

BIOTECNOLOGIAS NA PRODUÇÃO DE VACINAS PARA SARS-COV-2

Data de aceite: 31/05/2021

Tarcisio Passos Ribeiro de Campos

Professor Titular, Doutor,
Universidade Federal de Minas Gerais;
Programa de Pós-graduação em Ciências e
Técnicas Nucleares.
<http://lattes.cnpq.br/2004647037137301>

Alberto Mizrahy Campos

Doutorando, IMPA – Instituto de Matemática
Aplicada. Rio de Janeiro.
<http://lattes.cnpq.br/7720855884752578>

RESUMO: Este artigo descreve os possíveis tipos de vacinas antivirais empregadas contra a COVID-19. São apresentados antígenos de interesse empregados nas vacinas contra a síndrome respiratória aguda SARS. Em adição, é abordado resumidamente os processos tecnológicos para produção de imunizantes a base de RNA, de DNA, e de subunidades proteica. Para as vacinas com vírus selvagens inativados, a revisão limita-se a descrição das técnicas de produção viral por meios de cultura; seguindo protocolos de crescimento celular, inoculação, propagação e replicação viral; extração do vírus por lise ou brotamento; colheita viral na suspensão; remoção de ácidos nucleicos por digestão; clarificação primária (ultracentrifugação), e secundária (filtração); cromatografia por troca iônica aniônica ou exclusão de tamanho; inativação viral; ultrafiltração e filtração por diálise (UF/DF);

formulação com adjuvantes, estabilizadores; filtração para esterilização; preenchimento final; e processos de imunização.

PALAVRAS - CHAVE: Vacinas SARS-CoV-2; Vacinas de RNA; Vacinas de DNA; Vacinas de subunidades proteicas; Vacinas inativadas.

BIOTECHNOLOGIES IN THE SYNTHESIS OF VACCINES FOR SARS-COV-2

ABSTRACT: This article describes the possible types of antiviral vaccines used against COVID-19. Some interesting antigens used in vaccines against acute respiratory syndrome SARS are presented. In addition, the technological processes to produce RNA, DNA, protein subunit-based immunizing are briefly addressed. For vaccines with inactivated wild viruses, the review was limited to the description of viral production techniques by culture media; following protocols of cell growth, inoculation, propagation and viral replication; extraction of the virus by lysis or sprouting; viral harvest on suspension; removal of nucleic acids by digestion; primary (ultracentrifugation), and secondary (filtering) clarification; chromatography by anionic ion exchange or size exclusion; viral inactivation; ultrafiltration and filtration by dialysis (UF/DF); formulation with adjuvants, stabilizers; filtration for sterilization; final filling; immunization processes.

KEYWORDS: Vaccines SARS-CoV-2; RNA vaccines; DNA vaccine; protein subunits vaccine; inactivated vaccines.

INTRODUÇÃO

O presente artigo aborda as vacinas para COVID-19 desenvolvidas e registradas na Organização Mundial de Saúde (OMS). O objetivo é apresentar as diferenças tecnológicas na produção destas vacinas, e os respectivos antígenos e seus veículos de transporte empregados. A abordagem é demonstrar as tecnologias empregadas; entretanto, devido a maior disponibilidade de informação, detalhar os processos envolvidos nas vacinas de vírus inativados.

ANTÍGENOS PARA VACINAS DE CORONAVÍRUS

Em uma virose, há diversas moléculas do patógeno, internalizadas e estranhas ao organismo, que podem induzir uma resposta do sistema imunológico. O próprio corpo do vírus, ou fragmentos virais incluindo proteínas, lipídeos, polissacarídeos, ácidos nucleicos, entre outros componentes, é capaz de ativar em diferentes graus o sistema imunológico. (HU et al, 2021) A título de ilustração destes componentes virais, as estruturas lipídicas e proteicas do vírus SARS-CoV-2, causador da síndrome aguda respiratória severa COVID-2, estão ilustradas na Figura 1. A glicoproteína S é o mais importante antígeno, constituindo uma espícula na superfície dos vírus. A razão é sua grande disponibilidade na camada envelopada lipídica do vírus e sua presença exposta na estrutura viral compondo a coroa do vírus. Esta proteína faz parte do ferramental de entrada na célula hospedeira, produzindo vacinas efetivas contra o SARS-CoV ou mesmo MERS-CoV. (WRAPP et al, 2020) Por sua vez, as proteínas S com sua conformação proteica natural, são capazes de exibir alta imunogenicidade e epítomos; mesmo quando apresentadas através de perfusões de proteínas recombinantes carregadas em nanopartículas, ou também quando produzidas em células geneticamente modificadas de espécies diferentes do hospedeiro. (COLEMAN et al, 2020)

A glicoproteína S do SARS-CoV-2 contém 1273 amino ácidos, ~140 kDa. Esta proteína S contém duas subunidades S1 e S2, sendo S1 com dois domínios definidos por domínios terminais N e C (*N terminal domain*, NTD; e, *C terminal domain*, CTD, da sigla em inglês). Na subunidade S1, terminal CTD, há o domínio do receptor de ligação (*Receptor Binding Domain* – RBD, do inglês). RBD diretamente interage com o receptor ACE2 da célula hospedeira. A ACE2 é uma proteína transmembrana expressa na superfície celular do hospedeiro, em diversas células do corpo, em grande extensão no epitélio do sistema respiratório, também caracterizada como enzima conversora de angiotensina 2 (*angiotensin conversion enzyme*, ACE2, da sigla em inglês). (XU et al, 2020) Na subunidade S2 há elementos que auxiliam na fusão de membrana do vírus à célula do hospedeiro, incluindo um peptídeo para fusão de membrana interna (FP) e diversos outros peptídeos não detalhados neste artigo. Tanto a proteína S, como os fragmentos RBD, S1, e NTD,

contidos na proteína S, podem ser usadas como antígenos no desenvolvimento de vacinas. (ZHANG et al, 2020)

As proteínas N, ~50 kDa, são as mais abundantes no coronavírus, tendo múltiplas funções como formação do núcleo capsídeo, replicação do RNA e transcrição do RNA viral. (MCBRIDGE et al, 2014) Há controvérsias sobre o uso desta proteína como antígeno. (COLLISSON et al, 2000) Por sua vez, a proteína M, uma glicoproteína transmembrana de ~25 kDa, é abundante e capaz de produzir uma forte resposta imune (LIU et al, 2010), tendo a vantagem de ser geneticamente estável em mutações em diferentes espécies virais. (NEUMAN et al, 2014) As proteínas E não são adequadas para uso imunogênico, pelo pequeno peso molecular, e diferenças de codificação presentes entre coronavírus, apesar de ser responsável pela secreção de fatores inflamatórios como IL-1b, TNF, e IL-6. (NIETO-TORRES et al, 2014, ZHANG et al, 2020).

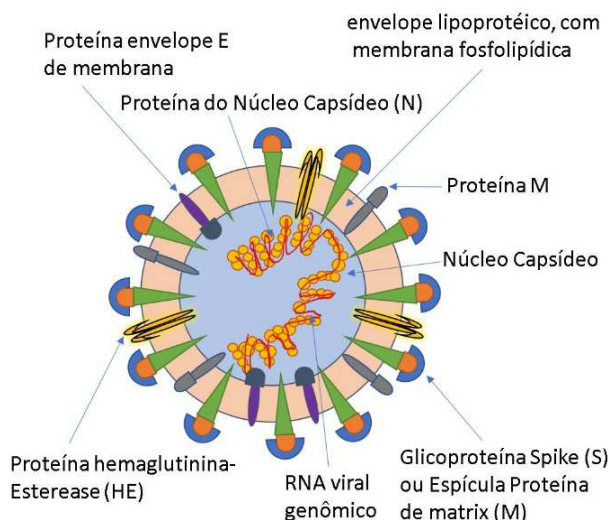


Figura 1 – Ilustração da estrutura do SARS-CoV-2 e suas principais proteínas estruturais.

A vacina é a arte de apresentar estes imunogênicos, do próprio agente ou assemelhados ao patógeno, ao sistema imunológico humano, sem produzir a doença, e, ao mesmo tempo, capaz de induzir uma imunidade adquirida ativa com potencial de antecipar e melhorar a intensidade e a rapidez da resposta imunológica à uma contaminação real do patógeno. A vacina reduz a intensidade dos efeitos deletérios produzidos pelo patógeno quando o organismo é contaminado.

VACINAS E SEUS MÉTODOS DE PRODUÇÃO

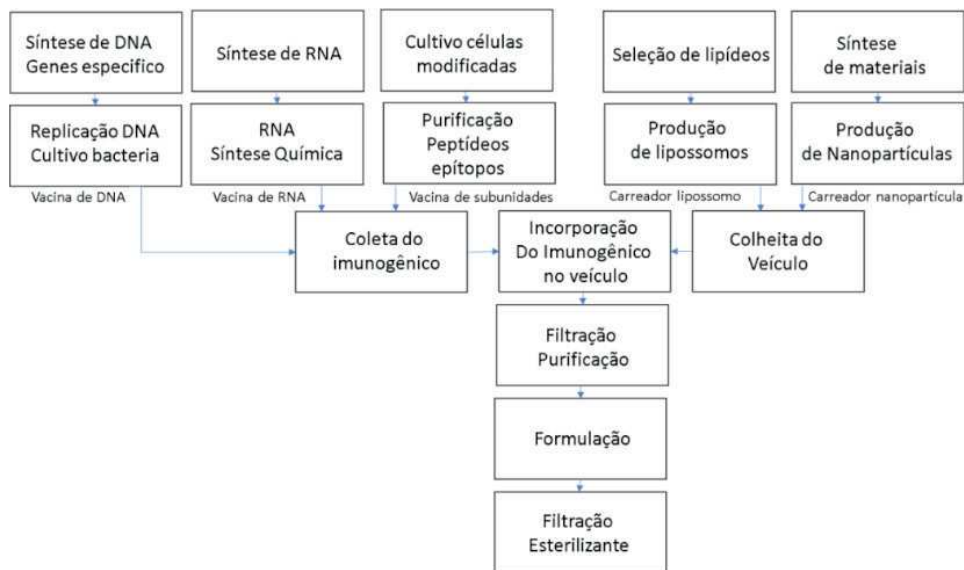


Figura 2 – Diagrama da produção de vacinas que fazem uso de partes do vírus nativo, ácidos nucleicos ou subunidades virais.

Há diversos tipos de vacinas. A figura 2 ilustra de forma resumida, e em bloco, os principais processos de produção de vacinas, que não fazem uso do corpo do vírus, mas parte da estrutura viral. Existem vacinas de ácidos nucleicos, DNA ou RNA. Há também as vacinas das subunidades virais, sendo que as subunidades são as proteínas mais efetivas na produção de uma resposta imunogênica. O grupo de vacinas, que faz uso de segmentos da estrutura do vírus, suas proteínas ou o material genético, necessita de um veículo de transporte destes componentes no organismo do animal. Estas estruturas de transporte, em geral, encapsulam estes componentes biológicos por meio de estruturas lipídicas envelopadas, ou mesmo nanopartículas. Nas próximas seções serão descritas a tecnologia das vacinas de ácidos nucleicos, RNA e DNA, e de subunidades virais.

VACINAS DE RNA MENSAGEIRO

A vacina conhecida como de RNAm, ou de ácidos nucleicos, ou vacina genética é uma tecnologia recente. Fragmentos de RNA, ou RNA sintético, são encapsulados e empregados como imunizantes. Ao entrarem nas células, fazem as células hospedeiras interpretar as instruções do RNA, como um RNA mensageiro, e empregar os ribossomos para produzir fragmentos das proteínas virais. Depois de varredura do código do RNAm, este é descartado. A célula desloca os fragmentos proteicos para a superfície da

célula. Células do sistema imune reconhecem estes fragmentos na superfície celular como antígenos, e monta um sistema de defesa contra estes componentes virais. (KRAMPS e ELBERS, 2017)

As vacinas de RNA carregam informação genética para a expressão endógena de proteínas no paciente. A molécula de RNA é composta por ribonucleotídeos. Estes são constituídos por uma ribose (açúcar), um fosfato e as bases nitrogenadas. As bases nitrogenadas são as purinas: Adenina (A) e Guanina (G); e, pirimidinas: Citosina (C) e Uracila (U). A síntese do vetor de RNA contém uma estrutura de leitura aberta que codifica o antígeno de interesse, otimizado, tendo as regiões não-traduzida (*untranslated region*, UTR, da sigla em inglês) 5' e 3', nas ramificações, e internamente o código de leitura aberta (*open reading freedom*, ORF, da sigla em inglês) o terminal 5' é dito estrutura cap (*cap*, adotado do inglês, ou capacete). O cap 5' é uma estrutura encontrada na ponta 5' do RNAm eucariótico, composto por um derivado de guanosina metilada, a 7-metilguanosina (7-MegG), em uma ligação incomum 5'-5' ao nucleotídeo terminal do transcrito primário. A ponta 3' é composta de poliadenilação da cauda 3', dita poliA. O cap 5' é necessário para a síntese de proteínas pois é onde o RNAm se liga ao ribossomo. Além, cap 5' pode proteger o RNAm de degradação por nucleases. Estas regiões servem para intensificar a produção antigênica pelo aumento da taxa de tradução. Então, 5' cap, 5' UTR, ORF, 3' UTR, e poliA são otimizados no vetor de RNAm para o imunizante. (HAMES e HOOPER, 2005)

A tecnologia envolve a sínteses de RNAm, modificação e emprego de uma tecnologia de entrega. Em geral, tem baixo custo e administração segura. Envolve a seleção do antígeno, a sequência otimizada, a construção da sequência de nucleotídeos modificados, a otimização do sistema de entrega, a avaliação da resposta imune e os testes de segurança. (CDC, 2021)

Após o RNAm sintético ser internalizado na célula hospedeira, a célula emprega o maquinário celular para produção de proteínas do vírus, e, conseqüentemente, ativar o sistema imunológico. (CDC, 2021)

A entrega de RNAm na célula é alcançada por uma formulação da molécula em nanopartículas lipídicas. Esta estrutura protege a fita de RNA e ajuda sua absorção nas células. Assim, os ácidos nucléicos podem ser entregues às células por micro injeção, eletroporação e transfecção mediada por lipídios. No caso da vacina, a molécula de RNA é encapsulada em nanopartículas lipídicas. A vacina estimula o sistema imunológico adaptativo a criar anticorpos que visam precisamente esse patógeno, em particular através da expressão de proteínas solúveis a partir do RNAm internalizado. O RNA no citosol, é reconhecido pelo complexo ribossômico, se ligando ao ribossomo. O RNAm é lido da posição 5' até 3'. No processamento, o ribossomo recebe aminoácidos que são transferidos dos tRNAs que vão se encaixando. Os aminoácidos vão se adicionado formando uma cadeia peptídica, até que a posição 5' é atingida, e o ribossomo libera o peptídeo sintetizado. O RNAm não altera o material genético no núcleo celular. A vacina de RNAm produz uma

imunidade humoral e celular. (HAJJ, 2017)

Após a transfecção de RNAm de codificação de antígeno no citosol de uma célula apresentadora de antígenos (APC), o RNAm é traduzido em peptídeo antigênico. Este peptídeo antigênico é transformado em epitopos de peptídeos menores que se ligam ao complexo de histocompatibilidade classe I ou classe II, ditos MHCs. Os MHCs são transportados para a superfície celular, onde apresentam seus epitopos antigênicos para células T CD8⁺ (citotóxica) ou CD4⁺ (T *helper*, do inglês), levando à imunidade celular ou uma resposta anticorpo específica de antígeno, respectivamente (MIDOUX e PICHON, 2014) Os linfócitos T *helper* compõe as células de memória imunológica contra o patógeno. (ABBAS, 2007)

Há vacinas de vetor RNAm não replicante, e replicante, dita RNA autorreplicante. Nesta última é necessário um elemento viral acessório que leva a auto amplificação do RNAm. Com RNA autorreplicantes, a expressão de proteínas será de elevado nível e em prolongado tempo. (KRAMPS e ELBERS, 2017)

O perfil de produção típica é um RNA sintético, a partir da sequência da informação dos ácidos nucleicos. A vantagem desta técnica é a não necessidade de manipular o patógeno, evitando riscos para a saúde e meio ambiente, além do processamento rápido da vacina.

A Pfizer e BioNTech junto com a Fosun Pharma produzem a vacina BNT162b2, conhecida como Comirnaty. As vacinas Comirnaty (Pfizer e Covishield da Astrazeneca em parceria com a Oxford, envasada no Brasil pela Fiocruz) empregam a vacina de RNA. (WHO, 2021) A Moderna/NIH/CEPI, junto com o Instituto Nacional de Alergia e doenças infecciosas (NIAID) fabrica uma vacina de RNAm. A vacina de RNAm do SARS-CoV-2, desenvolvida pela Moderna, incorpora o RNAm-1273, RNAm-1283, domínio RBD, que codifica a proteína S. (PARK, 2020) CureVac AG/CEPI produz uma vacina de RNAm. A vacina emprega a estratégia do uso de RNAm para expressar partículas que imitam o vírus *in vivo*. (SMITH, 2020).

Há outras empresas envolvidas. Stermirna Therapeutics pode sintetizar RNAm de diferentes comprimentos em função por transcrição *in vitro*. A empresa encapsula o RNAm em nanoestruturas composta de uma mistura de polímeros, encapsulado em uma calota lipídica, LPP. Há a perspectiva de produção de uma vacina para SARS-CoV-2 com tal tecnologia. (Stermirna, 2021) BD Gene Therapeutics também tem uma Plataforma de liberação de RNAm e plataforma de edição de genes. (BDGENE, 2021) Por sua vez, ZY Therapeutics Inc. apresenta inovações na entrega de drogas, através de tecnologia de encapsulamento de proteínas biocompatíveis, no caso nanopartículas de albumina. Esta também apresenta uma plataforma biodegradável de carboidratos poliméricos modificados a base de vitaminas para liberação de droga. (ZYTherapeutics, 2021) Cansino Biologics Inc. apresenta tecnologia de vetor viral não replicante baseada em vetor de adenovírus tipo 5 para produção de vacinas. A empresa emprega a técnica nas vacinas Ad5-nCoV, vacina

TB, PBPV, PCV13 e DTcP. A vacina para covid Ad5-nCoV já foi aprovada na China e outros países. Uma vacina inalada está também em teste pela empresa. (CanSino, 2021)

O RNA pode ser estável, principalmente quando liofilizado. RNA não pode ser exposto a enzimas RNase. Uma molécula de RNAm pode espontaneamente ser incorporada em grande quantidade em muitas células e iniciar a expressão de proteínas em minutos. A captação de RNA será melhor se incorporado por meio de lipídeos ou polímeros. (RHOADS, 2016)

O RNAm sintético não muda o genoma da célula hospedeira. Em geral, o RNAm sintético fora da célula é muito frágil e para preservá-lo é necessário armazenamento a -80°C. (MARKIEWICZ et al, 2021)

O RNA pode ser assim purificado: i) por meio de células após a lise; ii) sintetizado quimicamente a partir de nucleotídeos livres; iii) sintetizado por enzimas usando uma polimerase de RNA para transcrever um modelo de DNA. (RHOADS, 2016)

VACINA DE DNA

A vacina de DNA consiste em uma molécula de DNA plasmídeo que codifica um ou mais antígenos. Elas são superiores as vacinas de RNAm na formulação necessária para estabilidade e eficiência de liberação de proteínas por células. Entretanto, quando o segmento de DNA entra no núcleo da célula do hospedeiro pode trazer risco e mutações no genoma do hospedeiro. (LOWERIE e WHALEN, 2020)

Um tipo de vacina de DNA tem sido desenvolvido pela *Inovio Pharmaceuticals*, INO-4800, para covid-19. (INO-4800, 2021) *Takis Biotech*, subsidiária da *Linea Rx*, também utilizam desta tecnologia. A *Takis Biotech* desenvolve vacina de DNA Linear para Covid-19, com o gene completo da proteína S. O segmento de DNA é produzido usando a tecnologia PCR. (Takis, 2021) Há outras vacinas de DNA para SARS-CoV-2 em progresso, como a nCov, AG0301-COVID19 e GX19N. (WHO, 2021)

VACINAS DE SUBUNIDADES PROTEICAS

Neste caso os imunizantes são proteínas virais injetadas no hospedeiro. As subunidades incorporam antígenos com forte capacidade de imunogenicidade que estimulam eficientemente o sistema imune do hospedeiro. São em geral seguras e viáveis de serem produzidas. Elas incluem coadjuvantes para auxiliar no estímulo do sistema imune. (CUIQING et al, 2014)

As vacinas de subunidades do SARS-CoV-2 utilizam a glicoproteína da espícula S que previne sua interação com o receptor da enzima 2 de conversão de angiotensina (ACE2), como antígeno. A proteína S é responsável pela entrada do vírus na célula e é o principal alvo para anticorpos neutralizantes. As subunidades, em geral, são produzidas via

a expressão em células mamárias geneticamente modificadas.

Novavax Inc. faz uso da tecnologia de subunidades proteicas, incorporando proteínas S recombinantes em nanopartículas com coadjuvante da matriz M. (Novavax, 2020) A empresa *Clover Biopharmaceuticals* Inc, faz uso da proteína recombinante *S-trimer* semelhante a nativa com a tecnologia *trimer-tag*, produzindo a SCB-2019 com coadjuvante AS03 ou CpG1018 mais fosfato de alumínio (Clover, 2020) A Johnson & Johnson, Pasteur Instituto, e *Chongqing Zhifei Biological Products Co.* desenvolvem vacinas de subunidades proteicas semelhantes. A *Anhui Zhifei Longcom Biopharmaceutical* utiliza células CHO modificadas para produção das subunidades proteicas. (WHO, 2021)

VACINAS DE EPÍTOPO OU DE PEPTÍDEOS SINTÉTICOS

Estas vacinas contêm apenas certos fragmentos do antígeno intacto e são usualmente preparadas por síntese química. Epitopo ou determinante antigênico é a menor porção de antígeno com potencial de gerar resposta imune, sendo a parte do antígeno que se liga aos receptores celulares e ou a anticorpos. O baixo peso molecular e complexidade estrutural resulta em baixa imunogenicidade. (Subvaccine, 2015)

O alto contágio do patogênico traz grandes riscos e dificuldades para a pesquisa. As partículas semelhantes ao vírus com estruturas multi proteicas que imitam a organização e conformação das proteínas do vírus, mas sem transportar o genoma viral, são úteis e seguros para estudos dos mecanismos da infecção viral, avaliação de drogas e liberação das drogas. (Subvaccine, 2015)

A Universidade de Ciência e Tecnologia de Hong Kong estabeleceu um grupo de epítopos de células B e T de proteínas S e N do SARS-CoV. Empregam um vetor viral replicante, a *DelINS1-2019-nCoV-RBD-OPT1* que é uma vacina intranasal baseada em RBD. A *Generex Biotechnology* está desenvolvendo uma vacina nesta tecnologia. (Generex, 2021)

Adjuvantes são requeridos para aumentar a resposta do sistema imune em vacinas de vírus atenuado ou vetores de vírus vivos. Os adjuvantes usualmente empregados são fosfato de alumínio. Por sua vez, o MF59 e o MF50 são uma emulsão em água e óleo de Tween 80 (CAS 9005-65-6), trioleato sorbitano, e esqualeno, que criam um ambiente mais apropriado para recebimento da vacina. Outro adjuvante foi desenvolvido pela *Glaxo Sith Kilne (GSK)*, incluem AS01 (lipossoma contendo 3-o-descil-4-monofosforil lipídeo A (MPL) e saponina QS-21), AS02, AS03 e AS04 (adjuvante fosfato de alumínio contendo MPL). O adjuvante é capaz de regular o tipo de resposta imune. Uma combinação de adjuvantes pode ser aplicada para melhorar a resposta imune. (Subvaccine, 2015)

VACINA DE VETOR VIVO REPLICANTE

Estas vacinas utilizam viroses vivas como vetor que expressam antígenos heterogêneos. Elas têm forte imunogenicidade, maior que as vacinas de vetores atenuados. A vantagem de tais vacinas é sua capacidade de simular uma infecção natural da virose. Entretanto, o vírus de transporte tem a possibilidade de manter a replicação viral com atividade baixa por longo período. (GUROFF, 2007)

Houston-based Greffex Inc. construíram um a vacina de vetor adenovírus para SARS-CoV-2. Tonix Pharmaceuticals baseia-se no vírus Horsepox expressando a proteína S (TNX-1800). Por sua vez, a Johnson & Johnson utiliza a plataforma do vetor adenoviral AdVac para desenvolvimento da vacina.

A empresa Aivita Biomedical Inc, produz a vacina AV-COVID-19 usando vetor viral replicante baseado em células dendríticas. A vacina consiste em células dendríticas autólogas carregadas com antígenos do SARS-COV-2, com ou sem coadjuvante GM-CSF. (WHO, 2021) Vetores replicantes como bactérias também podem ser empregadas, como *Salmonella enteritidis* oral (3934Vac) baseada na expressão de proteínas RBD. (WHO, 2021)

VACINAS DE VETOR VIRAL DEFICIENTE EM REPLICAÇÃO (VÍRUS INTEIRO)

As vacinas de vetor são construídas a partir de um vírus de transporte com a função de recipiente como o adenovírus, vaccínia vírus, lentivirus, herpes vírus, ou um vírus da varíola, ambos modificados não replicantes, podem ser empregados para armazenar um gene específico do vírus selvagem de interesse. (GAROFALO et al, 2020)

Após internalizado na célula do hospedeiro, uma resposta imune protetiva no hospedeiro, incluindo células T e anticorpos são gerados. O gene em geral consiste na produção de proteínas com as hemaglutininas (H), ou proteína S da espícula viral, entre outras. Esta tecnologia de vacina já tem sido explorada a mais de 25 anos. (PLOTKIN, 1995)

Assim, as vacinas de vetor viral encapsulam uma sequência de ácidos nucleicos, RNA ou DNA, do vírus selvagem em um segundo vírus modificado. Este vírus modificado pode contaminar células do hospedeiro, mas não se reproduzir por falta das informações genéticas necessárias; entretanto, depositam sua carga genética indutora de produção de proteína específica. Uma imunidade prévia ao adenovírus pode prejudicar a imunização, desta forma é necessário verificar a eficácia da vacina finalizada em uma população específica, perante o subtipo de adenovírus empregado na composição da vacina. (ZHU et al, 2020)

A vacina Covishield ChAdOx1-s-AZ01222 (parceria entre a Universidade de Oxford e AstraZeneca) é uma vacina de vetor viral, utilizando o vetor adenovírus chimpanzé ChAdOx1, deficiente em replicação. Os genes de replicação foram deletados e substituídos

por genes de codificação da proteína S do SARS-CoV-2. Esta vacina está sendo produzida em diversos países, em especial no Instituto indiano Serum, em Pune. (Serum, 2021; Biospace, 2020)

A companhia farmacêutica Janssen da Johnson & Johnson desenvolveu uma vacina recombinante AdVac, a Ad26.CoV.S. O imunizante da Janssen também emprega esta tecnologia, no caso o vetor adenovírus humano não replicante, que causa infecções respiratórias e no trato gastrointestinal, entretanto, quando modificado para a produção de vacina, o vírus é cultivado em cultura celular PER.C6 e não apresenta estes efeitos nocivos. (Coronavirus, 2020)

A vacina Sputnik V COVID-19, desenvolvida pelo Instituto Gamaleya de Pesquisa, e Ministério da Saúde da Rússia, também faz uso de um vetor viral não replicante, o adenovírus recombinante de tipos 26 (Ad26) e 5 (Ad5) contendo um gene cDNA que codifica a proteína completa da espícula S do SARS-CoV-2. O adenovírus Ad26 é usado na primeira dose; enquanto o Ad5 é usado na segunda dose. (Sputnik5, 2021)

VACINAS DE VÍRUS SELVAGENS INATIVADO OU ATENUADAS

Vacinas contra doenças virais e bacterianas tem sido a maior intervenção tecnológica na história médica em favor da saúde coletiva. (MINOR, 2015)

As vacinas atenuadas contêm agentes infecciosos enfraquecidos com virulência reduzida a níveis seguros. Os vírus atenuados são gerados frequentemente em ovos embrionados. O vírus atenuado tem capacidade de replicação lenta no hospedeiro. Este é o clássico método de produção de vacinas nas últimas décadas. As vacinas de vírus da caxumba, poliomielite oral (VOP), rubéola, sarampo, varicela, e da febre amarela, são vacinas de vírus atenuados.

Por sua vez, as vacinas inativas são produzidas a partir da replicação viral e posterior inativação do vírus por radiação, por reações químicas ou por calor, para eliminar sua capacidade de replicação no hospedeiro. Estas empregam agentes totalmente inativados ou partículas destes. (SABBAGHI, 2019)

As vacinas de vírus inativado empregam todas as unidades do vírus como antígeno, incluindo proteínas, lipídeos, polissacarídeos, ácidos nucleicos, presentes na estrutura viral, entre outras. (ZHANG et al, 2020)

A tecnologia de vacinas inativadas ou atenuadas tem grande vantagem pela vasta experiência, conhecimentos científico e técnico já adquiridos, bem como processos de fabricação já instalados. Entretanto, há grande dificuldade no controle de qualidade, e segurança na garantia da eliminação da patogenicidade. (ZANG, et al, 2020)

Alguns exemplos de vacinas inativadas são poliomielite injetável (VIP), hepatite “A”, gripe e raiva. As vacinas inativadas utilizam coadjuvantes para ampliar a resposta imune. Estas vacinas empregam muitas doses. As vacinas da gripe são exemplos destas vacinas

inativadas. (Fiocuz, 2020)

As vacinas Coronavac da Sinovac (Sinovac Research and Development Co. e Grupo Biotec Nacional da China e Instituto de Wuahn, em colaboração com o Instituto Butantan), a BBIPB-CorV inativada SARS-CoV-2 em células Vero (Sinopharm com a Biotech e Beijing Instituto de Produtos Biológicos), e Codagenix, em colaboração com o instituto Serum da Índia, fazem uso desta tecnologia. A Sinovac é uma empresa biofarmacêutica experiente em produção de vacinas, incluindo imunizantes para os vírus hepatite A, hepatite combinada A e B, gripe, H5N1 e H1N1. Codagenix é uma empresa experiente em construção de vacinas de vírus atenuados. (Codagenix, 2021)

MÉTODOS DE PRODUÇÃO DE VACINAS POR INATIVAÇÃO VIRAL

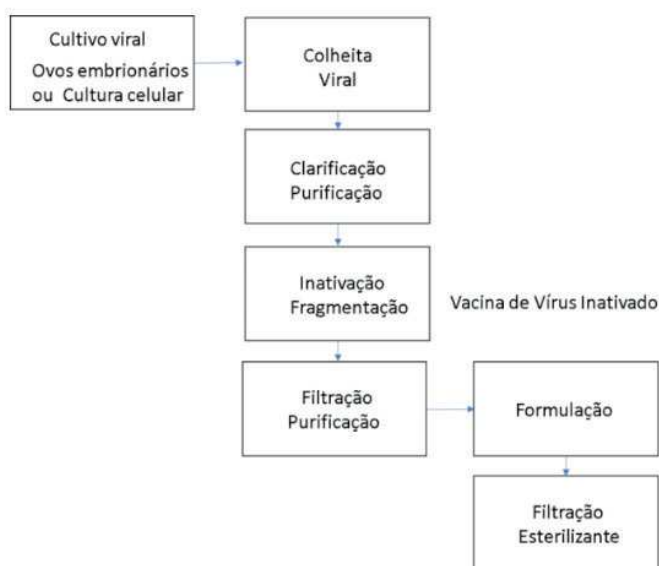


Figura 3 – Organograma de produção de vacinas por inativação viral

Em geral, a produção da vacina por cultura celular, para a técnica de vírus inativado, pode envolver os seguintes procedimentos, conforme apresentado na Figura 2: i) Cultivo viral, incluindo produção dos meios de cultura; crescimento celular, inoculação, propagação e replicação viral; extração do vírus por lise ou brotamento; e colheita viral na suspensão; ii) Filtração e clarificação, incluindo remoção de ácidos nucleicos por digestão; clarificação primária (ultracentrifugação), e secundária (filtragem); e cromatografia por troca iônica aniônica ou exclusão de tamanho; iii) Inativação viral; iv) Ultrafiltração e filtração por diálise (UF/DF); v) Formulação com adjuvantes, estabilizador; vi) Filtração para esterilização.

DESCRIÇÃO DOS PROCESSOS PARA VACINAS DE VÍRUS INATIVADOS

Conceitos em Quantificação Viral, Grandezas e Unidades

Dose infecciosa. O método padrão usado para determinar a concentração de vírus em termos da dose infecciosa é o ensaio baseado em placas de Petri. Os ensaios de placas virais determinam o número de unidades formadoras nas placas (pfu) em uma amostra de volume contendo o vírus, que é uma medida da quantidade de vírus. As placas são geralmente contadas manualmente e o número de colônias, em combinação com o fator de diluição utilizado para preparar a placa, são usados para calcular o número de unidades formadoras de placas por volume de unidade amostral (pfu/mL), sendo este volume em mL ou mL. O resultado pfu/mL representa o número de partículas infecciosas dentro da amostra e baseia-se no pressuposto de que cada placa formada é representativa de uma partícula infecciosa do vírus. (MARTIN, 1978; YAKIMOVICH, 2015)

Título do vírus. A dose infecciosa da cultura tecidual de 50%, dita TCID₅₀, é a medida do titulado do vírus infeccioso. Este ensaio de diluição de ponto final quantifica a quantidade de vírus necessário para matar 50% das células hospedeiras infectadas ou para produzir um efeito citopático, ou cito patogênico característico da infecção viral, em 50% das células de cultura tecidual inoculadas. (BARON, 2014)

Relação TCID e PFU. A relação teórica entre o TCID₅₀ e PFU é 0,69 PFU equivale aproximadamente a 1 TCID₅₀ com base na distribuição de Poisson, uma distribuição de probabilidade que descreve quantos eventos aleatórios (partículas de vírus) existem a uma taxa média conhecida (Título de vírus) que provavelmente ocorrerá em um espaço fixo ou volume (a quantidade de vírus médio em um poço de uma placa de 96 wells, por exemplo). (CANN, 2015)

Conceito FFA. O ensaio de formação de foco, dito FFA, é uma variação do ensaio da placa. Contrário da dependência de lise celular para detectar a formação na placa, a FFA emprega técnicas de imune ensaio usando anticorpos fluorescentes rotulados específicos para um antígeno viral para detectar células hospedeiras infectadas e partículas infecciosas do vírus antes que uma placa real seja formada. A FFA é particularmente interessante para quantificar classes de vírus que não lizem as membranas celulares, pois esses vírus não produziram resultados confiáveis no ensaio da placa. A FFA é expressa em termos de unidades de formação de foco por mililitro, ou FFU/mL. (FLINT et al, 2009)

CULTIVO CELULAR PARA PRODUÇÃO VIRAL

Para produção de uma vacina normalmente há a necessidade de largas quantidades do agente infeccioso. Assim, se faz necessário uma fonte confiável de produção deste patógeno. A fonte usual de produção viral, por exemplo, tem sido embriões de galinha, isto é, ovos fertilizados. Neste caso, há forte contaminação de resíduos no meio, contendo

colágeno e ovoalbumina, além de diversas outras proteínas das células do embrião. (NANDI,2019)

A replicação viral em larga escala também pode ser feita através do cultivo *celular in vitro* (OLIVO, et al, 1996) Algumas tradicionais linhagens já foram empregadas para tal fim, como: células de rim de macaco verde africano (Vero); células do epitélio humano (HEp-2); células do rim de macaco Rhesus (MA-104); linhagens celulares murina contínua; e células estreladas hepáticas (GRX) (GAMARRA et al, 2011)

Além, temos células humanas diploide (MRC-5; WI-38; e FRhI-2); ou células contínuas (NIH-3T3; BHK2, CHO, EBx; Per.C6, MDCK e 293P). Células Vero são as mais comumente usadas. São cultivadas em baixa tensão de Oxigênio e presença de CO₂ 5%. As células GRX são suscetíveis à infecção por Herpes simples tipo 1 e 2 (HSV-1, HSV-2), Sindbis - SIN e vírus da encefalite equina do Oeste – WEE. Apesar de haver várias linhagens para propagação viral *in vitro*, há necessidade ainda de novas linhagens para intensificar a produção de vírus emergentes, mesmo os coronavírus humanos. (ROYOZZO et al, 1973; LELAND e GINOCCHINO, 2007)

As células são cultivadas em solução de meio aquoso, em suspensão. Entretanto é possível manter cultivo de células aderentes em segmentos microscópicos, ou microdispositivos tipo grânulos porosos, ditos micro carregadores (*beads ou microcarries*), postos em suspensão por agitação. Quando cultivadas em *beats* há necessidade de remoção das células com inclusão de tampões e tripsina, que necessita posteriormente serem filtrados. (NANDI, 2019)

Estas células são geralmente cultivadas com soro fetal bovino (5 a 10%) inativado com calor, em meios aquosos ricos com aminoácidos essenciais, complementado com antibióticos e fungicidas, bicarbonato de sódio, e glutamina, entre outros nutrientes e tampões, a temperatura de 37°C em ambiente de CO₂ a 5%. (ASCHNER e COSTA, 2019)

A produção de agentes virais empregando cultura de células traz algumas deficiências, como a necessidade de inclusão de soro fetal bovino, equino ou humano, com diversos fatores de crescimento, citocinas solúveis, e nutrientes adicionais, essenciais para crescimento celular; mas, indesejadas em uma suspensão vacinal. As culturas celulares também precisam frequentemente ser repicadas, alimentadas, necessitando troca de meio e ajustes de temperatura, de acidez e de oxigênio dissolvido do meio. (ATTCguide, 2021)

Entretanto, o crescimento viral em cultura de células se torna atrativo pois permite um fluxo contínuo automatizado de produção do agente infeccioso. Cultura de células aderentes em microdispositivos tipo *beads ou microcarries*, postos em suspensão em biorreator previamente projetados, alimentado continuamente por uma solução livre de soro, tem se tornado referência tecnológica da produção viral. (ZANG et al, 2011)

Um exemplo deste procedimento é o uso de células não tumorigênicas (linhagem *Madian Darby Canine Kidney – MDCK*) para propagação do vírus rSV da influenza. Cultura de células MDCK pode produzir 10⁹ pfu/mL de vírus influenza, 3 a 4 dias após

incubação. Parâmetros como multiplicidade da infecção (MOI), tempo de incubação e temperatura devem ser otimizadas para cada linhagem e cepa viral em condição de cultivo em reatores. Outro exemplo, é o uso do meio de cultura CELLVENTO BHK-200, livre de soro animal, para incubação de FMDV vírus, para eliminar o risco apresentado pela encefalopatia espongiforme bovina (BSE), transmissível pelo agente da encefalopatia espongiforme (TSE), além de evitar a contaminação por microplasma. O meio é formulado sem componentes derivados de produto animal. Este meio de cultura é essencial para propagação de células BHK21 em alta densidade.

Após incubadas com vírus de forma asséptica, o cultivo celular tem crescimento contínuo por 5 a 7 dias. Ocorre a incubação, e o cultivo viral atinge seu máximo a 24 a 72h após. Após infectada pelo vírus, a célula produz o agente infeccioso que sequestra o mecanismo biomolecular celular, internalizando-se na célula. Após vasta replicação intracelular, estes são liberados por lise celular ou brotamento. Quando os vírus levam a célula do hospedeiro a lizar, liberam agente infeccioso no meio de cultura além de resíduos intracelulares e nucleares.

A titulação viral pelo método da diluição limite para quantificar a infectividade viral é medida pela dose infecciosa de cultura celular a 50% da população em 25 mL da suspensão do meio, dita TCID₅₀/25 mL. As titulações são expressas em log₁₀ (TCID₅₀/25 mL). (MARTIN, 1978; YAKIMOVICH, 2015) As linhagens GRX e Vero produzem semelhantes replicações virais. Em geral, a titulação atinge o valor logaritmo de 3 a 6 para a primeira passagem viral em 25 mL de suspensão.

Em geral, TCID₅₀/mL, bem como log₁₀ FFU/mL atende valores cerca de 8,0. As células semeadas em micros carregadores atingem 10 a 40 Células por micro carregador, e são proliferadas no período de 2 a 5 dias. A entrada viral está entre 10 a 100 FFU/mL. É aceitável que após purificação viral o meio pode chegar até 0.1 ng de fragmentos de DNA da célula hospedeira (HCD) e menos que 0,3 mg de proteínas da célula hospedeira (HCP), por 7 log₁₀ FFU do vírus.

Após replicação viral, os fragmentos celulares das células hospedeiras são desprendidos, ocorre a picnose celular, seguido de fragmentação citoplasmática e desprendimento da monocamada, contaminando o meio com proteínas, lipídeos, fragmentos celulares, organelas, e ácidos nucleicos da célula lisada. Pode também haver proteínas do soro fetal bovino, proteínas de ovalbumina, quando cultivado em ovos embrionários, resíduos de DNA da célula hospedeira lisada, entre outros. Todos estes resíduos devem ser separados do agente antigênico em proporções significativas.

Outro aspecto é a produção de proteínas imunogênicas, que não necessariamente sejam o próprio vírus integro, mas proteínas associadas a estrutura do agente patogênico. Por exemplo, a diferença de vírus influenza são baseadas na diferença de duas proteínas estruturais internas, nucleocapsídeo (NP) e proteínas da matriz (M). Os subtipos de vírus influenza são descritos pela variação antigênica de glicoproteínas de superfície,

hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA). HA é uma proteína imunogênica de ~77kDa localizada na superfície do envelope do vírus. A NA, de peso molecular de ~220kDa, é uma proteína enzimática de superfície. Tais subprodutos podem ser tomados como agentes antigênicos.

DIGESTÃO NUCLEICA

A colheita viral deve ser tratada com enzima que quebra as moléculas de DNA para a digestão das cadeias de ácidos nucleicos da célula hospedeira. A digestão de DNA é feita pela endonuclease recombinante modificada, nomeada Benzonase, que degrada o DNA em oligo nucleotídeos, na presença de íons de magnésio. São usados 50 unid./mL com 2mM de MgCl₂ a 32°C por 3 horas. A reação é parada com adição de 5mM de EDTA. (Millipore, 2020)

PROCESSOS DE CLARIFICAÇÃO

A clarificação e purificação são necessárias para remoção dos resíduos das células hospedeiras e produtos químicos indesejados do sobrenadante. Após a colheita viral, a clarificação remove as células íntegras e debris celulares, diminuindo a turbidez do meio. Com o rompimento das células, os produtos intracelulares aumentam a viscosidade e gama de contaminantes. (DAVIS, 2019)

A microfiltração (MF) consiste na operação de uma membrana de 0,1-10mm de diâmetro que pode reter micro-organismos, partículas em suspensão, detritos celulares, células mamárias, fungos e bactérias (DAVIS, 2019). A microfiltração pode deixar passar proteínas e viroses. Pode ser implementado em um fluxo contínuo cruzado em um bioreator, e usado para reter células, ou mesmo para reciclar tais elementos. Esta tecnologia pode ser usada para clarear, removendo células e fragmentos celulares do substrato primário. A maior parte da membrana MF tem tamanho nominal de poros de 0,1-0,2 mm. Ele pode operar na configuração de fluxo cruzado ou fluxo direto. (DAVIS, 2019)

Em geral, há dois processos para a clarificação: primário e secundário. A centrifugação é usada para clarificação primária. A filtração constitui o processo secundário. É possível também incluir um processo intermediário, no caso três processos de filtração: primário (centrifugação), profundo (dialise), e final por filtração por membrana (filtração direta ou cruzada). A filtração por membrana pode ser: direta ou frontal, de passagem simples (DFF), e filtração por fluxo tangencial (TFF) ou dita de fluxo cruzado. (DAVIS, 2019)

Na clarificação em geral há membranas de 1.2 mm e 0,45 mm. Em geral, a união entre os processos de clarificação e a colheita reduz o tempo de processamento. TFF (0.45 e 065 mm) é usado para clarificação primária para vírus da influenza. A taxa típica de produção é 50% com TFF com a clarificação primária. A segunda clarificação é filtração com 0.22 mm ou 0.45 mm. O vírus Influenza e DNA de célula hospedeira possuem carga elétrica

negativa; então, filtros carregados positivamente empregados na filtração produzem alta adsorção de vírus com boa remoção de DNA. Os processos de eluição e filtragem de vírus podem ser monitorados pela absorção de UV em 280 nm. (DAVIS, 2019)

PROCESSOS DE PURIFICAÇÃO

Por sua vez, a purificação separa a substância alvo de outras moléculas com características físico-químicas altamente significativas e semelhantes. A purificação, ou nano filtração, pode envolver vários processos combinados, e muitas vezes ser repetitivos, e incorporados intercalados a diversas fases do desenvolvimento do imunizante. (PEEVA e LIVINSTON, 2019)

Os processos de nano filtração são: a) remoção de soluto (endonuclease) não específico e estabilização da colheita viral; b) alteração de concentração e ou troca de tampão, ou troca de solvente; c) purificação por cromatografia. (CARVALHO et al, 2019)

A troca de tampão em geral é feita por diálise, ultrafiltração e diafiltração (DF). Uma membrana escolhida de acordo com o peso molecular, por exemplo de 500kDa, pode também ser utilizada para troca de concentração e de tampão. (PEEVA e LIVINGSTON, 2019)

Na purificação é interessante reduzir a quantidade de endonuclease residual não específica, a valores de 0.0010 ng por dose de imunizante, de acordo com os limites normativos.

CROMATOGRAFIA

A purificação de alta resolução pode ser feita por cromatografia. Pode-se aplicar cromatografias de troca iônica (densidade de carga na biomolécula), de afinidade (proteína com sítios específicos), de imune afinidade (adsorção antígeno e anticorpo), de interação hidrofóbica (hidrofobicidade), de exclusão molecular (massa molar), e com membrana adsortivas (massa molar). (HOFFMANN et al, 2019)

A cromatografia com membrana é usada para remover impurezas da célula hospedeira e a enzima Benzonase. Sulfato de celulose é uma resina na qual grupos de éster sulfato são imobilizados em celulose. A coluna de sulfato de celulose é uma resina de afinidade que vincula o vírus na coluna, e o vírus vinculado é eluído utilizando um tampão de fosfato-sacarose. Por exemplo, um vírus pode ser purificado a partir do eluído da coluna, pode ser diafiltrado por múltiplos diavolumes de tampão de 200mM de sacarose e 100mM de fosfato de potássio, em pH 7,2, em um cartucho de fibra oca com peso molecular de corte de 500 kDa, para a remoção do tampão de eluição de alta concentração de sal e para formulação do vírus purificado. (HOFFMANN et al, 2019)

Para a filtragem é usual empregar elemento filtrante hidrofílico para soluções aquosas com membrana filtrantes assimétrica e porosa, por exemplo feita de poliéster sulfônica,

interna a um corpo de polipropileno. Tais filtros não podem desprender contaminantes no meio, como fibras ou substâncias químicas. Tais elementos para retenção de partículas de 0,04; 0,1; 0,2; 0,45 ou 0,6 mm; podendo ser expostas a alta temperatura sem ruptura, a agentes oxidantes. (BOI, 2019)

A cromatografia para purificação do vírus inclui a cromatografia de afinidade, a cromatografia de troca iônica (catiônica ou aniônica) e ou cromatografia de hidroxiapatita. em geral, a cromatografia de exclusão de tamanho é seguida de cromatografia de exclusão de ânions. (WICKRAMASIGHE et al, 2019)

FILTROS E MEMBRANAS

As membranas podem ser dependentes do tamanho de poro, como de osmose reversa (< 200 Da), de nano filtração (1-8 nm, ou 200 Da a 15 kDa), de ultrafiltração (5 nm – 0,1 mm, 5 kDa a 300 kDa), e microfiltração (0,05 – 3 mm, 100 kDa a 3000 kDa), separadas pelo peso molecular. As membranas definem um peso molecular nominal ou de corte normal (NMWCO). Os filtros podem ser de folhas, placa ou fibras ocas, feitos de celulose regenerada, poliéster sulfonas, com hidrofobicidade alterada, fluoreto de polivinilideno (PVDF), ou agregados de óxidos de cerâmica e metal, policarbonato, polipropileno, polietileno e PTEE (Teflon). As membranas têm que ser projetadas em tamanho suficiente para reter os fragmentos celulares e deixar passar o vírus. (BOI, 2019)

PURIFICAÇÃO VIRAL

Como exemplo, em processos de produção viral, a colheita viral tratada com Benzonase pode ser clarificada por filtros de cápsulas de 1,2mm de polipropileno (PP) e 0,45 mm de PVDF. A segunda etapa envolve ultrafiltração e diafiltração com um tampão de sucrose- fosfato, em múltiplas passagens. A segunda etapa pode ser feita em um cartucho de fibra oca com um peso molecular de corte de 500 kDa. As partículas virais são retidas no lado do retentado, enquanto as proteínas, resíduos de DNA das células hospedeiras e Benzonase são diafiltrados para o lado permeável da fibra oca.

INATIVAÇÃO DO PATÓGENO

Formaldeído. A substância química Formaldeído é usualmente empregado para inativação de agentes patogênicos na vacina. Esta substância inativa vírus pela irreversível ligação cruzada em grupos aminas na superfície das proteínas dos vírus. Em geral é necessário exposição de 24 h a 32°C para efetiva inativação. Uma alternativa para inativação é por radiação UV. (SABBAGHI, 2019)

Radiação ultravioleta (UV). É possível a Inativação viral de UV radiação em comprimento de onda de 254 nm. A dose geral de UV é 5-200mJ/cm². Radiação UV pode interferir com a membrana lipídica viral e iniciar modificações estruturais nas proteínas

internas e efetuar ligações cruzadas covalentes entre o RNA viral e as proteínas nucleares. (SABBAGHI, 2019)

Radiação Gama. Este é um tipo de radiação eletromagnética de alta energia e baixa taxa de dose, penetrante no meio, comumente empregada para esterilização de vírus influenza. É um método rápido e efetivo, mas há efeitos na estrutura do vírus limitando sua aplicabilidade. Em geral quando aplicada em altas energias possibilita a ejeção de elétrons das moléculas, que pode levar a quebra de ligações covalentes. Diferente da radiação UV, a radiação gama tem alta penetração e pode irradiar grandes volumes do meio contendo o vírus. O genoma do vírus é mais susceptível ao dano estrutural pela radiação gama, comparada com as proteínas do vírus. Em solução aquosa, os radicais livres de espécies reativas de oxigênio (ROS) são os principais agentes de degradação viral. Particularmente, a alteração dos epítopos de superfície, por carbonilação das proteínas virais, resultam principalmente na redução da antigenicidade viral e eficiência da vacina. (SABBAGHI, 2019)

Radiação de elétrons de baixa energia. A radiação por elétrons de baixa energia (REBE), ~ 500keV, com perfil de alta taxa de dose, distribuída homoganeamente, pode ser empregada para esterilização viral. Tal processo não produz compostos tóxicos em solução aquosa, que sobrevivem a longa duração. Filmes finos líquidos contendo o patógeno em suspensão são expostos a radiação de baixa penetração. O processo REBE pode ser benéfico porque esteriliza mantendo a integridade da maioria das estruturas antigênicas virais, produzindo vacinas mais efetivas. (SABBAGHI, 2019)

ULTRAFILTRAGEM E DIAFILTRAGEM (UF/DF)

UF/DF é usado para concentração do vírus, remover impurezas de baixo peso molecular e troca de soluções tampões. UF/DF é implementado para remover DNA, proteínas das células hospedeiras e o composto Benzonase endonuclease. Além, após a etapa de ultracentrifugação para fracionamento, é usado para remover sucrose. (GOODRICH, 2020)

Múltiplos passes em diafiltração, de forma cíclica, pode remover a componente que é permeável à partícula alvo, isto é, de tamanho e peso molecular inferior a partícula viral, por exemplo. (KULOZIK, 2019) O primeiro ciclo usa uma filtração por membrana 0,1mm, e o segundo ciclo ultra filtração com membrana de MW de 10kDa. O filtrado no segundo ciclo alimentar o primeiro ciclo. Assim, no segundo ciclo concentram-se as partículas com tamanho inferior a 0.1 mm e peso molecular superior a 10kDa. O filtrado com soluto inferior a partícula alvo retorna ao primeiro ciclo. (KULOZIK, 2019)

CENTRIFUGAÇÃO DE GRADIENTE DE DENSIDADE OU CENTRIFUGAÇÃO ZONAL

Centrifugação zonal ou cromatografia é comumente usados para aumentar a pureza do vírus. A centrifugação zonal tem dois níveis: pelotização e funcionamento. Após 17k rpm em 25% de sucrose, o precipitado (pellet) é suspenso e centrifugado a 25K rpm em sucrose, criando uma banda de vírus concentrado. No primeiro estágio 99.9% dos resíduos e 75% de DNA são retirados. No segundo estágio os resíduos e DNA podem ficar abaixo dos limites de detecção. (WICKRAMASIGHE et al, 2019)

FILTRAGEM PARA ESTERILIZAÇÃO

No processo de esterilização, os filtros de 0.45 mm são empregados como pré-filtragem, e posterior 0.22 mm para filtragem de micro-organismos, com filtração direta com fluxo frontal. Esta etapa elimina patógenos maiores que o vírus, como bactérias e fungos. (SHOAE BARGH et al, 2018)

FORMULAÇÃO DOS IMUNIZANTES

As formulações de vacinas de vírus intactos podem incluir tampões (tampões fosfato, 10-150 mM fosfato de potássio e 80-150 mM de histidina, sacarose 5-10%), aminoácidos (ex, glutamato ou ácido glutâmico, em 0.01-0.1%, e arginina (1-5%)), hidrolisados de proteínas (ex, colágeno, 1-4% hidrolisado de gelatina, como porcina, gelatina aviária), agentes quelantes (ex, EDTA) e preservantes (conservantes, como géis minerais, saponina, hidróxido de alumínio, substâncias de superfície ativa, como lisolectina, peptídeos, emulsões de óleo ou hidrocarbonetos, e adjuvantes sintéticos). Os tampões podem conter 200 mM de sacarose e fosfato ou histidina de pH 7-7.4. (BATTY et al, 2021)

Entre as funções das formulações está a preservação de partículas virais intactas em solução líquida por um período de armazenamento adequado para uma temporada de imunização, quando refrigerados de 2 a 8°C, com perda de potencial aceitável no período de armazenamento. Os adjuvantes aumentam a resposta imune. (BATTY et al, 2021)

O produto pode ser seco por pulverizador, onde um spray de gotículas é passado por uma corrente de gás aquecido a seco, formando pó seco. Este método pode expandir o tempo de armazenamento da formulação. O imunizante pode ser reconstituído com água estéril, solução salina aquosa, soluções salinas tamponadas, entre outras combinações.

IMUNIZAÇÃO

A composição imunogênica formulada de vacina pode ser aplicada por vias intranasal, oral, pulmonar, intradérmica, intraperitoneal, parenteral (intramuscular, intravenosa e subcutânea). Pode ser administrada seguindo uma via natural da entrada do vírus.

Uma dose para uma composição imunogênica pode variar de 125 a 200 FFU. É comum que a resposta imunogênica adquirida melhor aconteça com múltiplas doses, de 1 a 6 doses de aplicação, em intervalos que vão de 1 a 6 meses. (CANN, 2015)

A composição imunogênica após administrada a um sujeito não infectado pode estimular o sistema imune a criar memória imunológica (linfócitos T *helper*) e aumentar a rapidez e eficácia da resposta imune a uma contaminação com o vírus natural. (ABBAS, 2007) Assim a vacina reduz a duração e a severidade de um ou mais sintomas associados à infecção pelo vírus, quando infectado, sempre comparado ao sujeito não tratado. Em certas circunstâncias, pode também aumentar a sobrevivência de sujeitos tratados, em relação aos não imunizados. Entretanto, a vacina não produz uma proteção completa ao indivíduo. Mesmo vacinado, o sujeito pode ser contaminado pelo vírus e produzir alguns sintomas da doença, mas os efeitos da doença serão atenuados. Ou seja, a vacina melhora a resposta à infecção e atenua os efeitos deletérios clínicos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A Organização Mundial de Saúde (OMS) fornece uma lista de vacinas em desenvolvimento para COVID-19. São 184 empresas desenvolvendo vacinas de COVID-19 com estudos pré-clínicos em progresso. Há 91 empresas com desenvolvimento clínico finalizado. As plataformas empregadas são: subunidades proteicas (30%); vetor viral não replicante (15%); DNA (11%); vírus inativado (13%); RNA (13%); vetor viral replicante (%); partículas semelhantes a vírus (5%); vetor viral replicante mais célula apresentadora de antígeno (2%); vírus atenuado ativo (2%); vetor viral não replicante mais célula apresentadora de antígeno (1%). (WHO, 2020)

As vacinas podem não responder como previstas devido a mutações do vírus. No SARS-CoV-2 foram reportados 149 sítios de mutações no genoma de 103 cepas sequenciadas do SARS-CoV-2, e o vírus contém dois subtipos, denominado subtipos L e S. Estes subtipos mostram grande diferença na distribuição geográfica, habilidade de transmissão e severidade da doença. (WHO, 2020)

A pandemia da COVID-19 tem mostrado a importância da ciência, do estudo científico em ciências básicas e aplicada, e da capacidade de incentivar empresas startups de alta tecnologia em bioengenharia, engenharia genética, e na indústria de vacinas.

REFERÊNCIAS

ABBAS, Abul K. Cellular and molecular immunology, 6.º edição, ISBN:978-0-8089-2358-9, Elsevier Inc., 2007.

ASCHNER, Michael; COSTA, Lucio. Cell Culture Techniques, 2.º edição, Humana Press, DOI: 10.1007/989-4939-9228-7.

ATCCguide, ATCC® VIROLOGY GUIDETips and techniques for propagating virus in tn. culture and embryonated chicken eggs, Disponível em: https://www.atcc.org/~media/PDFs/Culture%20Guides/Virology_Guide.ashx, Acesso em: abr.2021.

BARON, Samuel. Medical Microbiology (4.º ed.). TX: University of Texas Medical Branch at Galveston. 1996. Acesso em: 19 Nov. 2014.

BATTY, Cole J.; Mark T HEISE, Eric M BACHELDER, Kristy M AINSLIE. Vaccine formulations in clinical development for the prevention of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 **infection Adv Drug Deliv Rev**; V.169, p.168-189. Fev. 2021. DOI: 10.1016/j.addr.2020.12.006. Epub 2020 Dec 13.

BDGENE, Disponível em: <https://bdgenetherapeutics.com/2020>, Acesso em: abr.2021.

BioSpace. Codagenix and Serum Institute of India Initiate Co-Development of a Scalable, Live-Attenuated Vaccine Against the 2019 Novel Coronavirus, COVID-19, 2020. Disponível em: <https://www.biospace.com/article/releases/codagenix-and-serum-institute-of-india-initiate-co-development-of-a-scalable-live-attenuated-vaccine-against-the-2019-novel-coronavirus-covid-19/>. Acesso em: 2/13/2020.

BOI, C.. Membrane Chromatography for Biomolecule Purification, **Current Trends and Future Developments on (Bio-) Membranes**, Elsevier Inc. p. 151-166, 2019.

CANN, Alan J.. Principles of Molecular Virology (6.º Edição) – eBook, 297 pgs, Publisher: Academic Press; 6.º edição; Mar. 6, 2015 ISBN-10: 0128019468, ISBN-13: 9780128019467.

CanSino, CanSino Biologics, Disponível em: <http://www.cansinotech.com/>, Acesso em: abr.2021.

CARVALHO, Sofia B.; SILVA, Ricardo J.S.; MOREIRA, Ana Sofia; CUNHA, Bárbara; CLEMENTE, João J.; ALVES, Paula M.; CARRONDO, Manuel J.T.; XENOPOULOS, Alex; PEIXOTO, Cristina. Efficient filtration strategies for the clarification of influenza virus-like particles derived from insect cells, **Separation and Purification Technology**, V. 218, 1 Jul. 2019, P. 81-88. 2019. Doi: 10.1016/j.seppur.2019.02.040

CDC, Centre of Disease and Prevention, Disponível em: Disponível em: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/vaccines/different-vaccines/RNAm.html>, Acesso em: 27 abr.2021.

Clover, Clover Biopharmaceuticals. Clover initiates development of recombinant subunit-trimer vaccine for Wuhan coronavirus (2019-nCoV). 2020.

Codagenix, Disponível em: <https://codagenix.com/>, Acesso em: abr.2021.

COLEMAN, Christopher M.; LIU, Ye V; UM, Haiyan; TAYLOR, Justin K.; MASSARE, Michael; FLYER, David C.; GLENN, Gregory M.; SMITH, Gale E.; FRIEMAN, Matthew B.. Purified coronavirus spike protein nanoparticles induce coronavirus neutralizing antibodies in mice. **Vaccines**, V. 32, N. 26, P. 3169-3174. 30 Maio 2014. DOI: 10.1016/j.vaccine.2014.04.016

COLLISSON, E.W.; PEI, J.; DZIELAWA, J.; SEO, S.H. Cytotoxic T lymphocytes are critical in the control of infectious bronchitis virus in poultry. **Dev. Comp. Immunol.**, V.24, p.187-200, 2000.

Coronavirus, Coronavirus Novel, disponível em: Coronavirus.@jnjnews. 2020. <https://www.jnj.com/coronavirus>, acessado 10 fev de 2021.

CUIQING, Ma et al. Searching for an ideal vaccine candidate among different MERS coronavirus receptor-binding fragments—The importance of immunofocusing in subunit vaccine design. **Vaccine**, 2014 v.32, n.º46, p. 6170-6176 ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/j.vaccine.2014.08.086

DAVIS, Robert H., Microfiltration in Pharmaceuticals and Biotechnology, Available online 11 January. In **Current Trends and Future Developments on (Bio-) Membranes**, p. 29, 2019,

Fiocruz. Vacinas Virais. Disponível em: <https://www.bio.fiocruz.br/index.php/br/perguntas-frequentes/perguntas-frequentes-vacinas-menu-topo/131-plataformas/1574-vacinas-virais#:~:text=As%20vacinas%20virais%20podem%20ser,mortos%20ou%20apenas%20part%C3%ADculas%20deles>, Acessado em: 04 de abr. 2021.

FLINT, S.J.; ENQUIST, W.; RACANIELLO, V.R.; SKALKA, A.M. “Virological Methods”. **Principles of Virology**. 2009. ASM Press. ISBN 978-1-55581-443-4.

GAMARRA, M.L.; ALBURQUERQUE, M.C.M; TEODORO, A.J.; MARTUCCI, R. B.; BROJEVIC, R.; CAMARA, F.P.; ROMANOS, M..V.; SANTOS, N., Suscetibilidade de uma linhagem celular murina contínua (GRX) à infecção viral, Ver. **Pan.Amaz. Saude**, V.2, n.2, p. 65-69, 2011.

GAROFALO, Mariangela; STANISZEWSKA, Monika; SALMASO, Stefano; CALICETI, Paolo. Prospects of Replication-Deficient Adenovirus Based Vaccine Development against SARS-CoV-2, **Vaccines** V.8, Jun., n.2, 2020. DOI:10.3390/vaccines8020293Generex, Disponível em: <https://generex.com/subsidiaries>, Acesso em: abr.2021.

GOODRICH, Elizabeth M; BOHONAK, David Mm.; GENEST, Paul W.; PETERSON, Emily. Recent Advances in ultrafiltration and virus filtration for production of antibodies and related biotherapeutics, Cap. 7, p.137-166, Jan. 2020. DOI:10.1016/B978-0-08-103019-6.00007-2 In book: **Approaches to the Purification, Analysis and Characterization of Antibody-Based Therapeutics**

GUROFF, Marjorie Robert. Replicating and non-replicating viral vectors for vaccine development **Curr Opin Biotechnol**. 2007 Dec; V.18, n.6, p.546–556. Publicado online: 11 dez. 2007. DOI: 10.1016/j.cobio.2007.10.010

HAJJ, KA; WHITEHEAD KA (12 September 2017). “Tools for translation: non-viral materials for therapeutic RNAm delivery”. **Nature Reviews Materials**. V.2, n.10, p.17056. Bibcode:2017NatRM...217056H. doi:10.1038/natrevmats.2017.56

HAMES, David; HOOPER, Nigel. Biochemistry. Third ed. Taylor & Francis Group: New York. 2005.

HOFFMANN, D.; LEBER, J.; LOEWE, D.; LOTHERT, K.; OPPERMANN, T.; ZITZMANN, J.; WEIDNER, T.; SALZIG, D.; WOLFF, M.; CZERMAK, P.. Purification of New Biologicals Using Membrane-Based Processes, **Current Trends and Future Developments on (Bio-) Membranes**, DOI: 10.1016/B978-0-12-813606-5.00005-1, Elsevier Inc. p. 123-150, 2019.

HU, Ben; GUO, Hua; ZHOU, Peng; SHI, Zheng-Li. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19, **Nature Reviews Microbiology**. V. 19, p.141–154(2021), Publicado: 06 Out. 2020.

INO-4800, Disponível em: <https://www.inovio.com/our-focus-serving-patients/infectious-diseases/>, Acesso em: abr.2021.

KRAMPS, Thomas; ELBERS, Knut (eds.), *Methods in Molecular Biology* 1499, - RNA Vaccines_ Methods and Protocols-Humana Press, 2017.

KULOZIK, Ulrich. Ultra- and Microfiltration in Dairy Technology, **Current Trends and Future Developments on (Bio-) Membranes**, Elsevier Inc. p. 1-28. 2019

LELAND, D.; GINOCCHINO, C.. Role of Cell Culture for Virus Detection in the Age of Technology. **Clin Microbiol Rev.** V.20, p.49-78, 2007.

LIU, J.; SUN, Y.; QI, J.; CHU, F.; WU, H.; GAO, F.; LI, T.; YAN, J.; GAO, G.F. The membrane protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus acts as a dominant immunogen revealed by a clustering region of novel functionally and structurally defined cytotoxic T-lymphocyte epitopes. **J. Infect. Dis.** V. 202, p. 1171-1180, 2010.

LOWERIE Douglas B., WHALEN, Robert G.(Ed.), DNA vaccines, Methods and Protocols,, **Methods in molecular medicine**, 2000

MARKIEWICZ, Lukasz; DRAZKOWSKA, Karolina; SIKORSKI, Pawel J.. Tricks and threats of RNA viruses – towards understanding the fate of viral RNA, **RNA Biology.** V. 18, 2021 - N. 5: Special N.: **RNA in immunity, infection and immune diseases**, p.669-687, Publicado online: 22 Fev. 2021, DOI:10.1080/15476286.2021.1875680

MARTIN, S.J.. *The Biochemistry of Viruses.* Cambridge University Press. ISBN 0-12-402033-X. 1978.

MCBRIDGE, R.; VAN ZYL, M.; FIELDING, B.C. The coronavirus nucleocapsid is a multifunctional protein. **Viruses**, V. 6, p. 2991-3018. 2014.

MIDOUX, Patrick; PICHON, Chantal. RNA Vaccines – Review, Lipid-based RNAm vaccine delivery systems. p.221-234. Publicado online: 26 Dez. 2014. Doi: 10.1586/14760584.2015.986104

Millipore, Disponível em: [benzonase-endonuclease-solution-br2754en-ms.pdf](#), 2020. Acesso em: abr.2021

MINOR, P.D., Live attenuated vaccines: Historical successes and current challenges. **Virology**, p.479-480, 379-392, 2015.

NANDI, S.. *Animal Cell Culture and Virology*, Publisher: New India Publishing, ISBN: 9789380235059, 176 pgs, 2019.

NEUMAN, B.W.; KISS, G.; KUNDING, A.H.; BHELLA, D.; BAKSH, M.F.; Connelly, s.; Droese, B.; Klaus, J.P.; Makno, S.; Sawicki, S.G.; et al. A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology. **J. Struct. Biol.** V.174, p.11-22, 2011.

NIETO-TORRES, J.L.; DEDIEGO, M.L.; VERDIA-BAGUENA, C.; JIMENEZ-GUARDENO, J.M.; REGLA-NAVA, J.A.; FERNANDES-DELGADO, R.; CASTANO-RODRIGUEZ, c.; ALCARAZ, A.; TORRES, J.; AGUILELLA, V.M.; et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein ion channel activity promotes virus fitness and pathogeniss, **PLoS Pathog.** 2014, 10, e1004077.

Novavax, Pharmaceutical Technology N. Coronavirus: Vir Biotechnology and Novavax announce vaccine plans. 2020. Disponível em: <https://www.pharmaceutical-technology.com/news/coronavirus-vir-biotechnology-novavax-vaccine/>. Acesso em: 28 Feb 2020.

OLIVO, PD. Transgenic cell lines for detection of animal viroses. **Clin Microbiol** Ver; V. 9, n.3, p.321-34. Jul. 1996.

PARK, A. Inside the Company That's Hot-wiring Vaccine Research in the Race to Combat the Coronavirus. **Time**. 2020. Disponível em: <https://time.com/5775784/coronavirus-vaccine-research/>. Acesso em: 28 Fev. 2020.

PEEVA, L.; LIVINGSTON, A.. Nanofiltration in the Pharmaceutical and Biopharmaceutical Technology. **Current Trends and Future Developments on (Bio-) Membranes**, Elsevier Inc. p. 97-121, 2019.

PLOTKIN, S.A., CADOZ, M., MEIGNIER, B., MÉRIC, C., LEROY, O., EXCLER, J.L., TARTAGLIA, J., PAOLETTI, E., GONCZOL, E., CHAPPUIS, G., The safety and use of canarypox vectored vaccines (Article), **Developments in biological standardization**. V. 84, P. 165-170, 1995. RNA Vaccines, Methods in Molecular Biology, Springer Protocols, Thomas KRAMPS, Knut ELBERS, Editores. 2017, DOI: 10.1007/978-1-4939-6481-9

RHOADS, Robert E. Synthetic RNAm: Production, Introduction into Cells, and Physiological, **Methods Mol Biol**; V.1428: p.3-27. 2016 DOI: 10.1007/978-1-4939-3625-0_1. PMID: 27236789 DOI: 10.1007/978-1-4939-3625-0_1

ROVOZZO, G.; BURKE, C. A.. Manual of Basic Virological Techniques (Prentice-Hall, 1973).

SABBAGHI, Ailar; MIRI, Seyed Mohammad; KESHAVARZ, Mohsen; ZARGAR, Mohsen; GHAEMI, Amir. Inactivation methods for whole influenza vaccine production. **Reviews in Medical Virology**. V. 29, N. 6 e2074 REVIEW, publicado: 23 Jul. 2019, DOI: 10.1002/rmv.2074.

Serum, <https://www.seruminstitute.com/>, acessado: 01 maio 2021.

SHOAEBARGH, Shabnam; GOUGH, Ian; MEDINA, Maria Fe; SMITH, Adam; HEIJDEN, Joris van der; LICHTY, Brian D.; BELL, John C.; LATULIPPE, David R.. Sterile filtration of oncolytic viruses: An analysis of effects of membrane morphology on fouling and product recovery, **Journal of Membrane Science**. V. 548, P. 239-246 15 Fev. 2018. DOI: 10.1016/j.memsci.2017.11.022

SMITH J.. CureVac bids to develop first RNAm coronavirus vaccine. Disponível em: <https://www.labiotech.eu/medical/curevac-coronavirus-outbreak-cepi/>. Acesso em: 28 Feb 2020.

Sputnik5, How Sputnik V works, Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, 11 January 2021, acessado: 18 Mar. 2021

Stemirna, Disponível em: <http://www.stemirna.com/en/index.aspx>, 2020, Acesso em: abr.2021.

Subvaccine, Subunit Vaccine Delivery, Springer, ISBN 978-1-4939-1416-6, Doi 10.1007/978-1-4939-1417-3, Foged C. Rades T., Perrie Y., Hook S. Editors, 2015.

Takis, disponível em: <https://www.pharmaceutical-technology.com/news/applied-dna-takis-covid-19-vaccine/>, Acesso em: abr.2021.

WHO, 20.04.2021 Novel Corona vírus.xls, summary Information on Vaccine Products in Clinical Development, Disponível em: <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>, Acesso em:: abr.2021.

WICKRAMASIGHE, S.R.; NAMILA, Rong Fan; XIANGHONG Qian. Virus Removal and Virus Purification, Current Trends and Future Developments on (Bio-) Membranes, Elsevier Inc. DOI: 10.1016/B978-0-12-813606-5.00003-8, p. 69-96, 2019.

WRAPP, Daniel; WANG, Nianshuang; CORBETT, Kizzmekia S; GOLDSMITH, Jory A; HSIEH, Ching-Lin; ABIONA, Olubukola; GRAHAM, Barney S; MCLELLAN, Jason S. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. **Science**. V.367, n.6483, p.1260-1263. Mar. 2020. DOI: 10.1126/science.abb2507. Epub 2020 Feb 19.

XU, Hao; ZHONG, Liang; DENG, Jiaxin; PENG, Jiakuan; DAN, Hongxia; ZENG, Xin; LI, Taiwan; CHEN, Qianming. High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa, **International Journal of Oral Science**, V. 12, Article. n. 8, 2020. Publicado: 24 Fev. 2020

YAKIMOVICH, Artur; ANDRIASYAN, Vardan; WITTE, Robert; WANG, I.-Hsuan; PRASAD, Vibhu; SUOMALAINEN, Maarit; GREBER, Urs F. (2015-09-28). Plaque2.0—A High-Throughput Analysis Framework to Score Virus-Cell Transmission and Clonal Cell Expansion. **PLOS ONE**. 10 (9): e0138760. Bibcode:2015PLoSO..1038760Y. DOI:10.1371/journal.pone.0138760. ISSN 1932-6203. PMC 4587671. PMID 26413745.

ZANG, X.; WEN, Y.; YANG, S.T.. Modes of Culture/Animal Cells, Reference Module in Life Sciences

ZHANG J.; ZENG H.; GU J.; LI H.; ZHENG L; ZOU Q.. Progress and Prospects on Vaccine Development against SSARS-CoV-2, **Vaccines**, 2020, 8, 153; DOI: 10.3390/vaccines8020153.

ZHU, Feng-Cai; LI, Yu-Hua; GUAN, Xu-Hua; HOU, Li-Hua; WANG, Wen-Juan; L, Jing-Xin I; WU, Shi-Po; WANG, Bu-Sen WANG.; Zhao; WANG.; Lei; et al. Safety, tolerability, and immunogenicity of a recombinant adenovirus type-5 vectored COVID-19 vaccine: a dose-escalation, open-label, non-randomised, first-in-human trial. Articles. Disponível em: www.thelancet.com, **TheLancet**, V. 395 Jun. 13, 20201845, 2020.

ZY Therapeutics, Inc., Disponível em: <https://www.zyinc.com/znap>, Acesso em: abr.2021.