, University of São Paulo, SP, Brazil.
6. BioNTech SE, Mainz, Germany
7. Acuitas Therapeutics, Vancouver, BC V6T1Z3, Canada.

Current address: Department of Microbiology, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA.

‡ These authors contributed equally to this work.

* To whom correspondence should be addressed: pnorbert@penmedicine.upenn.edu and lcsf@usp.br

Running title: anti-tumor effects of a single low-dose mRNA-LNP.



Oncolmmunology



ISSN: (Print) (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/koni20>

A therapeutic DNA vaccine and gemcitabine act synergistically to eradicate HPV-associated tumors in a preclinical model

Jamile Ramos da Silva, Ana Carolina Ramos Moreno, Natiely Silva Sales, Mariângela de Oliveira Silva, Luana R. M. M. Aps, Bruna F.M.M. Porchia, Karine Bitencourt Rodrigues, Natália Cestari Moreno, Aléxia Adrienne Venceslau-Carvalho, Carlos Frederico M. Menck, Mariana de Oliveira Diniz & Luís Carlos de Souza Ferreira

To cite this article: Jamile Ramos da Silva, Ana Carolina Ramos Moreno, Natiely Silva Sales, Mariângela de Oliveira Silva, Luana R. M. M. Aps, Bruna F.M.M. Porchia, Karine Bitencourt Rodrigues, Natália Cestari Moreno, Aléxia Adrienne Venceslau-Carvalho, Carlos Frederico M. Menck, Mariana de Oliveira Diniz & Luís Carlos de Souza Ferreira (2021) A therapeutic DNA vaccine and gemcitabine act synergistically to eradicate HPV-associated tumors in a preclinical model, *Oncolmmunology*, 10:1, 1949896, DOI: [10.1080/2162402X.2021.1949896](https://doi.org/10.1080/2162402X.2021.1949896)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/2162402X.2021.1949896>



© 2021 The Author(s). Published with license by Taylor & Francis Group, LLC.



[View supplementary material](#)



Published online: 25 Jul 2021.



[Submit your article to this journal](#)



[View related articles](#)



[View Crossmark data](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=koni20>

A therapeutic DNA vaccine and gemcitabine act synergistically to eradicate HPV-associated tumors in a preclinical model

Jamile Ramos da Silva^a, Ana Carolina Ramos Moreno^a, Natiely Silva Sales^a, Mariângela de Oliveira Silva^a, Luana R. M. M. Aps^a, Bruna F.M.M. Porchia^{a,b}, Karine Bitencourt Rodrigues^a, Natália Cestari Moreno^{c,d}, Aléxia Adriane Venceslau-Carvalho^a, Carlos Frederico M. Menck^e, Mariana de Oliveira Diniz^{a,e}, and Luís Carlos de Souza Ferreira^a

^aVaccine Development Laboratory, Department of Microbiology, Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; ^bLaboratory of Tumor Immunology, Department of Immunology, Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; ^cDNA Repair Laboratory, Department of Microbiology, Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; ^dMitochondrial Genetics Lab. Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; ^eDivision of Infection and Immunity, University College London, 5 University St, Bloomsbury, London, UK

ABSTRACT

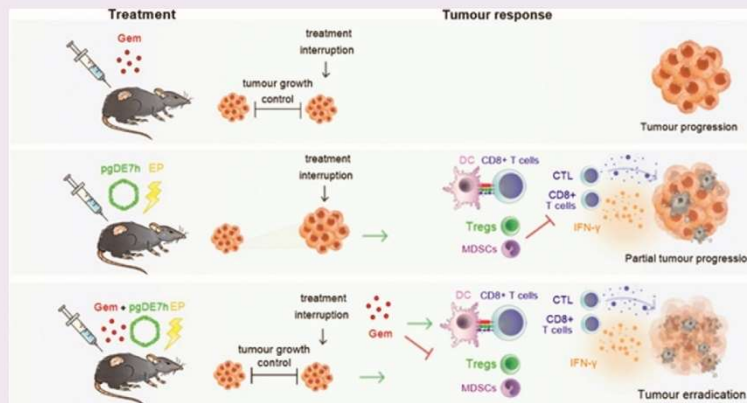
Although active immunotherapies are effective strategies to induce activation of CD8⁺ T cells, advanced stage tumors require further improvements for efficient control. Concerning the burden of cancer-related to Human papillomavirus (HPV), particularly the high incidence and mortality of cervical cancer, our group developed an approach based on a DNA vaccine targeting the HPV-16 E7 oncoprotein (pgDE7h). This immunotherapy is capable of inducing an antitumour CD8⁺ T cell response but show only partial control of tumors in more advanced growth stages. Here, we combined a chemotherapeutic agent (gemcitabine-Gem) with pgDE7h to overcome immunosuppression and improve antitumour responses in a preclinical mouse tumor model. Our results demonstrated that administration of Gem had synergistic antitumor effects when combined with pgDE7h leading to eradication of both early-stages and established tumors. Overall, the antiproliferative effects of Gem observed *in vitro* and *in vivo* provided an optimal window for immunotherapy. In addition, the enhanced antitumour responses induced by the combined therapeutic regimen included enhanced frequencies of antigen-presenting cells (APCs), E7-specific IFN- γ -producing CD8⁺ T cells, and cytotoxic CD8⁺ T cells and, concomitantly, less pronounced accumulation of immunosuppressive myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) and regulatory T cells (Tregs). These findings demonstrated that the combination of Gem and an active immunotherapy strategy show increased effectiveness, leading to a reduced need for multiple drug doses and, therefore, decreased deleterious side effects avoiding resistance and tumor relapses. Altogether, our results provide evidence for a new and feasible chemoimmunotherapeutic strategy that supports future clinical translation.



ARTICLE HISTORY


Received 30 April 2021
Revised 24 June 2021
Accepted 24 June 2021

KEYWORDS

Cancer; HPV-16;
immunotherapy;
chemotherapy;
immunosuppression



CONTACT Luís Carlos de Souza Ferreira  lcsf@usp.br  Vaccine Development Laboratory, Department of Microbiology, Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1374, São Paulo - SP, São Paulo 05508-000, Brazil

 Supplemental data for this article can be accessed on the publisher's website

© 2021 The Author(s). Published with license by Taylor & Francis Group, LLC.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Introduction

Human papillomavirus (HPV) is the second most common infectious agent associated with cancer in humans, with an estimated worldwide burden of 690,000 cases of cancer per year.¹ In particular, HPV-16 and HPV-18 are the most common viral types with oncogenic potential.² HPV is associated, at different rates, with several types of anogenital and oropharynx cancers and, notably, is the causal factor of almost all cervical cancer cases, the fourth leading cancer type in incidence (570,000/year) and mortality (311,000/year) in women.³ Indeed, the global burden of cervical cancer is expected to increase in the coming years.⁴ Vaccines to prevent HPV infection have been available for the last ten years, but worldwide coverage is still low, especially in developing countries, where most HPV-associated mortality occurs. People who are unvaccinated or already infected by oncogenic HPV types remain at risk of developing cancer and rely on currently available treatments.

The treatment options for HPV-induced tumors are mainly surgery, chemotherapy, and/or radiotherapy. Considering cervical cancer, the 5-year overall survival rate is approximately 92% for early-stage lesions, but the rate drops to approximately 50% for stage III cancer cases and 17% for more advanced-stage cancer cases.^{5,6} Although the current treatments provide positive survival outcomes, they are often associated with debilitating adverse effects and resistance to therapy. In addition, tumor relapse is frequently observed, particularly in patients diagnosed with tumors at an advanced stage.⁷ Thus, the development of alternative therapeutic approaches for HPV-associated tumors with reduced toxicity and enhanced long-term efficacy is urgently needed.

Gemcitabine (Gem) is a nucleoside analogue used in the clinic for a wide range of tumors, such as non-small cell lung cancer, pancreatic cancer, bladder cancer, and breast cancer.^{8,9} The cytotoxic effects of Gem on tumor cells are associated with the inhibition of DNA replication and DNA repair mechanisms.¹⁰ Monotherapy with high doses of Gem is commonly related to hematologic toxicity and resistance following multiple administrations.^{11,12} The use of lower doses of Gem has been shown to induce milder toxicity, preserving its antitumor effects and improving patient quality of life.¹³ Alternatively, clinical trials have reported synergistic antitumor effects following combination treatment with Gem and other drugs or immunotherapeutic approaches.^{14,15} The coadministration of Gem and DC-based immunotherapy has been shown to induce the activation of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) against advanced pancreatic cancers.¹⁶

Gem can act as an adjuvant to immunotherapy by promoting increased MHC-I expression on tumor cells *in vivo* and *in vitro*, favoring tumor cell recognition by cytotoxic T cells.¹⁷ Additionally, Gem plays an active role in inhibiting the proliferation of immunosuppressive cells, such as myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) and regulatory T cells (Tregs), but does not induce parallel effects on effector T cells.¹⁸ Gem was found to inhibit STAT3 phosphorylation in myeloid cells,¹⁹ a transcription factor essential for the survival and proliferation of MDSCs and the differentiation of Tregs.²⁰ Therefore, Gem can potentially contribute to modulating some of the

immunosuppressive mechanisms present in the tumor microenvironment.

Given the high numbers HPV-attributable tumors and the crucial need to develop alternative therapies with reduced toxicity and enhanced efficacy, we evaluated a new antitumor treatment involving the use of Gem with a DNA vaccine capable of inducing robust HPV-specific T cell responses. The DNA vaccine pgDE7h encodes HPV-16 E7 fused to herpes simplex virus type 1 (HSV-1) glycoprotein D (gD).^{21,22} Previous results demonstrated that administration of this vaccine therapeutically induced the activation of E7-specific CD8⁺ T cells and antitumor protection against early-stage tumors in mice.^{22–24} In the present study, we focused on the combination of Gem and pgDE7h, aiming to improve the treatment efficacy, particularly against tumors in more advanced stages of development. Our results demonstrated the synergistic antitumor effects of the combined therapy with simultaneous control of immunosuppressive responses, induction of tumor-specific cytotoxic CD8⁺ T cells, and complete eradication of established tumors at experimental conditions.

Materials and methods

TC-1 cells

The TC-1 tumor cell line was kindly provided by Dr. T.C. Wu (Johns Hopkins University, MD, USA) and was generated by transformation of primary C57BL/6 mouse lung epithelial cells with c-Ha-ras and the HPV-16 E6 and E7 oncogenes.²⁵ TC-1 cells were maintained in RPMI 1640 medium (Gibco; MA, USA) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Vitrocell, SP, BRA), 50 U/ml penicillin G/streptomycin, and 0.4 mg/ml G418 and were maintained at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere.

Wound healing assay

TC-1 cells (5×10^5) were seeded in 24-well plates and cultured at 37°C in 5% CO₂ until 95% confluent, which took approximately 18 to 24 h. Afterward, a wound was made in the monolayer by carefully scratching it with a sterile 200- μ L pipette tip. Next, fresh medium containing 50 nM or 500 nM Gem was added to the cells. Untreated cells were used as a control. After 18 h, bright-field images were obtained using an EVOS[®] FL Cell Imaging System light microscope (Thermo Fisher Scientific, MA, USA).

Spheroids and viability

Multicellular three-dimensional (3D) spheroids of TC-1 cells were prepared according to the following protocol. First, in a 96-well U-bottom plate, 50 μ L of a PBS solution with 1% agarose was carefully applied to each well. After 30 min, 7×10^3 TC-1 cells, at a final volume of 200 μ L, were carefully added to 50 μ L of the agarose matrix previously added to each well. Then, the plate was centrifuged for 5 min at 290 g and room temperature in a swing-out rotor. The cells were cultured at 37°C and 5% CO₂ for 4 days until spheroid formation. Next, 100 μ L of culture medium was carefully removed from each well, and

fresh medium containing Gem was added to the wells such that the final concentration reached 50 or 500 nM. Untreated cells were used as a control group to normalize the data. The spheroids were treated for 72 h. Spheroid images were obtained by bright-field microscopy for spheroid size evaluation. Next, spheroid viability was assessed using ethidium bromide (EB) incorporation in combination with acridine orange (AO) staining (50 µg/mL of each dye). Images were acquired with an EVOS® FL Cell Imaging System (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Green indicates live cells, and red indicates dead cells.

Cell proliferation (WST-1) assay

TC-1 cells were seeded at a concentration of 1×10^4 cells/well in a 96-well flat-bottom plate. Following overnight resting, fresh medium with or without 50 nM or 500 nM Gem was added to the cells. At different incubation time points (4, 6, 8, 12, and 24 h), 10 µL of Cell Proliferation Reagent WST-1 (Roche, BS, SWI, cat. #11644807001) was added to each well, mixed, and incubated for 1 h at 37°C in 5% CO₂. Cell viability was estimated by measuring the absorbance at 480 nm. The cell viability percentage was calculated based on the average of triplicate wells using the following calculation: [(Absorbance treated cells/absorbance untreated cells) × 100]; values were normalized by the percentage of the control group (untreated cells).

Cell cycle profiling and DNA damage induction

Cells were treated with 50 or 500 nM Gem and harvested after 24 h. For concomitant cell cycle profiling and DNA damage analysis, cells were detached with trypsin and fixed with formaldehyde (1%) on ice for 15 min. Next, the cells were centrifuged (1500 rpm, 10 min), washed with PBS, centrifuged again, and suspended in 70% ice-cold ethanol. The cells were incubated in ethanol for at least 24 h at -20°C. After this time, the cells were centrifuged (4000 rpm, 5 min), washed with 500 µL of PBS-T-BSA (PBS, 0.2% Triton X-100, and 1% FBS), centrifuged again and permeabilized with PBS-T-BSA for 5 min. Subsequently, the cells were centrifuged, and the pellet was incubated in 50 µL of anti-γH2AX antibody (Sigma-Aldrich, MO, USA) overnight at 4°C. Next, the pellet was washed twice with PBS-T-BSA and incubated in anti-mouse-FITC (Sigma-Aldrich, MO, USA) for 1 h in the dark at room temperature. After this period, the cells were washed as previously described. For cell cycle analyses, the same samples were suspended in 200 µL of propidium iodide (200 µg/mL RNase A, 20 µg/mL PI, and 0.1% Triton X-100 in filtered PBS) for 40 min at room temperature. Next, the cells were washed twice with filtered PBS and suspended in 200 µL of filtered PBS for cytometric analysis. Flow cytometry was performed to evaluate the cell cycle profile and DNA damage induction indirectly through the anti-γH2AX antibody. The γH2AX signal and PI fluorescence in 10,000 cells were analyzed using an Accuri C6 BD cytometer (BD Bioscience, CA, USA) and BD CSampler analysis software.

Mice

Wild-type female C57BL/6 mice aged six to eight weeks were purchased from the Animal Breeding Center at Medical School

(University of Sao Paulo). Female C57BL/6 IFN-γ knockout (KO) and C57BL/6 CD8⁺ T cell KO mice were provided by the facility Animal Breeding Center of the Department of Immunology at the University of São Paulo. All mice were housed at the Microbiology Department of the same university. Experimental procedures were carried out following guidelines established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and animal protocols were approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA) on August 18, 2014 (project number 92/2014 and 84/2017).

Tumor cell challenge

Mice were subcutaneously injected with 1×10^5 TC-1 cells per mouse in 100 µL of FBS-free RPMI medium in the right dorso-lateral region. Tumor growth was monitored 2 times a week with callipers to determine the smaller (d) and larger (D) diameters of the tumor. Tumor size is expressed as volume, which was calculated according to the formula $D \times d^2/2$. Mouse survival was recorded for at least 60 days, mice were euthanized when tumors reached 15 mm of diameter or became necrotic. Tumor-free mice received a second tumor challenge with implantation of 10-fold more TC-1 cells (1×10^6 cells per mouse) 60 days after the first challenge.

Vaccine and immunization

To generate the vaccine pgDE7h, a gene sequence encoding the HPV-16 E7 protein genetically fused to HSV-1 gD was cloned into a pUMVC3 vector (Aldevron, ND, USA) as described previously.^{26,27} The therapeutic protocol started 5 days after TC-1 cell transplantation (early stage) or when the tumor reached 3 mm in diameter (established tumors). For early-stage immunization protocols, mice were injected with two doses of 50 µg of pgDE7h vaccine with a one-week interval by conventional intramuscular (i.m.) inoculation of the tibialis anterior muscle. In experiments using established tumors, mice were also vaccinated with two doses of the pgDE7h vaccine (5 µg per dose) i.m. associated with *in vivo* electroporation (EP) using the NEPA21 Super Electroporator (NepaGeneCo., Ltd., Chiba, JPN) as described previously.²⁴ Chemotherapy consisted of intraperitoneal administration of two doses of gemcitabine hydrochloride (80 mg/kg, Gemzar, Lilly, SP, BRA) with a one-week interval.

Immunological assays

For *in vivo* cytotoxicity assays, splenocyte suspensions from naive mice were stained with carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE; Invitrogen) at a final concentration of 0.7 µM (CFSE_{low}) or 7 µM (CFSE_{high}). The CFSE_{high} population was pulsed with 2.5 µg/mL CD8-specific E7 peptide (₄₉RAHYNIVTF₅₇, GenScript, NJ, USA) for 40 min at 37°C. Equal numbers of pulsed and unpulsed cells were injected intravenously (a total of 2×10^7 cells/mouse) into mice immunized two weeks prior. Splenocytes were harvested 18 h later, and the cell suspension was analyzed for CFSE expression by flow cytometry on an LSRFortessa (BD Biosciences, CA, USA).

The percentages of lysed cells were determined by the following formula: $[1 - (\% \text{CFSE}^{\text{high}} \text{ immunized} / \% \text{CFSE}^{\text{low}} \text{ immunized}) / (\% \text{CFSE}^{\text{high}} \text{ naive} / \% \text{CFSE}^{\text{low}} \text{ naive})] \times 100$. For identification of antigen-specific T cells, a splenocyte suspension was incubated with anti-CD16/CD32 Fc receptor blocking reagent (eBioscience, CA, USA). Splenocytes were then labeled with E7-specific APC-conjugated MHC-class I Dextramer (Immudex, KBH, DNK) according to the manufacturer's recommendations. Subsequently, the cell surface was stained with anti-CD8a (FITC) and anti-CD3 (PE-Cy5) monoclonal antibodies (mAbs). For memory phenotyping assays and intracellular staining (ICS) for IFN- γ production, splenocytes were cultured at a concentration of 2×10^6 cells/well in the presence of brefeldin A (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ – GolgiPlug; BD Biosciences, CA, USA) and recombinant mouse IL-2 (5 ng/ml) with or without a CD8-specific E7 peptide (${}_{49}\text{RAHYNIVTF}_{57}$; GeneScript; 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) at 37°C and 5% CO_2 . After 12 h of stimulation, the cell surface was stained with anti-CD3 (PE-Cy5), anti-CD8a (BV605), anti-CD44 (FITC), and anti-CD62L (BV421) mAbs. Next, the surface-stained cells were fixed and permeabilized using Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences, CA, USA) and intracellularly stained with an anti-IFN- γ antibody (Alexa Fluor 700). The number of activated cells was determined based on the phenotype $\text{CD3}^+ \text{CD8}^+ \text{CD44}^+ \text{IFN-}\gamma^+$ and effector memory (Tem) cells were detected by the surface phenotype $\text{CD3}^+ \text{CD8}^+ \text{CD44}^+ \text{CD62L}^-$ T cells. Alternatively, the percentages of $\text{CD8}^+ \text{IFN}\gamma^+$ cells in the $\text{CD8}^+ \text{CD3}^+$ T cell gate were determined. Results were calculated by subtracting the percentages of unstimulated cells from the percentages of stimulated cells. The phenotypes of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) and dendritic cells (DCs) were determined after surface labeling of cells with anti-CD11b (FITC), anti-Gr1 (APC), anti-CD11c (PE-Cy7), anti-I-A/IE (MHC-II, BV421), anti-Ly6C (PerCP-Cy5.5), and anti-F4/80 (PE) mAbs. MDSCs were characterized as $\text{CD11b}^+ \text{Gr-1}^+$. For Tregs assays, surface anti-CD3 (APC-Cy7), anti-CD4 (BV605) and anti-CD25 (BB515) mAbs and an anti-FoxP3 (BV421) mAb were used after cell permeabilization with FoxP3 Staining Buffer (eBioscience, CA, USA). All antibodies were purchased from eBioscience, BD, or BioLegend (CA, USA). The samples were analyzed on an LSRFortessa flow cytometer (BD Bioscience, CA, USA), and data were analyzed with FlowJo software. All analyses were performed after the initial exclusion of doublets using the FSC and SSC parameters.

Quantification and statistical analysis

t-distributed stochastic neighbor (t-SNE) analyses were run using concatenated flow cytometry data (5,000 events/sample) under default parameters (iterations: 2,000, perplexity: 50, and u : 0.5) using FlowJo software. t-SNE was applied to expression data for Gr-1, Ly6C, F4/80, MHC-II, and CD11c after down-sampling pre-gating on $\text{CD11c}^+ \text{CD11b}^+$ single cells. The samples were merged to create a single t-SNE map and grouped according to treatment. The Circle shows the clustered population with the MDSCs APC phenotype defined as $\text{Gr-1}^+ \text{Ly6C}^+ \text{F4/80}^+ \text{MHC-II}^+ \text{CD11c}^+$. t-SNE heatmaps show the median fluorescence intensity (MFI) of the markers Gr-1 and MHC-II in all samples overlaid on the t-SNE projection. The scales on

the heat maps were individually generated for each surface marker from low to high expression. Additional statistical analyses were performed with GraphPad Prism software, version 8.0. To compare different immunization groups, one- or two-way ANOVA with multiple comparisons and Bonferroni post hoc tests were performed. Survival curves were compared using the log-rank (Mantel-Cox) test. All tests were performed as two-tailed tests, and significance levels were defined as $p < .05$ (* $p < .05$; ** $p < .01$ and *** $p < .001$) with a confidence interval of 95%. Appropriate methods are indicated in the legends with significant differences marked in all figures. Figures were prepared using GraphPad Prism, Adobe Illustrator 2020 (Adobe Systems, San Jose, CA) and Autodesk SketchBook Pro 2021 software.

Results

Gem limits the proliferation of TC-1 tumor cells in vitro

The antitumour effects of Gem were initially evaluated *in vitro* using TC-1 cells capable of expressing the HPV-16 E6 and E7 oncoproteins, either in monolayer (2D) or spheroid (3D) cultures. The 2D cultures treated with 50 nM Gem did not show any significant inhibitory effects in cell migration assays compared to untreated cultures (Figure 1a-b). However, exposure to 500 nM Gem significantly reduced TC-1 cell migration (Figure 1a-b). In contrast, when spheroids were treated with Gem, clear inhibition of cell proliferation was detected with both 50 nM and 500 nM (Figure 1c-d). Gem also displayed cytotoxic effects on 2D TC-1 cultures at both 50 nM and 500 nM, with viability dropping to 70% and 40%, respectively, after 24 h (Figure 1e). Although 50 nM Gem decreased spheroid growth, this treatment did not induce significant cell death. In contrast, 500 nM Gem halted spheroid growth and caused significant cell death (Figure 1f). Gem also caused dose-dependent cell cycle arrest in TC-1 cells *in vitro*. In 2D cultures, most of the cells were arrested in G1 phase at both concentrations at 24 h post treatment (Figure 1g). Finally, Gem caused significant DNA damage, as measured by evaluating the phosphorylation of H2AX, resulting in γH2AX formation, a biomarker of genotoxic stress. Notably, both concentrations of Gem increased the formation of γH2AX in treated TC-1 cells (Figure 1g-h).

The combination of gem and pgDE7h promotes synergistic antitumour effects on early-stage HPV-associated tumors

We previously reported that immunizations with pgDE7h conferred partial therapeutic antitumour protection in mice after transplantation of TC-1 cells.²² To evaluate whether Gem can enhance the therapeutic antitumour effects of the therapeutic vaccine, we treated mice with two doses of Gem (80 mg/kg) combined with pgDE7h (50 $\mu\text{g}/\text{dose}$) or not at 5 and 12 days after TC-1 cell transplantation. Gem treatment alone promoted an initial delay in tumor growth, but growth promptly resumed after interruption of treatment, and all animals had to be euthanized before the end of the observation period (Figure 2a-d). Immunization with pgDE7h showed a slight protective antitumour effect, with only 20% of mice remaining

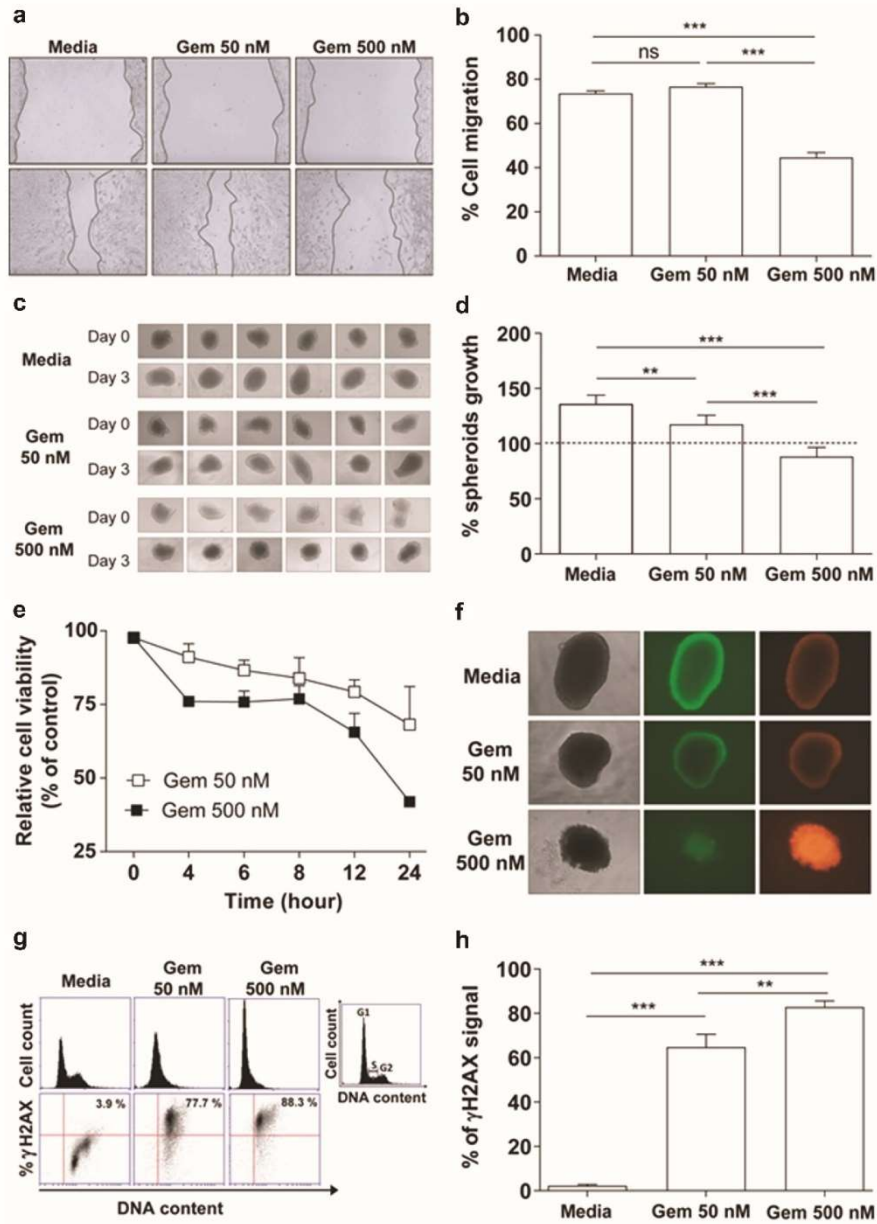


Figure 1. *In vitro* effects of Gem on TC-1 cells. (a) Regenerative growth (cell migration) following disruption of TC-1 cell monolayers incubated in the presence of 50 nM or 500 nM Gem for 15 h. Cells cultured in RPMI medium plus 10% FBS were used as reference controls. (b) Relative TC-1 monolayer regeneration based on the experiment described in (A). Values represent the percentage of TC-1 cells that migrated after Gem treatment. The error bars correspond to the SEM of 8 experiments. (c) Multicellular three-dimensional (3D) spheroids of TC-1 cells cultured for three days with or without Gem at 50 nM or 500 nM. Control cells were cultured in the medium alone. (d) Quantification of TC-1 spheroid growth after treatment with Gem. The dashed line represents the initial area of TC-1 spheroids before treatment with Gem. The values are the mean \pm SEM of 6 experiments. (e) Sensitivity of TC-1 cells to Gem (50 nM and 500 nM) evaluated by a WST-1 assay at different time points after exposure. Nontreated cells were used as a control to normalize the values measured for treated cells. (f) Bright-field (left images) and fluorescence microscopy images (central – acridine orange, right – ethidium bromide) of TC-1 3D spheroids to evaluate morphology (density) and viability, respectively, three days after cultivation with or without Gem for three days. (g) TC-1 cell cycle arrest promoted by Gem. Representative histograms of cell cycle profiles (top line) and representative immunostaining for γ H2AX (bottom line) to detect genotoxic stress in TC-1 cells by flow cytometry after 24 h of treatment with Gem (50 or 500 nM). (h) Quantification of γ H2AX levels in the cells described in (G). All data are presented as the mean \pm SEM based on 2 independent experiments performed in triplicate. Statistical significance: (***) $p < .01$ and (***) $p < .001$ by ANOVA. (ns) Non-significant.

tumor-free (Figure 2b-d). Nonetheless, the combination of Gem and pgDE7h elicited synergistic antitumour effects and promoted full tumor protection until the end of the observation period (Figure 2b-d). We also measured CD8⁺ T cell responses and immunosuppressive cell expansion in mice subjected to the combined treatment. As shown in Figure 2e, mice treated with pgDE7h or with Gem plus pgDE7h showed increased frequencies of E7-specific IFN- γ -producing CD8⁺ T cells compared with mice treated with only Gem or sham treatment (Figure 2e). In agreement with the literature, mice treated with Gem efficiently block expansion of MDSCs, but did not alter the frequencies of Tregs in the spleen (Figure 2f-g). In contrast, mice subjected to the combined treatment showed reduced expansion of Tregs and MDSCs in comparison with mice immunized with pgDE7h or treated only with Gem (Figure 2f-g).

The combination of gem and pgDE7h delivered by electroporation confers full protection against established tumors

We next evaluated whether the combined treatment is capable of controlling tumors at more advanced growth stages. For these experiments, mice bearing tumors with an average diameter of 3 mm were treated with two doses of pgDE7h (5 μ g/dose) delivered by electroporation (pgDE7h EP) with or without Gem 10 and 17 days after tumor cell engraftment (Figure 3a). All mice treated with Gem combined with pgDE7h EP showed full eradication of established tumors (Figure 3b-c). Under the same conditions, mice that received Gem or pgDE7h EP alone displayed significantly reduced tumor growth but showed no or 40% antitumour protection, respectively, until the end of the observation period (Figure 3b-c). In order to determine whether the combination treatment would prevent tumor relapses, immunized mice were grafted with a second load of TC-1 cell (with 10-fold higher compared with the first tumor cell engraftment) 60 days after the first challenge. The mice treated with pgDE7h EP, with or without combination with Gem, efficiently eliminated TC-1 tumor cells and displayed full protection from tumor recurrence, which demonstrated the long-lasting immune protection induced by the vaccine-based treatment.

The role of effector CD8⁺ T cells in the protective effects conferred by the combined treatment was investigated in knockout mice genetically deficient in CD8⁺ T cells (CD8 KO) or IFN- γ (IFN- γ KO). The antitumour protection elicited in immunocompetent mice was completely abrogated in CD8 KO and IFN- γ KO mice (Figure 3d-e). Indeed, CD8 KO and IFN- γ KO mice treated with Gem or Gem combined with pgDE7h EP exhibited transient tumor growth and delayed mortality, but none of the treated animals remained tumor-free at the end of the observation period (Figure 3d-e). Collectively, these results indicate that the antitumour growth effects induced by the combined treatment require activation of CD8⁺ T cells and IFN- γ responses.

Gem treatment enhances the pgDE7h-induced activation of cytotoxic E7-specific CD8⁺ T cells

To elucidate the immunological basis of the antitumour effects observed after combination treatment with Gem and pgDE7h EP, CD8⁺ T cell responses were measured in the spleen of mice subjected to the treatment (Figure 3a). Mice treated with pgDE7h EP showed no significant increase in the relative numbers of E7-specific CD8⁺ T cells compared with mice treated with only Gem or sham treatment (Figure 4a-b). However, mice treated with Gem and pgDE7h EP showed a significant increase in the number of E7-Dex⁺ cells compared to mice treated with Gem or immunized only with pgDE7h EP (Figure 4a-b). Overall, the combined use of Gem and pgDE7h EP induced enhanced numbers of E7-specific CD8⁺ T effector memory (Tem) cells (CD8⁺ CD44^{high} CD62L⁻) compared to treatment with Gem or pgDE7h EP (Figure 4c). Notably, only mice treated with the combined therapy exhibited high frequencies of activated CD8⁺ T cells (% CD44⁺ IFN- γ ⁺ CD8⁺ T cells) (Figure 4d).

We next determined the *in vivo* cytotoxic activity of E7-specific CD8⁺ T cells. Mice treated with pgDE7h EP showed an increased killing capacity directed against target cells loaded with the E7-specific peptide corresponding to the MHC-I-restricted CD8⁺ T cell epitope (Figure 4e-f). Moreover, the *in vivo* E7-specific cytotoxic activity of CD8⁺ T cells was significantly enhanced in mice treated with Gem and pgDE7h EP compared with those treated with only pgDE7h EP (Figure 4e-f). Taken together, these results demonstrate that administration of Gem and pgDE7h EP enhances the activation of antigen-specific CD8⁺ T cells, particularly T cells with the Tem cell phenotype, and endows them with *in vivo* cytotoxic activities.

We also investigated whether the combination of Gem and pgDE7h EP impacts the modulation of immunosuppressive cells (MDSCs) and promotes the activation of APCs. Mice treated with Gem, with or without combination with pgDE7h EP, showed higher frequencies of splenic DCs (CD11c⁺ MHC-II⁺ Ly6C⁻ F4/80⁻) than mice treated with only pgDE7h EP (Figure 5a). In addition, mice that received any of the treatments showed reduced expansion of MDSCs (CD11b⁺ Gr-1⁺) (Figure 5b). The absence of a significant difference in the percentage of MDSCs in this setting between the monotherapies and combination therapy could be due to the mice having tumors of similar size at the time point evaluated.

To better demonstrate the specific cell population clusters in mice subjected to the different tested treatments, we applied a t-SNE analysis tool to characterize the heterogeneous profiles of splenic MDSCs and APC populations. Based on this analysis, we identified a GR-1⁺ cell cluster expressing high MHC-II levels that was also positive for Ly6C and F4/80 (Figure 5c-d, Supl 1a-b). This result suggested an increase in the MDSCs population with an APC profile. More importantly, the group treated with Gem and pgDE7h had higher frequencies of MHC-II^{high} MDSCs and APCs (CD11b⁺ Gr-1⁺ Ly6C⁺ F4/80⁺ CD11c⁺ MHC-II^{high}) than the other tested mouse groups (Figure 5c-e, Supl 1a-b). Overall, the results indicated that the combination of pgDE7h EP and Gem shifted the phenotype of MDSCs and enhanced the expansion of APCs in treated mice.

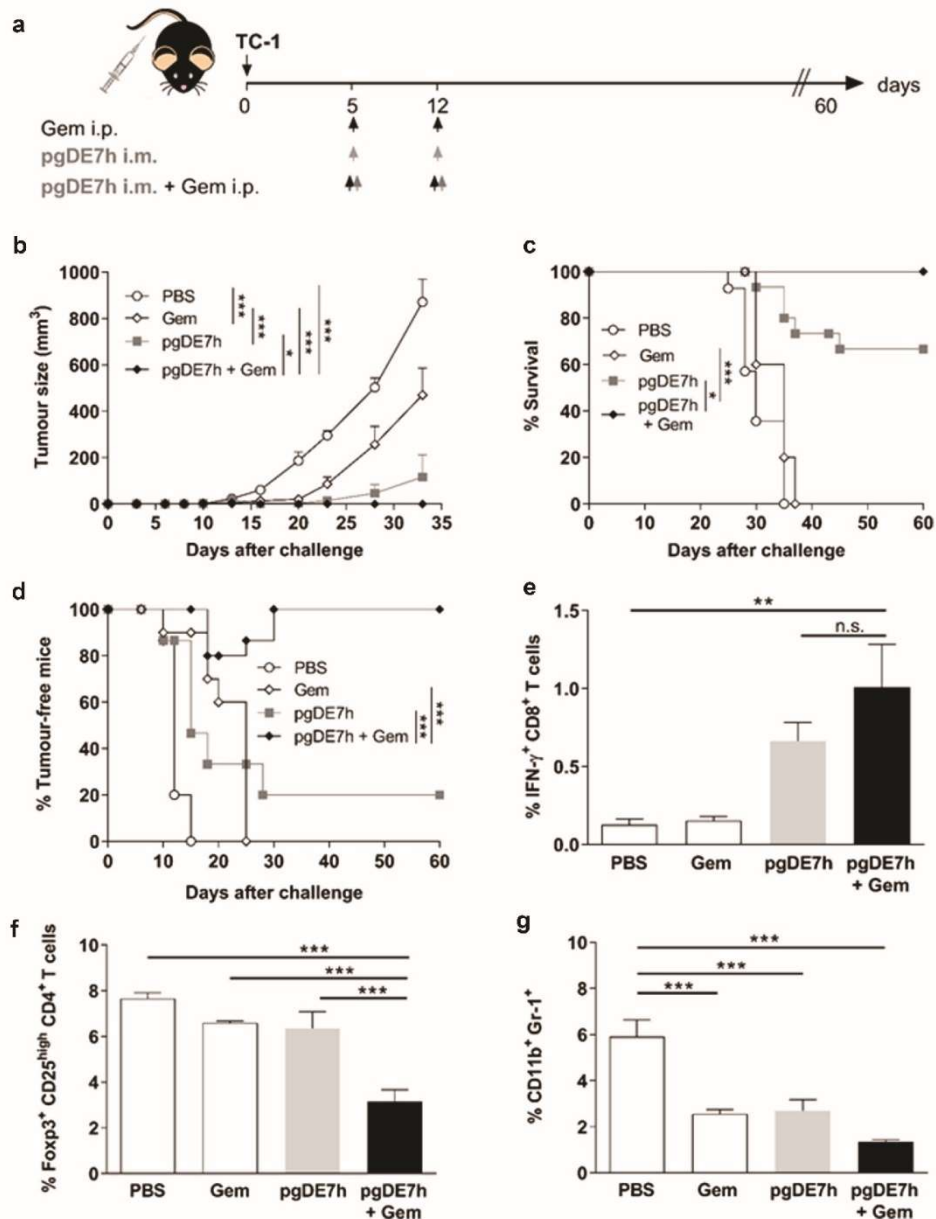


Figure 2. Synergistic antitumour effects observed in mice administered a combination of Gem and pgDE7h to treat early-stage tumors. (a) Schematic representation of the treatment regimen. Mice were transplanted with 1×10^5 TC-1 cells per mouse. On days 5 and 12 post-tumor implantation, the mice received Gem (80 mg/kg) via i.p. injection and/or i.m. immunization with pgDE7h (50 μ g/dose). Groups of mice were inoculated with PBS or only Gem as controls. (b) Tumor sizes were measured over time (two-way ANOVA). Each symbol and bar represent the mean tumor volume, and values are expressed as the mean \pm SEM. (c) Percentages of surviving and (d) tumor-free mice over time (Mantel-Cox log-rank test). (e) Frequencies of IFN- γ -producing CD8⁺ T cells on CD3⁺ CD8⁺ T cell subsets determined by flow cytometry after overnight stimulation with the peptide for the HPV-16 E7 Kb MHC class I-restricted immunodominant epitope at 2 weeks post-immunization. (f) Frequencies of total Tregs cells were determined as CD25^{high} FoxP3⁺ on CD3⁺ CD4⁺ subsets, (g) and MDSCs cells were determined as CD11b⁺ Gr-1⁺ in spleen cells by flow cytometry. Statistically significant differences were determined with ANOVA and Bonferroni's test. The results represent data from 2 independent experiments ($n = 7-10$). Statistical significance: * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$, ns- non-significant.

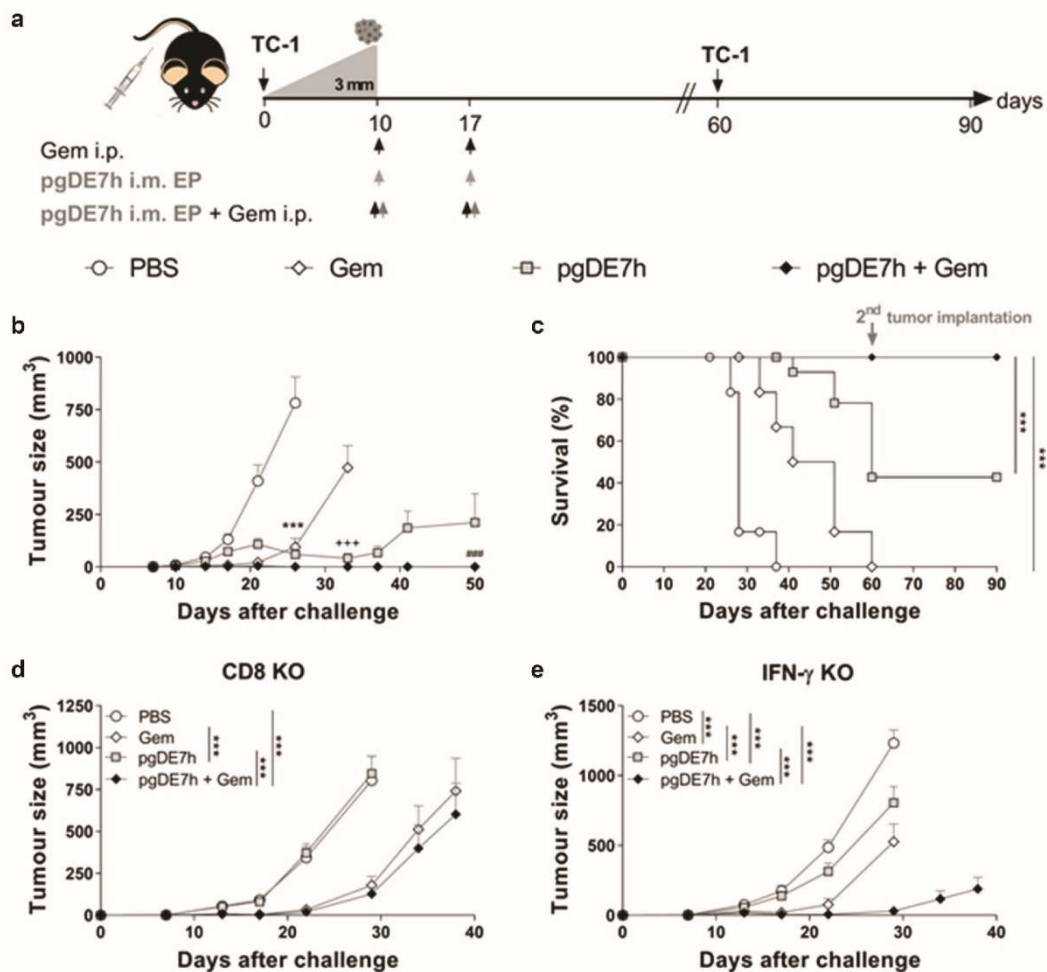


Figure 3. Coadministration of Gem and pgDE7h EP controls established tumors. Tumor-bearing mice (3 mm – approximately 10 days after transplantation) received two doses of Gem (80 mg/kg) via i.p. injection and/or i.m. immunization with 2 doses of pgDE7h (5 μ g/dose) delivered via electroporation at an interval of 7 days. Groups of mice were inoculated with PBS or only Gem as controls. (a) Schematic representation of the treatment regimen. (b) Tumor sizes in mice subjected to the combined treatment. The tumors were measured over time, and the curves are interrupted when one or more animals developed a tumor at a size that required euthanasia (two-way ANOVA). Statistical significance: *** p < .001 the control group versus all groups on day 25, +++ p < .001 Gem versus pgDE7h EP and pgDE7h EP + Gem on day 33, ### p < .001 pgDE7h versus pgDE7h + Gem on day 50. (c) Percentages of surviving mice over time from different groups. Immunized tumor-free mice were grafted with an additional load of TC-1 tumor cells (10-fold higher) 60 days after the first challenge, and protection was followed for 90 days. Data were (n = 7–14) analyzed by the Mantel-Cox log-rank test. Tumor sizes of (d) CD8 KO mice and (e) IFN- γ KO mice (n = 5). Statistical significance: *** p < .001 versus all groups on day 29. Results represent data from 2 independent experiments. Each symbol and bars represent the mean \pm SEM.

Discussion

Herein, we demonstrated the enhanced antitumour therapeutic effects of antigen-specific immunotherapy (pgDE7h) after combination with Gem, leading to eradication of established HPV-associated tumors under experimental conditions. Notably, the tested chemoimmunotherapy combination acted synergistically to increase the anticancer effects induced in treated mice, which were demonstrated by the efficient induction of activated E7-specific cytotoxic CD8⁺ T cells and

reduction in systemic immunosuppressive cellular responses. Administration of two doses of Gem temporarily controlled tumor progression by direct cytotoxic effects on tumor cells without noticeable side effects but was unable to confer long-term protection. In contrast, we demonstrated that the combined Gem and pgDE7h treatment resulted in improved immunomodulatory effects supported by activation of DCs and MDSCs expressing MHC-II, leading to increased antigen presentation and priming of CD8⁺ T cell responses. More relevantly, all mice with established tumors subjected to the

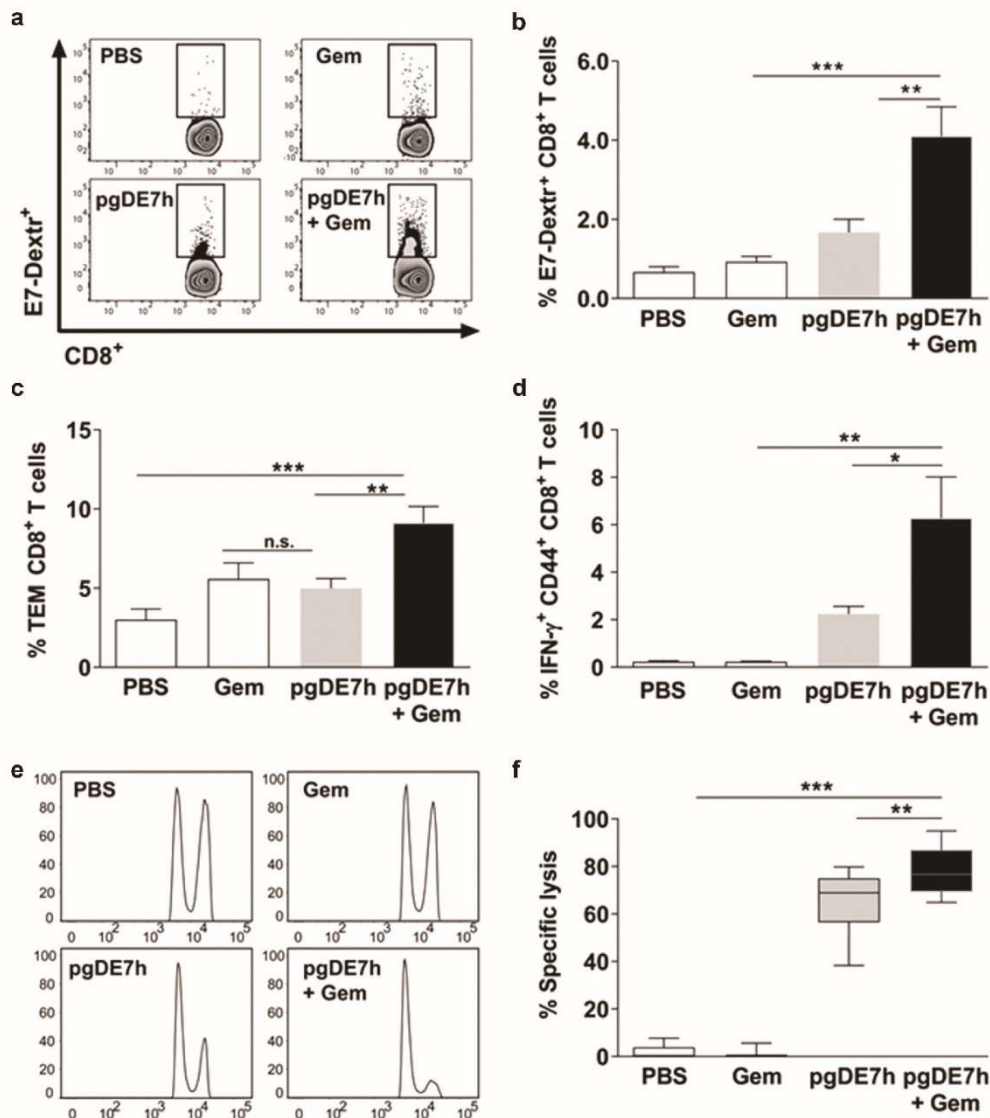


Figure 4. Activation of cytotoxic E7-specific CD8⁺ T cells in mice subjected to treatment with Gem and pgDE7h. Tumor-bearing mice (3 mm) received two i.p. doses of Gem (80 mg/kg) and/or i.m. immunization with pgDE7h (5 μg/dose) via EP at an interval of 7 days. Groups of mice were inoculated with PBS or only Gem as controls. Two weeks after the second immunization, splenocytes were collected and processed for immunological analyses. (a) Representative flow cytometry plots and (b) percentages of E7-specific CD8⁺ T cells determined by H2-Db E7₄₉₋₅₇ (RAHYNIVTF) tetramer staining gated on CD3⁺ CD8⁺ T cell subsets. Frequencies of (c) effector memory T cells (CD8⁺ CD44^{high} CD62L⁻; Tem) in CD3⁺ CD8⁺ T cell subsets and (d) E7-specific CD44^{high} IFN-γ⁺ in CD3⁺ CD8⁺ T cell after stimulation with the HPV-16 E7 Kb MHC class I-restricted immunodominant peptide. (e, f) Two weeks after the second pgDE7h dose, mice received CFSE-labeled splenocytes that were pulsed with the E7-derived peptide or left unpulsed. *In vivo* cytotoxic activity is expressed as results in a histogram (e) and (f) the percentages of target cell lysis. (n = 10). Values are expressed as the mean ± SEM. Statistical analysis: ANOVA, posttest: Bonferroni. *p < .05, **p < .01, ***p < .001.

combined treatment exhibited induction of strong immune responses and elimination of tumors and remained tumor-free through the end of the observation period, even after a tumor challenge two months after the initial graft. Altogether, our results provide experimental evidence for the

improved efficacy of the combination strategy involving chemotherapy (Gem) and active immunotherapy (pgDE7h) with regard to eradication of established HPV-associated tumors.

Understanding the effects of Gem on tumor cells represents a relevant step toward the establishment of improved

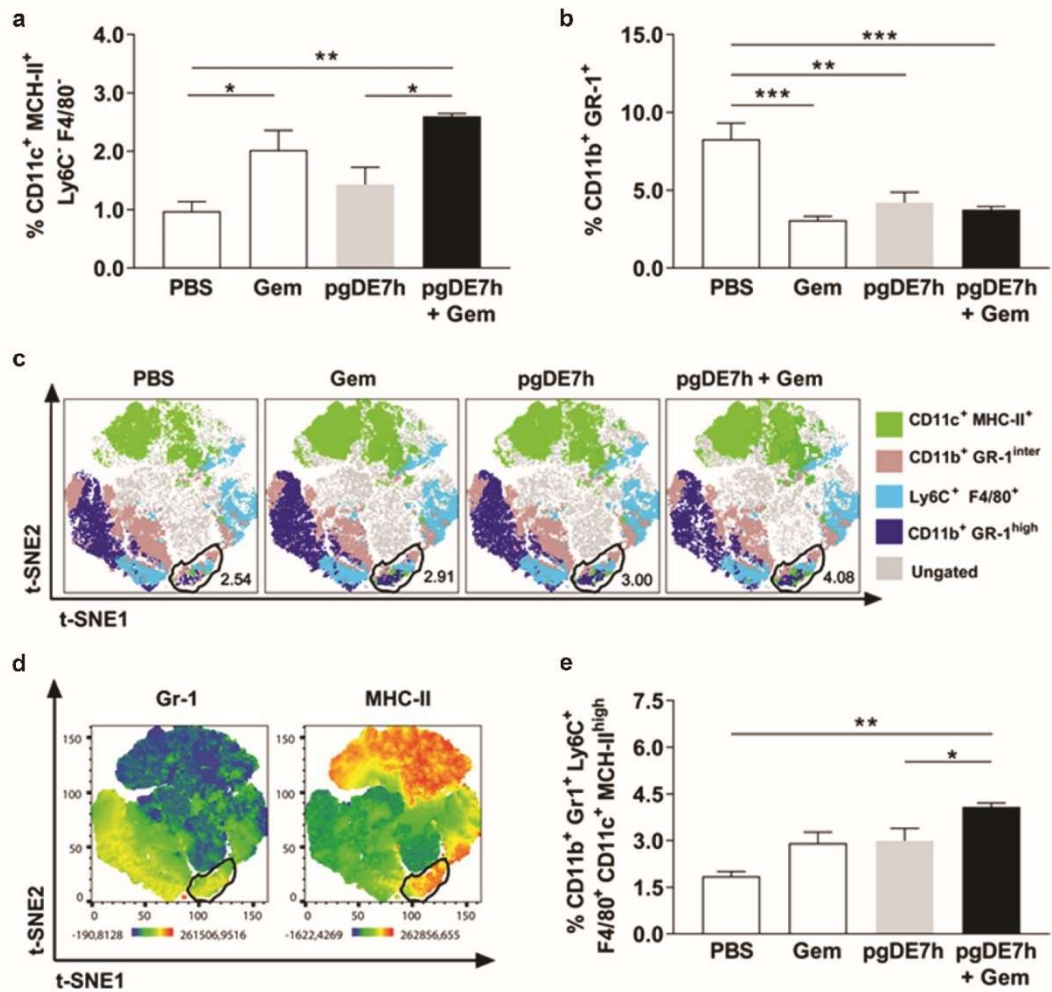


Figure 5. Mice subjected to combined chemoimmunotherapy showed inhibition of the expansion of immunosuppressive cells and promotion of the expansion of APCs. Tumor-bearing mice (3 mm) received two i.p. doses of Gem (80 mg/kg) and/or i.m. immunization with 2 doses of pgDE7h (50 µg/dose) by electroporation at an interval of 7 days. Groups of mice were inoculated with PBS or only Gem as controls. At two weeks after immunization, splenocytes were collected and processed for immunological analyses. (a) The frequencies of CD11b⁺ Gr-1⁺ MDSCs and (b) CD11c⁺ MHC-II⁺ (gated out using the markers F4/80 and Ly6C) cells were determined by flow cytometry. (c) t-SNE projection was performed using 2,000 iterations and a perplexity of 50 from splenocyte samples gated on CD11c⁺ CD11b⁺. The samples were merged to create a single t-SNE map and grouped according to treatment. A circle marks the clustered population with the MDSCs APC phenotype defined as Gr-1⁺ Ly6C⁺ F4/80⁺ MHC-II⁺ CD11c⁺. (d) Heatmaps of the markers Gr-1 and MHC-II in all samples overlaid on the t-SNE projection. (e) The frequencies of MDSCs APC are shown for individual samples defined by the manual gating strategy. Values are expressed as the mean + SEM. Statistical analysis: ANOVA, posttest: Bonferroni. *p < .05, **p < .01, ***p < .001.

anticancer therapies. Several studies have shown the effects of Gem on different tumor cell lines under *in vitro* and *in vivo* conditions. We found direct cytotoxic activity of Gem against TC-1 tumor cells *in vitro* in both 2D and 3D cultures. Such effects included inhibition of cell migration, reduction in cell viability, induction of cell cycle arrest, and genotoxic effects demonstrated by generating γ H2AX, suggesting prevention of malignant progression. These effects also translated into a temporary oncostatic effect of the drug *in vivo* but were

restricted to a short time frame close to the administration of Gem. Indeed, Gem monotherapy shows disease stabilization and good tolerability but has minimal antitumour activity in treating recurrent or advanced-stage cervical cancer patients.^{28,29} Despite its use in the clinic for different types of cancer, Gem is associated with the emergence of drug resistance when used long-term.³⁰ Preclinical studies have demonstrated that long-term use of Gem enhances negative immune checkpoint receptors (PD-L1 and PD-L2) and drug resistance

mediated by TGF- β secretion.³¹ On the other hand, Gem exhibits a positive impact on the exposure of tumor antigens when used at a low dose, which may enhance active immunological responses.³² Such an effect may be directly linked to the enhanced antitumour therapeutic effects achieved when combined with active immunotherapy, favoring presentation and cross-presentation of tumor antigen epitopes by APCs and subsequent induction of antigen-specific cytotoxic T cells.³² The described data suggests that short-term Gem therapy may be an interesting approach when associated with active immunotherapies capable of boosting tumor-specific immune responses, controlling tumor growth and inducing immunological memory to tumor antigens.

Cytotoxic CD8⁺ T cell responses positively correlate with the control of HPV-16-associated tumors in humans.^{33,34} Enhanced antitumour effects and generation of E7-specific CD8⁺ T cells and CTL responses in mice immunized with pgDE7h are observed after EP delivery (Sales et al., 2017). Since DNA vaccines are poorly immunogenic, the use of EP increases cell transfection and the antitumour effects, even at DNA concentrations up to 10-fold lower than the amount required to achieve similar results after conventional i.m. injections. Nonetheless, without any other associated therapy, such effects drop significantly in mice with established tumors following the engraftment of TC-1 cells, a fast-growing tumor cell line.²³ In the present study, the combination of pgDE7h EP with Gem resulted in enhanced antitumour activities in mice with established tumors, including activation of tumor-specific CTL responses. In order to demonstrate the synergic adjuvant effects of Gem when combined with immunotherapy, we selected a suboptimal dose of (80 mg/kg) in a two-dose treatment regimen (significantly lower than the dose used in patients – 120 mg/kg), based on previously reported preclinical conditions.³⁵ Our results demonstrate that Gem, when applied concomitantly with immunotherapy at rather low amounts, promotes strong adjuvant effects leading to the synergistic activation of E7-specific CD8⁺ T cells and control of immunosuppressive responses. Indeed, the generation of CTL responses has been previously identified as a major mechanism underlying the enhanced antitumour effects of Gem when combined with other immunotherapies. Nonetheless, such effects were detected only with repeated administration of Gem at high doses or with concomitant administration of additional adjuvants.^{36,37} Importantly, previous studies have demonstrated that administration of multiple doses of Gem suppresses CTL responses in mice transplanted with TC-1 cells, with a reduction in antitumour effectiveness.³⁷ In contrast, in our preclinical test, mice treated with two doses of Gem or with Gem + pgDE7h showed no signs of morbidity, weight loss, or a reduction in the number of circulating CD8⁺ T cells. Moreover, our findings demonstrated that Gem treatment provides a window for immunological intervention that enhances vaccine effectiveness. The enhanced and long-lived therapeutic effects of the combined chemoimmunotherapy approach may thus be attributed to the combined immunomodulatory properties of both Gem and the chimaeric protein encoded by the DNA vaccine vector, as demonstrated by activation of murine and human DCs with a purified gD-E7 protein.³⁸ Of note, the antitumour responses achieved in

mice subjected to combined Gem and pgDE7h treatment conferred long-lived immune responses, preventing tumor recurrence even after the subsequent implantation of TC-1 cells. Altogether, the present evidence supports the application of combined therapy for eradication of established HPV-associated tumors.

As highlighted by the present study, combination therapy with Gem and pgDE7h prevented the accumulation of immunosuppressive cells, including MDSCs and Tregs. Circulating and tumor-infiltrating MDSCs are capable of inhibiting the activation of T cells, which leads to immune escape and dismal overall survival with tumor relapse in patients and preclinical models.^{39–41} Previous evidence has also demonstrated that Gem combined with immunotherapies blocks immunosuppressive mechanisms by reducing the levels of PD-1-expressing cells, MDSCs, tumor-infiltrating Tregs, and tumor-associated macrophages (TAMs).^{36,42} The inhibitory effects of Gem on these cells may contribute to the tumor protection observed in mice subjected to combination therapy based on pgDE7h. Indeed, our own previous observations clearly demonstrated that the combination of active immunotherapies with blockade of immunosuppressive mechanisms, such as neutralization of IL-10, inhibition of IDO, or depletion of MDSCs,^{23,24,43,44} represents a trend toward the development of treatments capable of controlling HPV-associated tumors, particularly at advanced growth stages.

Here, we showed that the combination of Gem with pgDE7h increases the frequency of DCs *in vivo*. Induction of immune responses capable of eradicating established tumors requires the interaction of APCs and CD8⁺ T cells. Available evidence indicates that Gem promotes the maturation of DCs by upregulating CD80, CD86, and HLA-DR and enhances CTLs under *in vitro* conditions in cultures with pancreatic cancer cells.⁴⁵ Similarly, gD target antigens have the potential to induce maturation of mouse and human DC subsets specialized in cross-presentation.³⁸ In addition, our results demonstrated that the decrease in MDSCs in mice subjected to the combined treatment was accompanied by an increase in Gr-1⁺ cells expressing MHC-II^{high}, Ly6C⁺, F4/80⁺, CD11c⁺, and Ly6C⁺, suggesting that Gem, in association with pgDE7h, modulates the MDSCs phenotype and maximizes the interactions favoring antigen presentation by APCs. Indeed, modulation of MDSCs to a phenotype favoring the expression of costimulatory molecules was also observed after administration of a combined treatment using carboplatin–paclitaxel-based drugs and a long peptide vaccine in a preclinical TC-1 cell tumor model.⁴⁶ The present results open interesting perspectives for future studies aiming to elucidate the mechanisms leading to modulation of APC phenotypes by Gem and active immunotherapies.

Treatment of advanced-stage cervical cancer remains a clinical challenge and, so far, mainly involves chemotherapy. The present study provides experimental evidence that concomitant administration of Gem and active immunotherapy (pgDE7h) confers enhanced antitumour responses to treat established HPV-associated tumors using only two doses of the combined treatment. Indeed, the proposed therapy avoids the application of multiple Gem doses and would certainly decrease the incidence of deleterious side effects,

a serious concern among patients receiving conventional treatments based on chemotherapy and passive immunotherapies, such as cytokines and monoclonal antibodies. Additionally, the combined treatment led to simultaneous activation of T cell mediated cytotoxic responses with modulation of immunosuppressive cells and induction of immunological memory, which may avoid tumor relapse. Altogether, the present findings support the undertaking of further studies aiming to evaluate this combination therapy under clinical conditions.

Acknowledgments

The authors greatly appreciate the helpful technical support of Eduardo G. Martins of the Vaccine Development Laboratory of the University of São Paulo. Additionally, we are grateful for the support for analyses of t-SNE data provided by Luisa Menezes at the Immunology Department of the University of São Paulo.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

Funding

This study was supported by funds from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and University of São Paulo (USP). Jamile Ramos da Silva was a fellow supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), grant 2014/11073-1 and 2016/11594-7; Natiely Silva Sales was a fellow supported by the FAPESP, grant 2016/14344-1; Mariângela de Oliveira Silva was a fellow supported by the FAPESP, grant 2016/11397-7; Luana Raposo de Morais Melo Aps was a fellow supported by the FAPESP, grant 2013/15360-2; Karine Bitencourt Rodrigues was a fellow supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), grant 146598/2016-4; Aléxia Adrienne Vesneslau-Carvalho was a fellow supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), grant 168284/2017-0; Bruna F.M.M. Porchia was a fellow supported by the FAPESP, grant 2017/21358-1 and PND CAPES grant 23038.002557/2014-67; Natália Cestari Moreno was a fellow supported by the FAPESP, grant 2018/26555-2; Ana Carolina Ramos Moreno was a fellow supported by the FAPESP, grants 2015/16505-0 and 2016/00708-1, and CAPES, grant 560713; Mariana de Oliveira Diniz was a fellow supported by the FAPESP, grant 2011/51218-0; and Luís Carlos de Souza Ferreira was a fellow supported by the CNPq, grant 308650/2019-0 and CAPES grant 88881.130787/2016-01.

Author contributions

Jamile Ramos da Silva, Mariana de Oliveira Diniz, Ana Carolina Ramos Moreno and Luís Carlos de Souza Ferreira conceived the study and the experimental design. Mariana de Oliveira Diniz supervised the experimental work. Jamile Ramos da Silva, Natiely Silva Sales, Mariângela de Oliveira Silva, Luana Raposo de Morais Melo Aps, Natália Cestari Moreno, Karine Bitencourt Rodrigues, Aléxia Adrienne Vesneslau-Carvalho, Bruna F.M.M. Porchia, Ana Carolina Ramos Moreno, Carlos Frederico M. Menck and Mariana de Oliveira Diniz carried out the experiments, processed the experimental data, and participated in the interpretation of the results. Mariana de Oliveira Diniz, Ana Carolina Ramos Moreno and Luís Carlos de Souza Ferreira discussed the results and contributed to the writing of the manuscript. Jamile Ramos da Silva wrote the manuscript with support from Ana Carolina Ramos Moreno, Mariana de Oliveira Diniz and Luís Carlos de Souza Ferreira.

References

1. De MC, Georges D, Bray F, Ferlay J, Clifford GM. Articles Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. *Lancet Glob Heal.* 2020;8(2):e180–e190. doi:10.1016/S2214-109X(19)30488-7.
2. Wardak S. Human Papillomavirus (HPV) and cervical cancer. *Med Dosw Mikrobiol.* 2016;68:73–84.
3. Siegel RL, Miller KD. *Cancer Statistics, 2020.* *CA Cancer J Clin.* 2020;70(1):7–30. doi:10.3322/caac.21590.
4. WHO report on cancer: setting priorities, investing wisely and providing care for all. WHO-CancerReport-2020-Global Profile. Geneva:World Health Organization; 2020.
5. Survival rates for cervical cancer. American Cancer Society. 2020. Web page (<https://www.cancer.org/cancer/cervical-cancer/detection-diagnosis-staging/survival/en/>, accessed January 2021).
6. Tseng J, Yen M, Twu N, Lai C, Horg H. Prognostic nomogram for overall survival in stage IIB-IVA cervical cancer patients treated with concurrent chemoradiotherapy. *YMOB.* 2010;202(2):174.e1–174.e7. doi:10.1016/j.ajog.2009.09.028.
7. Gadducci A, Tana R, Cosio S, Cionini L. Treatment options in recurrent cervical cancer (Review). *Oncol Lett.* 2010;3–11. doi:10.3892/ol.
8. Bracci L, Schiavoni G, Sistigu A, Belardelli F. Immune-based mechanisms of cytotoxic chemotherapy: implications for the design of novel and rationale-based combined treatments against cancer. *Cell Death Differ.* 2014;21(1):15–25. doi:10.1038/cdd.2013.67.
9. Carmichael J. The role of gemcitabine in the treatment of other tumours. *British Journal of Cancer.* 1998;78(S3):21–25. doi:10.1038/bjc.1998.750.
10. Mini E, Nobili S, Caciagli B, Landini I, Mazzei T. symposium article Cellular pharmacology of gemcitabine. Gemcitabine Ten Years Clin Exp. Sept 2005;19–21. doi:10.1093/annonc/mdj941. *Monast. di Treviso, Italy.* 2006;17(Supplement 5):v7–v12.
11. Amrutkar M, Gladhaug IP. Pancreatic cancer chemoresistance to gemcitabine. *Cancers (Basel).* 2017;9:157. doi:10.3390/cancers9110157.
12. De Sousa Cavalcante L, Gemcitabine MG. Metabolism and molecular mechanisms of action, sensitivity and chemoresistance in pancreatic cancer. *Eur J Pharmacol.* 2014;741:8–16. doi:10.1016/j.ejphar.2014.07.041.
13. Sakamoto H, Kitano M, Suetomi Y, Takeyama Y, Ohyanagi H, Nakai T, Yasuda C, Kudo M. Comparison of standard-dose and low-dose gemcitabine regimens in pancreatic adenocarcinoma patients: a prospective randomized trial. *J Gastroenterol.* 2006;41:70–76. doi:10.1007/s00535-005-1724-7.
14. Alexopoulos A, Karamouzis MV, Rigatos G. In vivo synergism between docetaxel and gemcitabine in patients with metastatic breast cancer: general concepts and future perspectives. *Semin Oncol.* 2004;31(2 SUPPL. 5):25–30. doi:10.1053/j.seminoncol.2004.03.024.
15. Hirooka Y, Kawashima H, Ohno E, Ishikawa T, Kamigaki T, Goto S, Takahara M, Goto H. Comprehensive immunotherapy combined with intratumoral injection of zoledronate-pulsed dendritic cells, intravenous adoptive activated T lymphocyte and gemcitabine in unresectable locally advanced pancreatic carcinoma: a phase I/II trial. *Oncotarget.* 2018;9(2):2838–2847. doi:10.18632/oncotarget.22974.
16. Hirooka Y, Itoh A, Kawashima H, Hara K, Nonogaki K, Kasugai T, Ohno E, Ishikawa T, Matsubara H, Ishigami M, et al. A combination therapy of gemcitabine with immunotherapy for patients with inoperable locally advanced pancreatic cancer. *Pancreas* 2009;38:3. doi:10.1097/MPA.0b013e318197a9e3.
17. Liu WM, Fowler DW, Smith P, Dalgleish AG. Pre-treatment with chemotherapy can enhance the antigenicity and immunogenicity of tumours by promoting adaptive immune responses. *Br J Cancer.* 2010;102:115–123. doi:10.1038/sj.bjc.6605465.
18. Suzuki E, Kapoor V, Jassar AS, Kaiser LR, Albelda SM. Gemcitabine selectively eliminates splenic Gr-1+CD11b+

- Myeloid suppressor cells in tumor-bearing animals and enhances antitumor immune activity. *Clin Cancer Res.* 2005;11(18):6713–6721. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-0883.
19. Eriksson E, Wenhe J, Irenaeus S, Loskog A, Ullenhag G. Gemcitabine reduces MDSCs, tregs and TGF β -1 while restoring the teff/treg ratio in patients with pancreatic cancer. *J Transl Med.* 2016;14(1):1–12. doi:10.1186/s12967-016-1037-z.
 20. Rebé C, Végran F, Berger H, Ghiringhelli F. STAT3 activation. *JAK-STAT.* 2013;2(1):e23010. doi:10.4161/jkst.23010.
 21. Diniz MO, Lasaro MO, Ertl HC, Ferreira LCS. Immune responses and therapeutic antitumor effects of an experimental DNA vaccine encoding human papillomavirus type 16 oncoproteins genetically fused to herpesvirus glycoprotein D. *Clin Vaccine Immunol.* 2010;17(10):1576–1583. doi:10.1128/CVI.00264-10.
 22. Diniz MO, Cariri FAMO, Aps LRMM, Ferreira LCS. Enhanced therapeutic effects conferred by an experimental DNA vaccine targeting human papillomavirus-induced tumors. *Hum Gene Ther.* 2013;24(10):861–870. doi:10.1089/hum.2013.102.
 23. Silva JR, Sales NS, Silva MO, Aps LRMM, Moreno ACR, Rodrigues EG, Ferreira LCS, Diniz MO. Expression of a soluble IL-10 receptor enhances the therapeutic effects of a papillomavirus-associated antitumor vaccine in a murine model. *Cancer Immunol Immunother.* 2019;68(5):753–763. doi:10.1007/s00262-018-02297-2.
 24. Sales NS, Silva JR, Aps LRMM, Silva MO, Porchia BFMM, Ferreira LCS, Diniz MO. In vivo electroporation enhances vaccine-mediated therapeutic control of human papilloma virus-associated tumors by the activation of multifunctional and effector memory CD8 + T cells. *Vaccine.* 2017;(52)7240–7249. doi:10.1016/j.vaccine.2017.11.011.
 25. Lin KY, Guarnieri FG, Staveley-O'Carroll KF, Levitsky HI, August JT, Pardoll DM, Wu TC. Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. *Cancer Res.* 1996;56:21–26.
 26. Lasaro MO, Diniz MO, Reyes-Sandoval A, Ertl HC, Ferreira LCS. Anti-tumor DNA vaccines based on the expression of human papillomavirus-16 E6/E7 oncoproteins genetically fused with the glycoprotein D from herpes simplex virus-1. *Microbes Infect.* 2005;7(15):1541–1550. doi:10.1016/j.micinf.2005.05.024.
 27. Diniz MO, Ferreira LCS. Enhanced anti-tumor effect of a gene gun-delivered DNA vaccine encoding the human papillomavirus type 16 oncoproteins genetically fused to the herpes simplex virus glycoprotein D. *Brazilian J Med Biol Res.* 2011;44(5):421–427. = *Rev. Bras. Pesqui. médicas e biológicas/Soc. Bras. Biofísica ... [et al.]*.
 28. Candelaria M, Cetina L, De La Garza J, Dueñas-González A. Clinical implications of gemcitabine in the treatment of cervical cancer. *Eur J Cancer.* 2007;5(1):37–43. doi:10.1016/S1359-6349(07)70014-9.
 29. Mutch DG, Bloss JD. Gemcitabine in cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 2003;90(2):Pt 2. doi:10.1016/S0090-8258(03)00338-X.
 30. Jia Y, Xie J. Promising molecular mechanisms responsible for gemcitabine resistance in cancer. *Genes Dis.* 2015;2(4):299–306. doi:10.1016/j.gendis.2015.07.003.
 31. Principe DR, Narbutis M, Kumar S, Park A, Viswakarma N, Dorman MJ, Kamath SD, Grippo PJ, Fishel ML, Hwang RF, et al. Long-Term gemcitabine treatment reshapes the pancreatic tumor microenvironment and sensitizes murine carcinoma to combination immunotherapy. *Cancer Res.* 2020;80(15):3101–3115. doi:10.1158/0008-5472.CAN-19-2959.
 32. Zhang X, Wang D, Li Z, Jiao D, Jin L, Cong J, Zheng X, Low-Dose Gemcitabine XL. Treatment enhances immunogenicity and natural killer cell-driven tumor immunity in lung cancer. *Front Immunol.* 2020;11:331. doi:10.3389/fimmu.2020.00331.
 33. Komdeur FL, Prins TM, Van De Wall S, Plat A, Wisman GBA, Hollema H, Daemen T, Church DN, de Bruyn M, Nijman HW. CD103+ tumor-infiltrating lymphocytes are tumor-reactive intraepithelial CD8+ T cells associated with prognostic benefit and therapy response in cervical cancer. *Oncoimmunology* 2017;6:9. doi:10.1080/2162402X.2017.1338230.
 34. Stevanović SS, Draper LM, Langhan MM, Campbell TE, Kwong ML, Wunderlich JR, Dudley ME, Yang JC, Sherry RM, Kammula US, et al. Complete regression of metastatic cervical cancer after treatment with human papillomavirus-targeted tumor-infiltrating T cells. *J Clin Oncol.* 2015. 10.1200/JCO.2014.58.9093.
 35. Reiniš M. Genetically modified tumour vaccines producing IL-12 augment chemotherapy of HPV16-associated tumours with gemcitabine. *Oncol Rep.* 2011. doi:10.3892/or.2011.1221. Mar 18.
 36. Chang L-S, Yan W-L, Chang Y-W, Yeh Y-C, Chen H-W, Leng C-H, Liu S-J. Gemcitabine enhances antitumor efficacy of recombinant liposome-based immunotherapy. *Oncoimmunology.* 2016;5(3):e1095433. doi:10.1080/2162402X.2015.1095433.
 37. Jang HY, Han BS, Kwon B, Sin JI. Optimized gemcitabine therapy in combination with E7 peptide immunization elicits tumor cure by preventing ag-specific CTL inhibition in animals with large established tumors. *DNA Cell Biol.* 2018;37(10):850–860. doi:10.1089/dna.2018.4319.
 38. Porchia BFMM, Moreno ACR, Ramos RN, Diniz MO, Lhtm DA, Rosa DS, Barbuto JAM, Boscardin SB, Ferreira LCS. Herpes simplex virus glycoprotein D targets a specific dendritic cell subset and improves the performance of vaccines to human papillomavirus-associated tumors. *Mol Cancer Ther.* 2017;16(9):1922–1933. doi:10.1158/1535-7163.MCT-17-0071.
 39. Wu L, Liu H, Guo H, Wu Q, Yu S, Qin Y, Wang G, Wu Q, Zhang R, Wang L, et al. Circulating and tumor-infiltrating myeloid-derived suppressor cells in cervical carcinoma patients. *Oncol Lett.* 2018;15(6):9507–9515. doi:10.3892/ol.2018.8532.
 40. Sevko A, Umansky V. Myeloid-derived suppressor cells interact with tumors in terms of myelopoiesis, tumorigenesis and immunosuppression: Thick as thieves. *J. Cancer.* 2013;4(1):3–11. doi:10.7150/jca.5047
 41. Nowak AK, Robinson BWS, Lake RA. Gemcitabine exerts a selective effect on the humoral immune response : implications for combination chemo-immunotherapy. *Cancer Res.* 2002;62(8):23532358.
 42. Le HK, Graham I, Cha E, Morales JK, Manjili MH, Bear HD. Gemcitabine directly inhibits myeloid derived suppressor cells in BALB/c mice bearing 4T1 mammary carcinoma and augments expansion of T cells from tumor-bearing mice. *Int Immunopharmacol.* 2009;9(7–8):900–909. doi:10.1016/j.intimp.2009.03.015.
 43. Diniz MO, Sales NS, Silva JR, Ferreira LCS. Protection against HPV-16-associated tumors requires the activation of CD8+ effector memory t cells and the control of myeloid-derived suppressor cells. *Mol Cancer Ther.* 2016;15(8):1920–1930. doi:10.1158/1535-7163.MCT-15-0742.
 44. Moreno ACR, Porchia BFMM, Pagni RL, Souza PDC, Pegoraro R, Rodrigues KB, Barros TB, Aps LRMM, de Araújo EF, Calich VLG, et al. The combined use of melatonin and an indoleamine 2,3-dioxygenase-1 inhibitor enhances vaccine-induced protective cellular immunity to hpv16-associated tumors. *Front Immunol.* 2018 August;9:1914. doi:10.3389/fimmu.2018.01914.
 45. Pei Q, Pan J, Zhu H, Ding X, Liu W, Lv Y, Zou X, Luo H. Gemcitabine-treated pancreatic cancer cell medium induces the specific CTL antitumor activity by stimulating the maturation of dendritic cells. *Int Immunopharmacol.* 2014;19(1):10–16. doi:10.1016/j.intimp.2013.12.022.
 46. Welters MJ, Van Der Sluis TC, Van Meir H, Loof NM, Van Ham VJ, Van Duikeren S, Santegoets SJ, Arens R, De Kam ML, Cohen AF, et al. Vaccination during myeloid cell depletion by cancer chemotherapy fosters robust T cell responses. *Sci Transl Med.* 2016;8:334. doi:10.1126/scitranslmed.aad8307.



Expression of a soluble IL-10 receptor enhances the therapeutic effects of a papillomavirus-associated antitumor vaccine in a murine model

Jamile R. Silva¹ · Natiely S. Sales¹ · Mariângela O. Silva¹ · Luana R. M. M. Aps¹ · Ana C. R. Moreno¹ · Elaine G. Rodrigues² · Luis C. S. Ferreira¹ · Mariana O. Diniz^{1,3}

Received: 22 May 2018 / Accepted: 28 December 2018
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

The presence of IL-10, produced either by tumor cells or immunosuppressive cells, is frequently associated with a poor prognosis for cancer progression. It may also negatively impact anticancer treatments, such as immunotherapies, that otherwise would promote the activation of cytotoxic T cells capable of detecting and destroying malignant cells. In the present study, we evaluated a new adjuvant approach for anticancer immunotherapy using a plasmid vector encoding a soluble form of the IL-10 receptor (pIL-10R). pIL-10R was coadministered to mice with a DNA vaccine encoding the type 16 human papillomavirus (HPV-16) E7 oncoprotein genetically fused with glycoprotein D of herpes simplex virus (HSV) (pgDE7h). Immunization regimens based on the coadministration of pIL-10R and pgDE7h enhanced the antitumor immunity elicited in mice injected with TC-1 cells, which express HPV-16 oncoproteins. The administration of the DNA vaccines by *in vivo* electroporation further enhanced the anticancer effects of the vaccines, leading to the activation of tumor-infiltrating polyfunctional E7-specific cytotoxic CD8⁺ T cells and control of the expansion of immunosuppressive cells. In addition, the combination of immunotherapy and pIL-10R allowed the control of tumors in more advanced growth stages that otherwise would not be treatable by the pgDE7h vaccine. In conclusion, the proposed treatment involving the expression of IL-10R enhanced the antitumor protective immunity induced by pgDE7h administration and may contribute to the development of more efficient clinical interventions against HPV-induced tumors.

Keywords Cancer · DNA vaccine · IL-10 · gDE7 · TC-1 cells · Cancer immunotherapy

Abbreviations

ATCC American Type Culture Collection
CAPES Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CEUA Ethics Committee on the Use of Animals in Experimentation
c-Ha-Ras v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
CNPq Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CONCEA National Council for Control of Animal Experimentation
E6 Early protein 6
E7 Early protein 7
EP Electroporation
FAPESP Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FSC Forward scatter
gD Glycoprotein D
ICGEB International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology
mAb Monoclonal antibodies
PBMC Peripheral blood mononuclear cell

Parts of the present study have been presented as a poster presentation at the 3rd International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB) workshop: Human papillomavirus and associated malignancies: biology, prevention and therapy. The poster was entitled “*In vivo* neutralization of IL-10 enhances the antitumor effects of a therapeutic vaccine to HPV-associated tumor”, and the meeting was held in São Paulo, Brazil, on September 2nd, 2017.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00262-018-02297-2>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Luis C. S. Ferreira
lcsf@usp.br

Extended author information available on the last page of the article

Published online: 26 February 2019

Springer

pgDE7h	Vaccine plasmid composed of gD fused to HPV-16 E7
pIL-10R	Interleukin-10 receptor plasmid
SSC	Side scatter

Introduction

Cancer immunotherapies aim to boost the ability of the immune system to recognize and eliminate tumor cells. However, the therapeutic efficacy of such procedures may be compromised by tumor-induced immune escape mechanisms that inhibit the cytotoxic responses capable of eliminating cancerous cells [1]. Interleukin IL-10 (IL-10) has emerged as an important mediator of tumor-associated immune evasion mechanisms. IL-10 levels are elevated in the context of human papillomavirus (HPV) infection in both vaginal secretions from non-altered cervix and premalignant lesions of the cervix, and the IL-10 levels show a positive correlation with the grade of the lesion [2, 3]. IL-10 plays an important role in inhibiting antiviral responses, which favors the progression of premalignant lesions resulting in a predisposition for the development of uterine carcinoma [4, 5]. In addition, similar to other cancer types, HPV-positive cervical cancer, oral squamous cell carcinoma and head and neck cancer frequently show enhanced IL-10 expression, which is considered a prognostic indicator of poor clinical outcome [3, 6–8].

IL-10 contributes to the induction of immune tolerance, causing reduced expression of costimulatory and major histocompatibility complex class II (MHC-II) molecules in dendritic cells (DCs) and, therefore, inhibits DC differentiation and maturation; IL-10 also compromises DC migration to secondary lymphoid organs [9–11]. Increased levels of IL-10 in cancer patients correlate with the downregulation of MHC-II expression in cancer cells and the inhibition of T lymphocyte-mediated cytotoxicity [12]. Additionally, IL-10 promotes the expansion of systemic and tumor-infiltrating regulatory T cells (Treg) and myeloid-derived suppressor cells (MDSCs), which creates a favorable environment for tumor progression and reduces local antigen-specific CD8⁺ T cell responses even in patients with detectable cellular immune responses [13, 14]. Therefore, the control of IL-10 levels represents a key step in tumor control, especially in advanced disease stages.

Previous evidence has demonstrated that silencing the gene encoding the IL-10 receptor (IL-10R) in DCs increases their antigen presentation and expression of costimulatory molecules, leading to enhanced tumor growth control in HPV-16 E6 and E7-expressing tumor cells (TC-1 cells) [15]. In addition, the combined silencing of IL-10 and TGF- β receptors in DCs significantly increases the number of activated E7-specific CD8⁺ T lymphocytes and enhances

protective antitumor immunity in mice [16]. Another experimental approach developed to reduce the *in vivo* levels of IL-10 was based on the administration of a plasmid encoding the soluble extracellular region of the IL-10 receptor (pIL-10R) [17]. Such an approach led to increased survival and activation of proinflammatory responses in a murine melanoma model, but the strategy has not been tested as an adjuvant with other anticancer therapeutic interventions.

Our group has developed an immunotherapy against HPV-associated tumors based on immunization, either with a DNA vaccine or purified recombinant protein, with a chimeric protein derived from the fusion of the HPV-16 E7 oncoprotein with the HSV-1 glycoprotein D (gD) (pgDE7h) [18, 19]. The vaccines proved to be capable of activating E7-specific CD8⁺ T cell responses in mice and conferred therapeutic protection in mice grafted with tumor cells expressing HPV-16 oncoproteins [18]. However, this immunotherapeutic approach loses efficacy when it is applied to animals with tumors at more advanced stages. In light of this evidence, this study sought to evaluate the adjuvant effects of IL-10R expression on the immune responses mediated by pgDE7h. Our results demonstrate that the coadministration of pIL-10R and pgDE7h increased the activation and tumor infiltration of the E7-specific CD8⁺ T lymphocytes induced by immunotherapy and therefore generated more efficient control of tumors at more advanced stages.

Materials and methods

Plasmids

The pgDE7h vector contains a codon-optimized sequence encoding the gDE7 hybrid protein cloned into pUMVC3 (Aldevron, USA) [20]. pIL-10R encodes the soluble extracellular portion of the murine IL-10 receptor corresponding to amino acids 1–189 cloned into the *NotI* site of pcDNA3 (Invitrogen, USA) [17]. Plasmid purification was performed using a Giga Prep plasmid purification kit (QIAGEN, USA) according to the manufacturer's instructions.

TC-1 cells

The TC-1 cell line is derived from primary lung epithelium cells of C57BL/6 mice that were transformed with *c-Ha-ras*- and HPV-16 E6- and E7-encoding genes [21]. TC-1 cells were cultured in RPMI (Gibco, USA) medium supplemented with 50 U/ml penicillin/streptomycin, 0.4 mg/ml G418, 10% fetal bovine serum (FBS) (Vitrocell, Campinas, São Paulo, Brazil) at 37 °C and 5% CO₂. On the day of tumor grafting, the cells were treated with trypsin–EDTA (Vitrocell, São Paulo, Brazil) and suspended in serum-free RPMI medium at the proper concentrations for inoculation.

Tumor challenge

Six–eight-week-old C57BL/6 mice were transplanted with 7.5×10^4 TC-1 cells in 100 μ l of RPMI medium by subcutaneous injection in the right dorsolateral region. Tumor growth was monitored 2–3 times a week with calipers, and survival was recorded for at least 60 days. The smaller (*d*) and larger (*D*) diameters of the tumors were measured, and the tumor volume was calculated according to the formula $D \times d^2/2$. Mice with tumors of approximately 1 mm³ were considered tumor-bearing mice, and mice with tumors greater than 700 mm³ were euthanized.

Immunization protocols

Mice were immunized by injection of one dose of pgDE7h (5 or 50 μ g) by the intramuscular route (i.m.) in the tibialis anterior muscle or by electroporation (EP) 5 or 14 days after tumor grafting. For EP, a total of six 130 V 450 ms electrical pulses were applied using a NEPA21 Super Electroporator (NepaGeneCo., Ltd., Chiba, Japan). In the combined immunization regimen, mice received one or two doses of pIL-10R (50 μ g) administered 5 days apart either by injection or EP. The first dose was coadministered with pgDE7h, and the second dose was delivered alone.

Intracellular cytokine staining (ICS) and MDSC detection

Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) or spleen samples were collected 14 days after pgDE7h administration and incubated at a concentration of 10^6 cells per well for 12 h at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere, in the presence of Brefeldin A (5 μ g/ml) (GolgiPlug; BD Biosciences, USA) and IL-2 (5 ng/ml) and with or without MHC class I-specific E7-derived peptide (₄₉RAHYNIVTF₅₇) at a final concentration of 300 ng/well. In some experiments, 5 μ g/ml anti-CD107a-FITC antibody (BD Biosciences, USA), 10 μ g/ml monensin (GolgiStop; BD Biosciences, USA) and 2 μ g/ml anti-CD28 antibody (BD Biosciences, USA) were added during the overnight stimulation. The cells were labeled with anti-CD8 α -BV605 or -BB515-conjugated antibodies (BD Bioscience, USA). After fixation and permeabilization with Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences, USA), the samples were intracellularly stained with anti-IFN- γ -PE or anti-IFN- γ -Alexa Fluor 700 and anti-TNF- α -PE-Cy7 antibodies (BD Bioscience, USA). MDSCs were tracked using anti-CD11b-FITC and anti-Gr1-PE antibodies (BD Bioscience). The samples were analyzed on an LSRFortessa® flow cytometer (BD Bioscience, San Jose, CA, USA), and the data were analyzed with FlowJo software. The analyses were performed after the initial exclusion of doublets using the FSC and SSC parameters. Subsequently, the percentages of

CD8⁺ IFN- γ ⁺, CD8⁺ TNF- α ⁺ and CD8⁺ CD107a⁺ cells in the total CD8⁺ T cell population were determined. MDSCs were characterized as CD11b^{high} GR-1^{int}, CD11b^{high} Gr1^{high} or total CD11b⁺ Gr-1⁺.

Detection of tumor-infiltrating lymphocytes

Tumor samples were collected 28 days after tumor transplantation and digested with collagenase D (1 mg/mL) for 1 h at 37 °C and macerated to obtain a cell suspension. The samples were labeled with an APC-conjugated MHC class I dextramer carrying the E7-specific peptide (Immudex, USA) and surface stained with anti-CD8 α -BB515 (BD Bioscience) and anti-CD45-PerCP Cy5.5 antibodies (BD Bioscience, USA). For some experiments, cells were fixed, permeabilized (Cytotfix/Cytoperm; BD Biosciences, USA), and stained with anti-IFN- γ -PE monoclonal antibodies (mAb) (#554,412, BD Bioscience, USA) after stimulation overnight with IL-2 (5 ng/ml) in the presence of ₄₉RAHYNIVTF₅₇ peptide (300 ng/well). Samples were analyzed by flow cytometry using an LSRFortessa™ (BD Bioscience San Jose, CA, USA). Doublets were excluded using the FSC and SSC parameters, and CD45⁺ cells were subsequently analyzed to obtain the percentages of CD8⁺ IFN- γ ⁺ or CD8⁺ dextramer E7-specific⁺ cells with the total CD8⁺ T cell population.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 6.0 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). One- or two-way ANOVA was used with the Bonferroni multiple comparison test or Student's *t* test was used for comparisons of unpaired samples. The log-rank test followed by the Mantel–Cox posttest was used for the survival analysis. *p* < 0.05 was considered statistically significant with a confidence interval of 95%.

Results

pIL-10R administration enhances the antitumor effects of pgDE7h

First, we determined whether the administration of pIL-10R would impact the therapeutic antitumor effects of pgDE7h. To address this question, mice were immunized with one dose of pgDE7h (50 μ g) or underwent a combined immunization regimen consisting of two doses of pIL-10R (50 μ g for each injection) injected 5 days apart by the intramuscular route (i.m.) starting five days after the TC-1 cell graft, and one dose of pgDE7h delivered at the same time as the first dose of pIL-10R (Fig. 1a). Mice immunized with

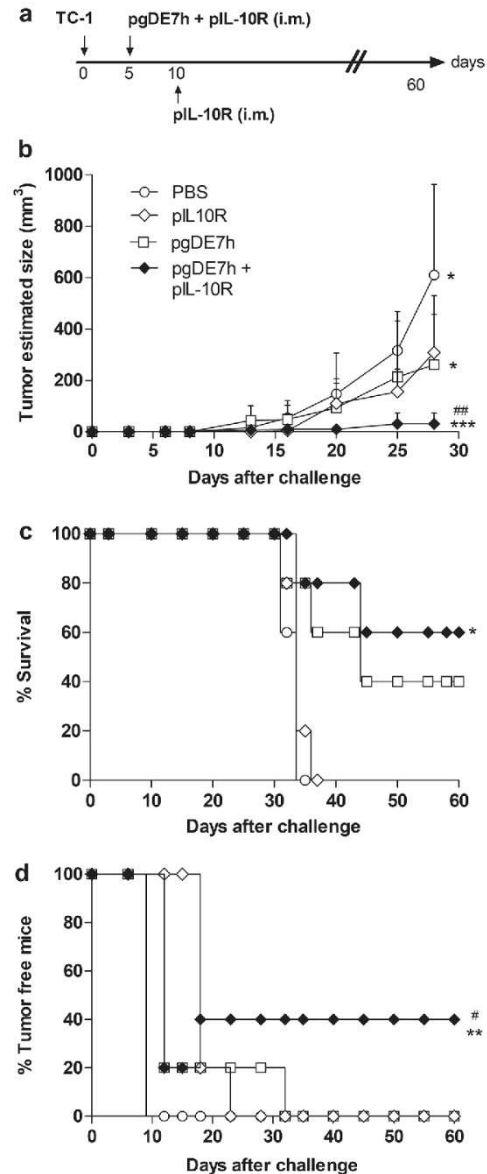
Fig. 1 Administration of pIL-10R exhibits adjuvant effects on the tumor protection elicited by the pgDE7h vaccine. Mice were grafted with TC-1 tumor cells and i.m. immunized with one dose of pgDE7h 5 days later with or without two 50 μ g doses of pIL-10R administered 5 days apart. Tumor growth was monitored 2–3 times per week for a period of 60 days. **a** Schematic immunization schedule. **b** Estimated tumor size over time (two-way ANOVA). **c** Percentage of surviving or **d** tumor-free mice over time (log-rank–Mantel–Cox). Data from 3 independent experiments ($n=10$ –15) (*) vs PBS, (#) vs pgDE7h. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$

pgDE7h showed delayed tumor growth compared with the sham-treated mice (PBS), and 40% of the vaccinated mice survived up to 2 months after the challenge, but all mice developed tumors (Fig. 1b–d). Mice immunized with two doses of pIL-10R showed reduced tumor size in comparison with the sham-treated mouse group (PBS), but by day 40 after challenge, all mice had to be euthanized due to the progression of the tumors (Fig. 1b, c). In contrast, mice immunized with pIL-10R combined with pgDE7h showed a significant decrease in tumor growth compared with the other mouse groups, and 60% of them survived until the end of the follow-up period (Fig. 1b, c). Tumor-free mice were only observed in the group that received the combined immunization regimen (pgDE7h plus pIL-10R) (Fig. 1d). These results indicate that the administration of pIL-10R enhanced the therapeutic antitumor effects of pgDE7h.

EP administration enhances the antitumor effects of pgDE7h and pIL-10R and halts the expansion of immunosuppressive cells

In an attempt to increase the potency of the combined immunotherapeutic treatment, we delivered pgDE7h and pIL-10R to mice by in vivo EP. For this purpose, mice were injected with TC-1 cells and immunized with 5 μ g of pgDE7h admixed with or without 50 μ g of pIL-10R in a single dose regimen (Fig. 2a). As shown in Fig. 2b, mice immunized with pgDE7h showed partial tumor growth control and 80% survival up to 60 days after tumor challenge. However, mice immunized with pgDE7h and pIL-10R showed more pronounced tumor growth control and 100% survival (Fig. 2b, c). More importantly, complete tumor protection was observed in 90% of the mice vaccinated with pgDE7h/pIL-10R but only in 50% of the mice vaccinated with pgDE7h (Fig. 2c).

In a second step, we aimed to evaluate the impact of the treatment in mice with more advanced tumors. The vaccine regimen was started 14 days after the tumor grafting, a point at which the tumors were palpable (1–2 mm²). Mice were immunized with a single dose of pgDE7h (5 μ g) admixed with pIL-10R (50 μ g) and followed by a second dose of pIL-10R administered 5 days later; both doses were delivered by EP (Fig. 3a). The combined therapy led to efficient tumor



control, and 100% of the animals survived the challenge at the end of the observation period (60% tumor-free mice, Supplementary Fig. 1d) (Fig. 3b, c). Mice immunized only with pgDE7h showed delayed tumor development, and 80% of them were still alive at the end of the observation period

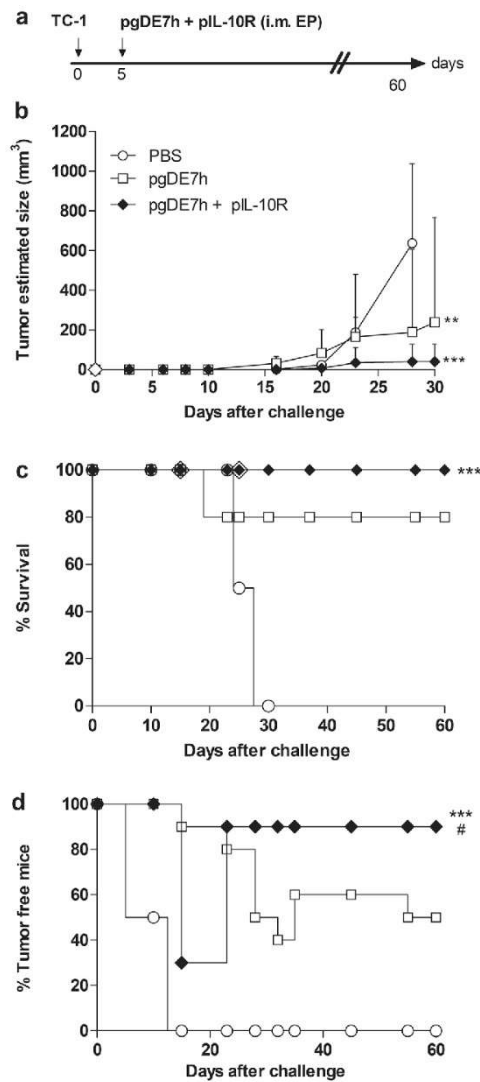


Fig. 2 EP potentiates the effect of the combined immunotherapy with the pgDE7h vaccine and pIL-10R. Mice were injected with TC-1 tumor cells and immunized 5 days later using in vivo EP with one 5 μ g dose of pgDE7h with or without one 50 μ g dose of pIL-10R. Tumor growth was monitored 2–3 times per week for a period of 60 days. **a** Schematic immunization schedule. **b** Estimated tumor size over time (two-way ANOVA). **c** Percentage of surviving or **d** tumor-free mice over time (log-rank–Mantel–Cox). Data from 3 independent experiments ($n=10$) (*) vs PBS, (#) vs pgDE7h. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$

(30% tumor-free, data not shown) (Fig. 3b, c). Immunization with pIL-10R alone was less efficient in tumor growth control, and mice treated with this approach showed slightly augmented survival compared to PBS-immunized mice (Fig. 3b, c). We also investigated whether a third dose of pIL-10R, administered 5 days after the second dose, would further improve the antitumor therapeutic protection. Mice that received 2 or 3 doses of pIL-10R showed no significant differences in their control of tumor growth or survival (Supplementary Fig. 1). By the end of the follow-up period, the tumors and spleens of mice given the combined immunization regimen were smaller than those from mice immunized with pgDE7h (Fig. 3d). The enlarged spleens in mice vaccinated with pgDE7h reflected the accumulation of MDSCs, as previously shown [22]. In accordance with the tumor protection results, mice immunized with pgDE7h and pIL-10R controlled the expansion of immunosuppressive cells. Administration of the combined immunotherapy led to a significant decrease in the frequency of the total CD11b⁺ GR-1⁺ and CD11b⁺ GR-1^{high} cell populations in the spleens from vaccinated mice compared with those from mice immunized with pgDE7h (Fig. 3e). Taken together, these data indicate that immunization with pIL-10R delivered by EP enhances the therapeutic antitumor effects of pgDE7h, even in mice with pre-established tumors, and halts the expansion of MDSCs triggered by tumor progression.

Administration of pIL-10R promotes activation of polyfunctional tumor-infiltrating CD8⁺ T lymphocytes

Following the conditions described above, we next evaluated the induction of antigen-specific CD8⁺ T cell responses in mice given the pgDE7h/pIL-10R treatment by EP. As shown in Fig. 4a, b, a higher frequency of E7-specific IFN- γ -producing CD8⁺ T cells was detected in the blood of the mice given the combined therapy compared with that of mice given the sham treatment (PBS). Comparable results were observed in the spleens collected from the mice given the other immunization therapies. Notably, administration of pgDE7h/pIL-10R enhanced CD107a expression concomitantly with enhanced IFN- γ and TNF- α expression compared to the administration of pgDE7h (Fig. 4c). Furthermore, the combination of pgDE7h and pIL-10R enhanced the numbers of splenic IFN- γ /TNF- α - or IFN- γ /CD107a-producing CD8⁺ T cells compared with pgDE7h alone (Fig. 4c). When single cytokine production by CD8⁺ T lymphocytes was analyzed, we observed that the numbers of IFN- γ producing cells were increased in mice immunized with pgDE7h/pIL-10R compared with sham-treated mice (PBS), but the numbers of TNF- α producing cells were not increased and were instead similar in the two groups (Fig. 4c–e).

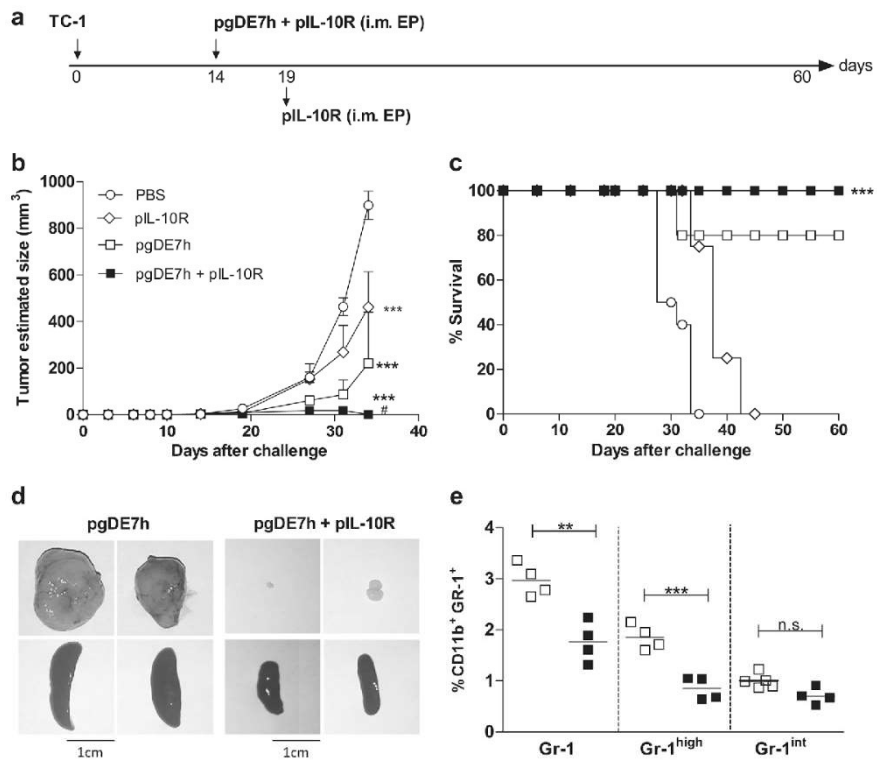


Fig. 3 Combination of pgDE7h and pIL-10R delivered by EP induces the regression of pre-established tumors and halts the accumulation of immunosuppressive cells. Mice were injected with TC-1 tumor cells and immunized 14 days later by in vivo EP with one 5 µg dose of pgDE7h with or without two 50 µg doses of pIL-10R administered 5 days apart. Tumor growth was monitored 2–3 times per week for a period of 60 days. **a** Schematic immunization schedule. **b** Estimated tumor size over time (two-way ANOVA). **c** Percentage of surviving

mice over time (log-rank–Mantel–Cox). Data from 3 independent experiments ($n=10-15$). **d** Representative pictures of tumors (top row) and spleens (lower row) harvested 28 days after the challenge from mice treated with the pgDE7h vaccine alone or in combination with pIL-10R. **e** Frequencies of total CD11b⁺ Gr-1⁺ or CD11b⁺ Gr-1^{high} and CD11b⁺ Gr-1^{int} subsets of MDSCs in the spleen were determined by flow cytometry (Student's *t* test) ($n=6$). (*) vs PBS, (#) vs pgDE7h. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, *ns* not significant

Finally, we determined the presence of tumor-infiltrating E7-specific CD8⁺ T cells in mice given the combined immunization regimen. As indicated in Fig. 5a, compared with PBS-treated mice, mice immunized with pgDE7h and pIL-10R showed a significant increase in the influx of total and E7-specific CD8⁺ T cells to the tumor (Fig. 5a, b), and these cells were not detected in PBS- or pIL-10R-immunized mice (data not shown). In addition, approximately 15% of the total tumor-infiltrating CD8⁺ T cells were capable of producing IFN-γ upon ex vivo peptide stimulation (Fig. 5c, d). Collectively, these results indicate that the administration of pgDE7h/pIL-10R enhances the frequency and activation of systemic and tumor-infiltrating

E7-specific CD8⁺ T cells, leading to more efficient control of tumor cell growth under experimental conditions.

Discussion

In clinical trials, immunotherapies have been shown to have therapeutic efficacy that supports the regression of precancerous HPV-associated lesions, but in advanced stages, the clinical efficacy still needs improvement. Targeting cancer-induced immunosuppressive mechanisms in parallel with the induction of immune responses to tumor antigens can provide a more appropriate environment for T cell priming

and functioning. In light of this, in the present report, we described a novel experimental approach based on the coadministration of a DNA antitumor vaccine (pgDE7h) and a plasmid vector encoding the IL-10 receptor (pIL-10R) as a strategy to halt tumor-induced immunosuppressive mechanisms and, therefore, act as an adjuvant for antigen-specific immunotherapy. Our results demonstrated that the combination of pIL-10R with pgDE7h increased the activation of systemic and tumor-infiltrating E7-specific T lymphocytes and most importantly, the antitumoral therapeutic effects elicited by the DNA vaccine pgDE7h and thus may contribute to the development of more efficient anticancer immunotherapies.

Cytokines, such as IL-10, can be neutralized *in vivo* using monoclonal antibodies, interfering RNAs or plasmids expressing the corresponding cytokine receptor. In the present study, the decrease in circulating IL-10 levels caused by the injection of the plasmid encoding the soluble fraction of the IL-10 receptor in conjunction with pgDE7h immunization generated robust therapeutic antitumor effects in mice grafted with TC-1 tumor cells. In a melanoma mouse model, the administration of pIL-10R to tumor-bearing mice neutralized the IL-10 expression induced by the tumor and promoted more efficient activation of dendritic cells able to capture tumor antigens and trigger an antitumor inflammatory response [17]. Plasmid-based therapy offers some advantages, as DNA vaccines are considered safe, stable, relatively inexpensive and feasible for use in humans, particularly when administered by *in vivo* electroporation [23]. Furthermore, repeated administrations of anti-IL-10 neutralizing antibodies may have side effects, such as chronic gastrointestinal inflammation [24]. Other therapeutic strategies have been shown that blocking IL-10R can increase the potency of antitumoral effects. IL-10R gene silencing in dendritic cells has improved the cell functions related to the presentation of HPV-16 antigens, increased the expression of costimulatory molecules and controlled tumor growth in mice challenged with TC-1 cells [15]. Another study combining IL-10R and TGF- β -receptor silencing in dendritic cells demonstrated the presence of increased numbers of E7-specific CD8⁺ T lymphocytes and more pronounced antitumor effects [16]. Our results add another piece of information about the beneficial aspects of the reduction of IL-10 levels in the therapeutic control of tumors and describe a new feasible experimental approach that can induce similar IL-10-reducing effects and improve the potency of anticancer vaccines.

EP further improved the therapeutic protection elicited in mice immunized with pgDE7h/pIL-10R, as seen by the induction of a robust cellular antigen-specific response. These data suggest that EP can increase the expression of pIL-10R and the duration of the induced antitumor immunity. The use of EP for DNA vaccine delivery is known to increase the number of transfected cells and extend the antigen expression time, therefore enabling a stronger activation

of protective immune responses [25]. Previous studies by our group have shown that under experimental conditions, EP promotes activation of antigen-specific CD8⁺ T cells and protection against HPV-associated tumors in mice [26]. Notably, the phase 2/3 clinical trial with the VGX-3100 DNA vaccine delivered by EP demonstrated that the immunization procedure is well tolerated by patients and permits the control of high-grade lesions in patients with cervical intraepithelial neoplasia [27]. This evidence supports the use of EP for the delivery of DNA vaccines and may contribute to the development of active immunotherapeutic strategies capable of controlling the growth of tumors in more advanced stages.

In the current study, coadministration of pIL-10R and pgDE7h followed by EP increased the magnitude of the activated CD8⁺ T cell responses and the number of cells simultaneously expressing IFN- γ , TNF- α and CD107a. The induction of polyfunctional CD8⁺ T cells is related to the control of HPV-associated cancer progression in murine models and in patients [28–30]. Accordingly, it has been suggested that the development of this type of cell correlates positively with the clinical efficacy of therapeutic vaccines against high-grade cervical lesions [31]. Other groups have shown that blocking IL-10/IL-10R signaling during antigen presentation favors the induction of immune responses with stronger CD8⁺ T cell responses and increased efficacy against tumors [15]. However, there is clinical evidence that IL-10 has a dual role in cancer therapy, as IL-10 can promote the enhancement of antigen-specific CD8⁺ cytotoxic T lymphocyte responses and expression of Th1 cytokines and can activate tumor-resident CD8⁺ T cells [32–36]. Our results provide experimental evidence that the neutralization of IL-10 by the expression of IL-10R improves the activation of polyfunctional CD8⁺ T lymphocytes in the presence of a vaccine vector capable of inducing a protective immune response. Thus, the conflicting results regarding the therapeutic effects of IL-10 may be, at least in part, explained by the specific features of the experimental model used in the present study. The coadministration of pIL-10R and pgDE7h clearly promoted an adjuvant effect, particularly in situations in which the tumors had reached larger sizes that downregulated the activation of the effector immune responses capable of recognizing and destroying the tumor cells. The main question to be answered in the future will be the fate of this new adjuvant treatment under clinical conditions.

In our experimental conditions, the expression of pIL-10R led to the enhanced migration of activated E7-specific CD8⁺ T cells into the tumor mass. Importantly, our findings suggest that the cells induced in this specific condition and present in the tumor microenvironment are not anergic and may contribute to tumor control. Administration of an anti-IL-10R mAb associated with immunization with E7-derived long peptides makes the tumor microenvironment more accessible for CD8⁺ T cell infiltration [37]. Nonetheless, other pathways that do not involve modulation by IL-10 can interfere with the activation

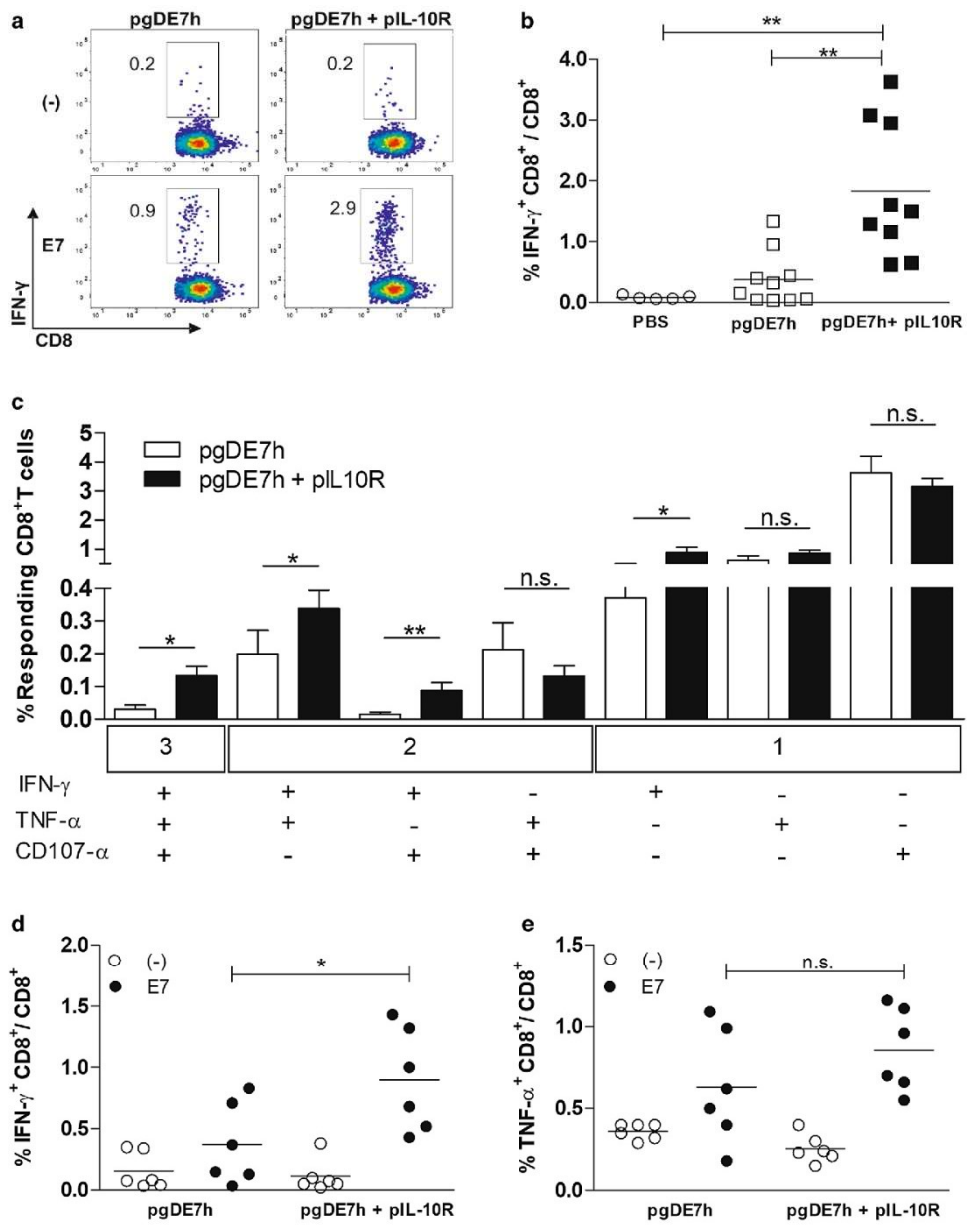


Fig. 4 Coadministration of pIL-10R with pgDE7h enhances the activation of E7-specific CD8⁺ T cells. Mice were injected with TC-1 tumor cells and immunized 14 days later by in vivo EP with one 5 μg dose of pgDE7h with or without two 50 μg doses of pIL-10R administered 5 days apart by in vivo EP. **a** and **b** Blood samples and splenocytes **c–e** were harvested 28 days after immunization and stimulated overnight with the HPV-16 E7 K^b MHC class I-restricted immunodominant epitope peptide. The frequencies of IFN-γ-producing CD8⁺ T cells were determined by flow cytometry and are shown as representative dot plots **a** or percentages **b**. Unstimulated (-) IFN-γ-producing CD8⁺ T cell frequencies were below 0.2%. (*n* = 5–10) (ANOVA, posttest: Bonferroni). **c** The percentages of CD8⁺ T cells expressing IFN-γ, TNF-α and CD107a were determined by flow cytometry. **d** Frequencies of CD8⁺ T cells producing IFN-γ or e TNF-α (Student's *t* test) (*n* = 6). **p* < 0.05, ***p* < 0.01, *ns* not significant

and migratory behavior of T cells, leading to the blockade of cytotoxic activity at the tumor site. Checkpoint-blocking mAbs, such as those targeting PD-1/PD-L1 and CTLA4, are also alternatives to increase the potency of therapeutic vaccines [38, 39]. Our findings add a new and alternative approach that may impact both the activation of cytotoxic T cells and the immunosuppressive mechanisms triggered by tumor cells.

Together, the data presented in this study demonstrate that pIL-10R has an adjuvant effect when coadministered with the pgDE7h vaccine, improving both the protective antitumor immunity and therapeutic efficacy against HPV-associated tumors. The results represent a clinically translatable therapeutic approach capable of controlling immunological escape mechanisms induced by tumors and improving the mounting of specific cytotoxic responses to HPV-associated malignancies.

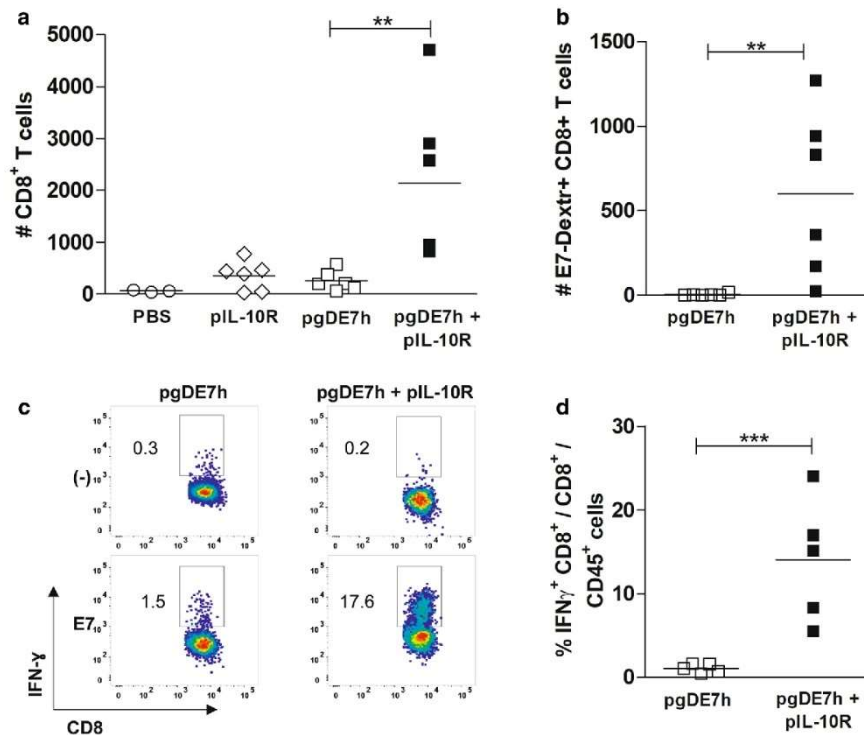


Fig. 5 Combination of pgDE7h and pIL-10R induces the infiltration of antigen-specific CD8⁺ T lymphocytes into the tumor site. Mice were injected with TC-1 tumor cells and immunized 14 days later by in vivo EP with one 5 μg dose of pgDE7h with or without two 50 μg doses of pIL-10R administered 5 days apart. The tumors were harvested 28 days after the challenge and analyzed by flow cytometry.

a Number of total or **b** E7-specific CD8⁺ T cells that infiltrated the tumor site (ANOVA, Bonferroni). **c** Representative dot plots and **d** percentages of IFN-γ-producing CD8⁺ T cells after overnight stimulation with HPV-16 E7-derived peptide (Student's *t* test). Unstimulated (-) IFN-γ-producing CD8⁺ T cell frequencies were below 0.3%. ***p* < 0.01, ****p* < 0.001

Acknowledgements We thankfully acknowledge the technical support of Eduardo Gimenes Martins and Carolina Bertelli.

Author contributions JRS, MD and LCSF conceived the study and the experimental design. MOD supervised the experimental work. JRS, NSS, MOS, LRMMA, ACRM, and MOD carried out the experiments, processed the experimental data, and participated in the interpretation of the results. EGR discussed the results and contributed to the writing of the manuscript. JRS wrote the manuscript with support from MOD and LCSF.

Funding This study was supported by funds from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and University of São Paulo (USP). Jamile R. Silva was a fellow supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Grant 2014/11073-1; Natiely S. Sales was a fellow supported by FAPESP, grant 2016/14344-1; Mariângela O. Silva was a fellow supported by FAPESP, Grant 2016/11397-7; Luana R. M. M. Aps was a fellow supported by FAPESP, Grant 2013/15360-2; Ana C. R. Moreno was a fellow supported by FAPESP, Grants 2015/16505-0 and 2016/00708-1 and supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Grant 560713; Mariana O. Diniz was a fellow supported by FAPESP, grant 2011/51218-0; Luís C. S. Ferreira was a fellow supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Grant 520931/1996-3. Elaine G. Rodrigues was a fellow supported by CNPq, Grant 308085/2015-9.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflicts of interest.

Ethical approval All handling procedures were performed according to the protocol approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA) of the Institute of Biomedical Sciences of the University of São Paulo (Brazil) on August 18, 2014 (project number 92/2014) and according to standard rules approved by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), Brazil.

Animal source Six–eight-week-old C57BL/6 mice were purchased from the Animal Breeding Center of the Institute of Biomedical Sciences of the University of São Paulo (Brazil) and housed in the Animal Facility at the same Institute.

Cell line authentication The TC-1 cell line was originally created and kindly provided by Dr. T.C. Wu, Johns Hopkins University, Baltimore, MD, USA. The cells tested negative for mycoplasma by PCR and were cultured for no more than 2 weeks after thawing. The cells showed consistent morphologies and growth rates prior to use in *in vivo* experiments. The cells tested positive for the expression of the HPV-16 E6 and E7 proteins by Western blotting. The TC-1 cell line is not currently available from the ATCC bank.

References

- Yaddanapudi K, Mitchell RA, Eaton JW (2013) Cancer vaccines: looking to the future. *Oncimmunology* 2:1–7. <https://doi.org/10.4161/onci.23403>
- Azar KK, Tani M, Yasuda H et al (2004) Increased secretion patterns of interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha in cervical squamous intraepithelial lesions. *Hum Pathol* 35:1376–1384. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2004.08.012>
- Bermudez-Morales VH, Gutierrez LX, Alcocer-Gonzalez JM et al (2008) Correlation between IL-10 gene expression and HPV infection in cervical cancer: a mechanism for immune response escape. *Cancer Invest* 26:1037–1043. <https://doi.org/10.1080/07357900802112693>
- Syrjänen S, Naud P, Sarian L et al (2009) Immunosuppressive cytokine Interleukin-10 (IL-10) is up-regulated in high-grade CIN but not associated with high-risk human papillomavirus (HPV) at baseline, outcomes of HR-HPV infections or incident CIN in the LAMS cohort. *Virchows Arch* 455:505–515. <https://doi.org/10.1007/s00428-009-0850-7>
- Berti FCB, Pereira APL, Cebinelli GCM et al (2017) The role of interleukin 10 in human papilloma virus infection and progression to cervical carcinoma. *Cytokine Growth Factor Rev* 34:1–13. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2017.03.002>
- Alcocer-González JM, Berumen J, Taméz-Guerra R et al (2006) In Vivo expression of immunosuppressive cytokines in human papillomavirus-transformed cervical cancer cells. *Viral Immunol* 19:481–491. <https://doi.org/10.1089/vim.2006.19.481>
- Chuang C-Y, Sung W-W, Wang L et al (2012) Differential Impact of IL-10 expression on survival and relapse between HPV16-positive and -negative oral squamous cell carcinomas. *PLoS One* 7:e47541. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047541>
- Bornstein S, Schmidt M, Choonoo G et al (2016) IL-10 and integrin signaling pathways are associated with head and neck cancer progression. *BMC Genom* 17:38. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2359-6>
- Chen L, Qiu M, He W et al (2012) Functional study of immature dendritic cells co-transfected with IL-10 and TGF-beta 1 genes *in vitro*. *Mol Biol Rep* 39:6633–6639. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-1468-4>
- ten Broeke T, Wubbolts R, Stoorvogel W (2013) MHC class II antigen presentation by dendritic cells regulated through endosomal sorting. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5:a016873. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016873>
- Maldonado RA, von Andrian UH (2010) How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells. *Adv Immunol* 108:111–165. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380995-7.00004-5>
- García-Rocha R, Moreno-Lafont M, Mora-García ML et al (2015) Mesenchymal stromal cells derived from cervical cancer tumors induce TGF-β1 expression and IL-10 expression and secretion in the cervical cancer cells, resulting in protection from cytotoxic T cell activity. *Cytokine* 76:382–390. <https://doi.org/10.1016/j.cyt.2015.09.001>
- Sevko A, Umansky V (2013) Myeloid-derived suppressor cells interact with tumors in terms of myelopoiesis, tumorigenesis and immunosuppression: Thick as thieves. *J Cancer* 4:3–11. <https://doi.org/10.7150/jca.5047>
- Song X, Guo W, Cui J et al (2011) A tritherapy combination of a fusion protein vaccine with immune-modulating doses of sequential chemotherapies in an optimized regimen completely eradicates large tumors in mice. *Int J Cancer* 128:1129–1138. <https://doi.org/10.1002/ijc.25451>
- Kim JH, Kang TH, Noh KH et al (2011) Blocking the immunosuppressive axis with small interfering RNA targeting interleukin (IL)-10 receptor enhances dendritic cell-based vaccine potency. *Clin Exp Immunol* 165:180–189. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2011.04410.x>
- Ahn YH, Hong SO, Kim JH et al (2015) The siRNA cocktail targeting interleukin 10 receptor and transforming growth factor-β receptor on dendritic cells potentiates tumour antigen-specific CD8 + T cell immunity. *Clin Exp Immunol* 181:164–178. <https://doi.org/10.1111/cei.12620>

17. Marchi LHL, Paschoalin T, Travassos LR, Rodrigues EG (2011) Gene therapy with interleukin-10 receptor and interleukin-12 induces a protective interferon- γ -dependent response against B16F10-Nex2 melanoma. *Cancer Gene Ther* 18:110–122. <https://doi.org/10.1038/cgt.2010.58>
18. Diniz MO, Cariri FAMO, Aps LRMM, Ferreira LCS (2013) Enhanced therapeutic effects conferred by an experimental DNA vaccine targeting human papillomavirus-induced tumors. *Hum Gene Ther* 24:861–870. <https://doi.org/10.1089/hum.2013.102>
19. Porchia BFMM, Diniz MO, Cariri FAMO et al (2011) Purified herpes simplex type 1 glycoprotein D (gD) genetically fused with the type 16 human papillomavirus E7 oncoprotein enhances antigen-specific CD8 + T cell responses and confers protective antitumor immunity. *Mol Pharm* 8:2320–2330. <https://doi.org/10.1021/mp200194s>
20. Diniz MO, Lasaro MO, Ertl HC, Ferreira LCS (2010) Immune responses and therapeutic antitumor effects of an experimental DNA vaccine encoding human papillomavirus type 16 oncoproteins genetically fused to herpesvirus glycoprotein D. *Clin Vaccine Immunol* 17:1576–1583. <https://doi.org/10.1128/CLV.00264-10>
21. Lin KY, Guarnieri FG, Staveley-O'Carroll KF et al (1996) Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. *Cancer Res* 56:21–26
22. Diniz MO, Sales NS, Silva JR, Ferreira LCS (2016) Protection against HPV-16-associated tumors requires the activation of CD8 + effector memory T cells and the control of myeloid-derived suppressor cells. *Mol Cancer Ther* 15:1920–1930. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-15-0742>
23. Lee S-H, Danishmalik SN, Sin J-I (2015) DNA vaccines, electroporation and their applications in cancer treatment. *Hum Vaccin Immunother* 11:1889–1900. <https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1035502>
24. Ni G, Wang T, Walton S et al (2015) Manipulating IL-10 signaling blockade for better immunotherapy. *Cell Immunol* 293:126–129. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2014.12.012>
25. Gothelf A, Gehl J (2012) What you always needed to know about electroporation based DNA vaccines. *Hum Vaccin Immunother* 8:1694–1702. <https://doi.org/10.4161/hv.22062>
26. Sales NS, Silva JR, Aps LRMM et al (2017) In vivo electroporation enhances vaccine-mediated therapeutic control of human papilloma virus-associated tumors by the activation of multifunctional and effector memory CD8 + T cells. *Vaccine*. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.11.011>
27. Trimble CL, Morrow MP, Kravnyak KA et al (2015) Safety, efficacy, and immunogenicity of VGX-3100, a therapeutic synthetic DNA vaccine targeting human papillomavirus 16 and 18 E6 and E7 proteins for cervical intraepithelial neoplasia 2/3: A randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2b trial. *Lancet* 386:2078–2088. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00239-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00239-1)
28. De Rosa SC, Lu FX, Yu J et al (2004) Vaccination in humans generates broad T cell cytokine responses. *J Immunol* 173:5372–5380
29. Precopio ML, Betts MR, Parrino J et al (2007) Immunization with vaccinia virus induces polyfunctional and phenotypically distinctive CD8(+) T cell responses. *J Exp Med* 204:1405–1416. <https://doi.org/10.1084/jem.20062363>
30. Rizzuto GA, Merghoub T, Hirschhorn-Cymerman D et al (2009) Self-antigen-specific CD8 + T cell precursor frequency determines the quality of the antitumor immune response. *J Exp Med* 206:849–866. <https://doi.org/10.1084/jem.20081382>
31. Kim TJ, Jin H-T, Hur S-Y et al (2014) Clearance of persistent HPV infection and cervical lesion by therapeutic DNA vaccine in CIN3 patients. *Nat Commun* 5:5317. <https://doi.org/10.1038/ncomms6317>
32. Li O (2013) The paradox of IL-10-mediated modulation in cervical cancer (Review). *Biomed Reports*. <https://doi.org/10.3892/br.2013.69>
33. Wilke CM, Wei S, Wang L et al (2011) Dual biological effects of the cytokines interleukin-10 and interferon- γ . *Cancer Immunol Immunother* 60:1529–1541. <https://doi.org/10.1007/s00262-011-1104-5>
34. Santin AD, Hermonat PL, Ravaggi A et al (2000) Interleukin-10 increases Th1 cytokine production and cytotoxic potential in human papillomavirus-specific CD8(+) cytotoxic T lymphocytes. *J Virol* 74:4729–4737
35. Wang Y, Liu X-H, Li Y-H, Li O (2013) The paradox of IL-10-mediated modulation in cervical cancer. *Biomed Rep* 1:347–351. <https://doi.org/10.3892/br.2013.69>
36. Li L, Ma Y, Liu S et al (2016) Interleukin 10 promotes immune response by increasing the survival of activated CD8 + T cells in human papillomavirus 16-infected cervical cancer. *Tumor Biol* 37:16093–16101. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5466-3>
37. Chen S, Ni G, Wu X et al (2016) Blocking IL-10 signalling at the time of immunization renders the tumour more accessible to T cell infiltration in mice. *Cell Immunol* 300:9–17. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2015.11.002>
38. Ahrends T, Baba N, Xiao Y et al (2016) CD27 agonism plus PD-1 blockade recapitulates CD4 + T-cell help in therapeutic anticancer vaccination. *Cancer Res* 76:2921–2931. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-3130>
39. Duraiswamy J, Kaluza KM, Freeman GJ, Coukos G (2013) Dual blockade of PD-1 and CTLA-4 combined with tumor vaccine effectively restores T-cell rejection function in tumors. *Cancer Res* 73:3591–3603. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4100>

Affiliations

Jamile R. Silva¹ · Natiely S. Sales¹ · Mariângela O. Silva¹ · Luana R. M. M. Aps¹ · Ana C. R. Moreno¹ · Elaine G. Rodrigues² · Luis C. S. Ferreira¹ · Mariana O. Diniz^{1,3}

¹ Vaccine Development Laboratory, Department of Microbiology, Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1374, São Paulo, SP 05508-000, Brazil

² Tumor Immunobiology Laboratory, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Escola Paulista de Medicina, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil

³ Present Address: Division of Infection and Immunity, University College London, 5 University St, Bloomsbury, London WC1E 6JF, UK

**APÊNDICE C– Artigo científicos publicados em colaboração
durante o período de dotouramento**



In vivo electroporation enhances vaccine-mediated therapeutic control of human papilloma virus-associated tumors by the activation of multifunctional and effector memory CD8⁺ T cells

Natiely S. Sales, Jamile R. Silva, Luana R.M.M. Aps, Mariângela O. Silva, Bruna F.M.M. Porchia, Luís Carlos S. Ferreira*, Mariana O. Diniz¹

Vaccine Development Laboratory, Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 2 August 2017
Received in revised form 1 November 2017
Accepted 7 November 2017
Available online xxx

Keywords:
HPV-induced tumors
DNA vaccine
Therapeutic vaccine
In vivo electroporation
Cytotoxic T cells
Tumor protection

ABSTRACT

In vivo electroporation (EP) has reignited the clinical interest on DNA vaccines as immunotherapeutic approaches to control different types of cancer. EP has been associated with increased immune response potency, but its capacity in influencing immunomodulation remains unclear. Here we evaluated the impact of *in vivo* EP on the induction of cellular immune responses and therapeutic effects of a DNA vaccine targeting human papillomavirus-induced tumors. Our results demonstrate that association of EP with the conventional intramuscular administration route promoted a more efficient activation of multifunctional and effector memory CD8⁺ T cells with enhanced cytotoxic activity. Furthermore, EP increased tumor infiltration of CD8⁺ T cells and avoided tumor recurrences. Finally, our results demonstrated that EP promotes local migration of antigen presenting cells that enhances with vaccine co-delivery. Altogether the present evidences shed further light on the *in vivo* electroporation action and its impact on the immunogenicity of DNA vaccines.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

DNA vaccines represent a simple and safe alternative to activate cellular and humoral immune responses [1,2]. Although these vaccines demonstrated insufficient immunogenicity in the first clinical studies, different strategies were established to increase their potency in humans, including codon usage optimization, incorporation of adjuvants and more efficient gene delivery methods [3–6]. In this context, *in vivo* electroporation (EP) employs electrical pulses that generate transient pores in the cell membrane and promote DNA displacement [7–10]. The greater transfection efficiency related to this technique was shown to increase 10 to 100-fold the amount of antigen produced after plasmid administration by the intramuscular or intradermal routes associated with EP [11–15]. EP also promotes the recruitment of pro-inflammatory cells to the inoculation site and induces the local secretion of cytokines and chemokines, which can amplify the vaccine-induced immune responses [16–18]. *In vivo* EP has been evaluated in clinical studies

to deliver DNA vaccines against infections, such as those caused by HIV [19] and hepatitis C [20]. The immunization with *in vivo* EP has been well tolerated and its capacity to activate robust cellular immune responses has directed this vaccine delivery technology toward the search of therapeutic vaccines against different types of cancer, including prostate [21], melanoma (ClinicalTrials NCT00471133) and HPV-induced cervical tumors [22,23].

Cervical cancer is the fourth cause of cancer death among women worldwide [24]. Persistent infections with high-risk HPVs are the causative agent of nearly all cervical cancer cases and significant numbers of other anogenital and oropharyngeal tumors [25–27]. HPV-16 and 18 are the virus types most commonly related to cancer induction and are responsible for 50 and 35% of the cervical cancer cases, respectively [28]. The viral oncoproteins E6 and E7, which are constitutively expressed by the tumor cells, promote cell transformation and maintenance of the malignant state, and therefore, represent potential targets for the development of therapeutic vaccine formulations against HPV-associated tumors [29].

Recently, intramuscular (i.m.) immunization with *in vivo* electroporation has been employed to deliver DNA vaccines to patients with Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN 2 or 3) associated to HPV-16 or 18. In the GX-188E phase I study, seven out of nine

* Corresponding author at: Av. Prof. Lineu Prestes, 1374, São Paulo, SP 05508-000, Brazil.

E-mail address: lcsf@usp.br (L.C.S. Ferreira).

¹ Present Address: Division of Infection and Immunity, University College London, 5 University St, Bloomsbury WC1E 6JF, London.

<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.11.011>
0264-410X/© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Please cite this article in press as: Freyn et al., A Multi-Targeting, Nucleoside-Modified mRNA Influenza Virus Vaccine Provides Broad Protection in Mice, *Molecular Therapy* (2020), <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.04.018>

Molecular Therapy
Original Article



A Multi-Targeting, Nucleoside-Modified mRNA Influenza Virus Vaccine Provides Broad Protection in Mice

Alec W. Freyn,^{1,2} Jamile Ramos da Silva,^{3,4} Victoria C. Rosado,¹ Carly M. Bliss,¹ Matthew Pine,³ Barbara L. Mui,⁵ Ying K. Tam,⁵ Thomas D. Madden,⁵ Luis Carlos de Souza Ferreira,⁴ Drew Weissman,³ Florian Krammer,¹ Lynda Coughlan,¹ Peter Palese,^{1,6} Norbert Pardi,^{3,7} and Raffael Nachbagauer^{1,7}

¹Department of Microbiology, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY 10029, USA; ²Graduate School of Biomedical Sciences, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY 10029, USA; ³Department of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA 19104, USA; ⁴Vaccine Development Laboratory, Department of Microbiology, Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; ⁵Acuitas Therapeutics, Vancouver, BC, Canada; ⁶Department of Medicine, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY 10029, USA

Influenza viruses are respiratory pathogens of public health concern worldwide with up to 650,000 deaths occurring each year. Seasonal influenza virus vaccines are employed to prevent disease, but with limited effectiveness. Development of a universal influenza virus vaccine with the potential to elicit long-lasting, broadly cross-reactive immune responses is necessary for reducing influenza virus prevalence. In this study, we have utilized lipid nanoparticle-encapsulated, nucleoside-modified mRNA vaccines to intradermally deliver a combination of conserved influenza virus antigens (hemagglutinin stalk, neuraminidase, matrix-2 ion channel, and nucleoprotein) and induce strong immune responses with substantial breadth and potency in a murine model. The immunity conferred by nucleoside-modified mRNA-lipid nanoparticle vaccines provided protection from challenge with pandemic H1N1 virus at 500 times the median lethal dose after administration of a single immunization, and the combination vaccine protected from morbidity at a dose of 50 ng per antigen. The broad protective potential of a single dose of combination vaccine was confirmed by challenge with a panel of group 1 influenza A viruses. These findings support the advancement of nucleoside-modified mRNA-lipid nanoparticle vaccines expressing multiple conserved antigens as universal influenza virus vaccine candidates.

INTRODUCTION

Influenza viruses cause substantial morbidity and mortality in humans across the globe, leading to the death of more than half a million individuals annually.¹ Vaccination is the most common preventative measure utilized, but current influenza virus vaccines remain imperfect and do not provide broad and durable protective immunity. Quadrivalent inactivated influenza virus vaccines (QIVs) are most commonly administered to the public, but effectiveness of these vaccines lies in the range of 10%–60% due to a variety of factors, including poor immunogenicity and strain mismatches.^{2,3} In

addition, seasonal vaccines are formulated to aid in protection from influenza viruses circulating in the human population, but they provide minimal protection from emerging influenza viruses with pandemic potential.⁴ Therefore, development of a novel vaccine platform targeting multiple conserved epitopes of influenza viruses capable of providing broadly reactive and long-lasting protection is highly desirable as a candidate for a universal influenza virus vaccine.

Previous work has focused on identifying conserved regions of influenza viruses that can act as targets for the induction of broadly protective humoral and cellular responses. The stalk of the major surface glycoprotein, hemagglutinin (HA), has been the object of much attention due to its ability to elicit broadly reactive neutralizing antibodies, which can protect from infection by influenza viruses displaying a wide variety of HA subtypes.^{5–9} Importantly, in addition to classical measures of HA-mediated protection such as hemagglutination inhibition,¹⁰ antibodies against the HA stalk have been shown to correlate with protection in humans.^{11–13} More recently, the influenza virus surface glycoprotein neuraminidase (NA) has raised considerable interest after antibodies to this protein were found to provide protection within a single subtype, and broadly reactive NA-specific antibodies were isolated from human donors.^{14–18} The highly conserved matrix-2 (M2) ion channel protein and nucleoprotein (NP) of the influenza virus have also been found to elicit broad protective immune responses through antibody Fc-mediated mechanisms and cellular responses.^{19–22} Simultaneous targeting of these proteins with a single

Received 31 January 2020; accepted 14 April 2020;
<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.04.018>.

²These authors contributed equally to this work.

Correspondence: Raffael Nachbagauer, Department of Microbiology, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY 10029, USA.

E-mail: raffael.nachbagauer@mssm.edu

Correspondence: Norbert Pardi, Department of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA 19104, USA.

E-mail: pnorbert@pennmedicine.upenn.edu



Research Paper

Antigen Delivery to DEC205⁺ Dendritic Cells Induces Immunological Memory and Protective Therapeutic Effects against HPV-Associated Tumors at Different Anatomical Sites

Mariângela O. Silva¹, Bianca S. Almeida², Natiely S. Sales¹, Mariana O. Diniz^{1*}, Luana R.M.M. Aps¹, Karine B. Rodrigues¹, Jamile R. Silva¹, Ana C. R. Moreno¹, Bruna F.M.M. Porchia¹, Fernando B. Sulczewski², Silvia B. Boscardin², Luis C. S. Ferreira¹✉

1. Vaccine Development Laboratory, Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil
 2. Laboratory of Antigen Targeting to Dendritic Cells, Department of Parasitology, Institute of Biomedical Sciences University of São Paulo, São Paulo, Brazil

*Present address: Division of Infection and Immunity, University College London, 5 University St, Bloomsbury WC1E 6JF, London.

✉ Corresponding author. Av. Prof. Lineu Prestes, 1374, São Paulo-SP, Brazil, Zip code: 05508-000; Phone: +55 1130917356. Email address: lcsf@usp.br (L.C.S.Ferreira).

© The author(s). This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>). See <http://ivyspring.com/terms> for full terms and conditions.

Received: 2020.12.11; Accepted: 2021.05.02; Published: 2021.07.13

Abstract

The generation of successful anticancer vaccines relies on the ability to induce efficient and long-lasting immune responses to tumor antigens. In this scenario, dendritic cells (DCs) are essential cellular components in the generation of antitumor immune responses. Thus, delivery of tumor antigens to specific DC populations represents a promising approach to enhance the efficiency of antitumor immunotherapies. In the present study, we employed antibody-antigen conjugates targeting a specific DC C-type lectin receptor. For that purpose, we genetically fused the anti-DEC205 monoclonal antibody to the type 16 human papillomavirus (HPV-16) E7 oncoprotein to create a therapeutic vaccine to treat HPV-associated tumors in syngeneic mouse tumor models. The therapeutic efficacy of the α DEC205-E7 mAb was investigated in three distinct anatomical tumor models (subcutaneous, lingual and intravaginal). The immunization regimen comprised two doses of the α DEC205-E7 mAb coadministered with a DC maturation stimulus (Polyinosinic:polycytidylic acid, poly (I:C)) as an adjuvant. The combined immunotherapy produced robust antitumor effects on both the subcutaneous and orthotopic tumor models, stimulating rapid tumor regression and long-term survival. These outcomes were related to the activation of tumor antigen-specific CD8⁺ T cells in both systemic compartments and lymphoid tissues. The α DEC205-E7 antibody plus poly (I:C) administration induced long-lasting immunity and controlled tumor relapses. Our results highlight that the delivery of HPV tumor antigens to DCs, particularly via the DEC205 surface receptor, is a promising therapeutic approach, providing new opportunities for the development of alternative immunotherapies for patients with HPV-associated tumors at different anatomical sites.

Key words: DEC205 receptor, cancer immunotherapy, dendritic cells, HPV

Introduction

The immune system has long been studied as a key element in the fight against cancer. Years of research have been devoted to trying to understand how to modify the immune system for the benefit of patients. Currently, the use of immunotherapy

represents a pivotal advance in oncology through different strategies that stimulate and amplify the immune response, promoting the elimination of tumor cells [1,2]. In this landscape, the activation of dendritic cells (DCs) is an important feature in cancer



ELSEVIER



Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine
37 (2021) 102445

NANO-0000102445; No of Pages 9



nanomedjournal.com

Nano-multilamellar lipid vesicles loaded with a recombinant form of the chikungunya virus E2 protein improve the induction of virus-neutralizing antibodies

Aléxia Adrienne Venceslau-Carvalho, MSc^a, Marianna Teixeira de Pinho Favaro, PhD^a, Lennon Ramos Pereira, MSc^a, Mônica Josiane Rodrigues-Jesus, PhD^a, Samuel Santos Pereira, MSc^a, Robert Andreato-Santos, PhD^a, Rúbens Prince dos Santos Alves, PhD^a, Maria Fernanda Castro-Amarante, PhD^a, Karine Bitencourt Rodrigues, MSc^a, Jamile Ramos da Silva, MSc^a, Rafael Rahal Guaragna Machado, BSc^b, Marielton dos Passos Cunha, PhD^c, Paolo Marinho de Andrade Zanotto, PhD^c, Wesley Luzetti Fotoran, PhD^d, Gerhard Wunderlich, PhD^d, Edison Luiz Durigon, PhD^b, Luís Carlos de Souza Ferreira, PhD^{a,*}

^aVaccine Development Laboratory, Microbiology Department and Parasitology Department, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

^bLaboratory of Clinical and Molecular Virology, Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

^cLaboratory of Molecular Evolution and Bioinformatics, Department of Microbiology, Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

^dUnit for Drug Development and Plasmodium Molecular Biology, Parasitology Department, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Brazil

Revised 1 July 2021

Abstract

Chikungunya virus (CHIKV) is responsible for a self-limited illness that can evolve into long-lasting painful joint inflammation. In this study, we report a novel experimental CHIKV vaccine formulation of lipid nanoparticles loaded with a recombinant protein derived from the E2 structural protein. This antigen fragment, designated Δ E2.1, maintained the antigenicity of the native viral protein and was specifically recognized by antibodies induced in CHIKV-infected patients. The antigen has been formulated into nanoparticles consisting of nano-multilamellar vesicles (NMVs) combined with the adjuvant monophosphoryl lipid A (MPLA). The vaccine formulation demonstrated a depot effect, leading to controlled antigen release, and induced strong antibody responses significantly higher than in mice immunized with the purified protein combined with the adjuvant. More relevantly, E2-specific antibodies raised in mice immunized with Δ E2.1-loaded NMV-MPLA neutralized CHIKV under *in vitro* conditions. Taken together, the results demonstrated that the new nanoparticle-based vaccine formulation represents a promising approach for the development of effective anti-CHIKV vaccines.

© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved.

Key words: Chikungunya; Nanovaccine; CHIKV; NMVs; MPLA

Acknowledgments: We would like to acknowledge the financial support of Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico [CNPq grant number: 168284/2017-0], Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo [FAPESP grant number RAS: 2016/23560-0; RRGM: 2017/24769-2; ELD: 2016/20045-7; MPC: 2016/08204-2; PMAZ: 2017/23281-6; WLF: 2016/19145-7] and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico–CAPES. We appreciate the support of the Supramolecular Chemistry Laboratory and CEFAP. We generously acknowledge the valuable support and contributions of Eduardo Gimenes and Eric Lira. The protein purification steps were performed with the assistance of DeltaLys Biotechnology.

* Corresponding author.

E-mail addresses: alexiabiotech@usp.br, (A.A. Venceslau-Carvalho), favaro.mtp@gmail.com, (M. Teixeira de Pinho Favaro), lennon_rp@hotmail.com, (L. Ramos Pereira), modrigues4@gmail.com, (M.J. Rodrigues-Jesus), samuelbiomedicina@usp.br, (S. Santos Pereira), robert_andreato@hotmail.com, (R. Andreato-Santos), rubens.bmc@gmail.com, (R.P. dos Santos Alves), mfarante@gmail.com, (M.F. Castro-Amarante), karinebitencourt@usp.br, (K. Bitencourt Rodrigues), jamile@usp.br, (J. Ramos da Silva), rafaelmachado@usp.br, (R. Rahal Guaragna Machado), marieltondospassos@gmail.com, (M. dos Passos Cunha), pzanotto@usp.br, (P. Marinho de Andrade Zanotto), wesleylfw@hotmail.com, (W. Luzetti Fotoran), gwunder@usp.br, (G. Wunderlich), eldurigo@usp.br, (E.L. Durigon), lcsf@usp.br, alexiabiotech@usp.br, (L.C. de Souza Ferreira).

<https://doi.org/10.1016/j.nano.2021.102445>

1549-9634/© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved.



An Acad Bras Cienc (2021) 93(4): e20200424 DOI 10.1590/0001-3765202120200424

Anais da Academia Brasileira de Ciências | Annals of the Brazilian Academy of Sciences

Printed ISSN 0001-3765 | Online ISSN 1678-2690

www.scielo.br/aabc | www.fb.com/aabcjournal

MICROBIOLOGY

***Ureaplasma diversum* clearance in lung mice infection is mediated by neutrophils**

JAMILE R. DA SILVA, PERCÍLLIA V.S. DE OLIVEIRA, PATRICIA NOLASCO, HUGO SANTANA, IZADORA S. REZENDE, DENISAR P. DOS SANTOS, JORGE TIMENETSKY, LUCAS M. MARQUES, TIANA B. FIGUEIREDO & ROBSON A.A DA SILVA

Abstract: Pneumonia in cattle is one of the causes of morbidity rates and economic loss. The host response to lung infections caused by *Ureaplasma diversum* in bovines is virtually unknown. Here in the immune response was evaluated in a murine model for an experimental pulmonary infection by *U. diversum*. Therefore, A1, BALB/C and C57BL/6 mice received intratracheal inoculation of *U. diversum* and were evaluated after 1, 2, 3, 7 and 14 days and the clinical specimens were collected. In bronchoalveolar lavages (BAL) an increase of inflammatory cells was observed. Neutrophils were the main cells recruited to the site of infection and the infiltration was coincided with the production of pro-inflammatory cytokines. We found a large amount of neutrophil in this initial period, followed by a decrease 7 and 14 days post infection, accompanied by bacterial clearance. Our results evidenced the presence of *U. diversum* within the neutrophil that suggests a phagocytic role of this cell in the elimination of the infection. The immune response features reported here are the initial evidence that healthy immune systems may control these microorganisms. This may be the first step to design new strategies immune based to control the infections in naturally infected hosts.

Key words: infection pulmonary, neutrophil, mycoplasma, cattles.

INTRODUCTION

Bloodstream circulating neutrophils have a short-life and are important in initiating defenses against foreign microorganisms (Summers et al. 2010). After an infection or inflammation, these cells are attracted by mediators, such as complement fragment C5a (Dragomir et al. 2012), leukotriene B₄ (Afonso et al. 2012), CXCL-2 (Uchida et al. 2009), myeloperoxidase (Klinke et al. 2011) and antimicrobial peptides (Ma et al. 2012). These cells migrate and interact with the stimulated endothelial cell surface (Rigby & DeLeo 2012). Inside the tissues, granules and antimicrobial proteins of mobilized neutrophils kill the infectious agent, but also cause damage to the infected tissue site (Summers et al. 2010).

Usually, the microorganism is destroyed in the phagocytic vacuole of activated neutrophil (Rigby & DeLeo 2012).

Neutrophils may also be involved in the response to *U. diversum* infections in bovines. This mollicute adheres to the mucosa of the reproductive tract of these animals and may cause important economic loss due to abortion, vulvovaginitis and other urogenital disturbances (ter Laak et al. 1993, Rottem 2003, Petit et al. 2008). Importantly, respiratory infections are common as well and pulmonary diseases might be associate with pneumonia and economic implications. As with all Mollicutes, *U. diversum* lacks a cell wall but may present an external glycocalix (Marques et al. 2016, Marques et al.

Artigo no prelo

Active immunization combined with cisplatin confers enhanced therapeutic protection and prevents relapses of HPV-induced tumors at different anatomical sites

Bruna Felício Milazzotto Maldonado Porchia^{1,2,&}, Luana Raposo de Melo Moraes Aps^{1,2}, Ana Carolina Ramos Moreno¹, Jamile Ramos da Silva¹, Mariângela de Oliveira Silva¹, Natiely Silva Sales¹, Rubens Prince dos Santos Alves¹, Clarissa Ribeiro Reily Rocha³, Matheus Molina Silva³, Karine Bitencourt Rodrigues¹, Tácita Borges Barros¹, Roberta Liberato Pagni¹, Patrícia da Cruz Souza¹, Mariana de Oliveira Diniz^{1,2,#}, Luís Carlos de Souza Ferreira^{1*}

¹Vaccine Development Laboratory, Department of Microbiology, Biomedical Sciences Institute, University of Sao Paulo, Sao Paulo, SP, Brazil

²ImunoTera Soluções Terapêuticas Ltda

³DNA Repair Laboratory, Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

[&]Present address: Laboratory of Tumor Immunology, Department of Immunology, Biomedical Sciences Institute, University of Sao Paulo, Sao Paulo, SP, Brazil

[#]Present address: Division of Infection and Immunity, University College London, 5 University St, Bloomsbury WC1E 6JF, London

Running title: Active immunization combined with cisplatin against HPV-induced tumors

***Corresponding author:**

Luís C. S. Ferreira. Av. Prof. Lineu Prestes, 1374, Sao Paulo - SP, Brazil, Zip code: 05508-000

Phone: +55 11 30917356. E-mail address: lcsf@usp.br

Keywords: Cancer, HPV, vaccine, gDE7, immunotherapy

Note: Porchia, BFMM and Aps, LRMM contributed equally to this work.