

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO E SAÚDE  
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

**VITÓRIA FRANÇA DOS SANTOS PESSOA**

**ANÁLISE DO EMPREGO DA BIOTECNOLOGIA NO  
DESENVOLVIMENTO DE VACINAS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado em forma de artigo como requisito do Curso de Biomedicina do Centro Universitário de Brasília (CEUB), sob orientação da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Kelly Cristina Rodrigues Simi.

## **Agradecimentos**

Gostaria de expressar minha enorme gratidão aos meus pais, Eustáquio Júnior e Virgínia, e aos meus avós, Eustáquio e Maria Inês, por sempre investirem em mim e na minha educação, por acreditarem no meu potencial e por ajudarem na formação da pessoa que sou hoje.

À minha família, principalmente à minha irmã, Verônica, por ter ajudado com palavras de incentivo e carinho nos momentos nos quais o desânimo se fazia presente.

Ao meu namorado, Gabriel Vinícius, pelo apoio e paciência de sempre, sem sua ajuda eu não teria imagens tão bem feitas no trabalho e não chegaria até aqui de forma tão segura.

À minha orientadora, professora Kelly Simi, por ter acreditado no meu tema e me auxiliado de forma incrível até o final.

A todos os professores do curso de Biomedicina do CEUB que por meio dos seus ensinamentos permitiram que eu pudesse ter embasamento e conhecimento para está concluindo esse trabalho.

Por fim, agradeço a todos que indiretamente, através dos questionamentos e dúvidas que sempre vinham tirar comigo, contribuíram para que eu despertasse meu interesse na área e quisesse me aprofundar sempre mais no tema, o meu muito obrigada.

## **Análise do emprego da biotecnologia no desenvolvimento de vacinas**

Vitória França dos Santos Pessoa<sup>1</sup>

Kelly Cristina Rodrigues Simi<sup>2</sup>

### **Resumo**

Os programas mundiais vacinais reduziram significativamente o número de mortes causadas por agentes infecciosos. Desde o primeiro uso das vacinas até hoje, o conhecimento sobre imunologia aumentou substancialmente. Esse conhecimento, combinado com a introdução da cultura de células e tecnologias de DNA recombinante, revolucionou a construção de imunizantes. O objetivo consiste em uma análise do uso da biotecnologia no desenvolvimento de vacinas, bem como na explanação das principais técnicas e avaliação de sua eficácia. Trata-se de um estudo de revisão narrativa da literatura que consultou PubMed e Scielo como bases científicas e utilizou filtros como “biotecnologia” e “vacinas” para a seleção dos artigos. Conclui-se que de fato, as pesquisas de novos tipos de vacinas virais combinadas com os rigorosos requisitos de segurança são essenciais para a contenção de pandemias e a busca de tratamentos para doenças que ainda não possuem cura.

**Palavras-Chave:** Vacinas virais; DNA recombinante; SARS-CoV-2; Ácidos nucleicos, *virus-like particles*.

### **Analysis of the use of biotechnology in vaccine development and design**

### **Abstract**

Worldwide vaccine programs have significantly reduced the number of deaths caused by infectious agents. From the first use of vaccines to today, knowledge about immunology has increased substantially. This knowledge, combined with the introduction of cell culture and recombinant DNA technologies, has revolutionized the construction of immunizers. The aim is an analysis of the use of biotechnology in vaccine development, as well as an explanation of the main techniques and evaluation of their effectiveness. This is a study of narrative literature review that consulted PubMed and Scielo as scientific databases and used filters such as "biotechnology" and "vaccines" for the selection of articles. We conclude that, in fact, research into new types of viral vaccines combined with rigorous safety requirements are essential for the containment of pandemics and the search for treatments for diseases that still have no cure.

**Keywords:** Viral vaccines; recombinant DNA; SARS-CoV-2; nucleic acids, virus-like particles.

---

<sup>1</sup> Acadêmica de Biomedicina do CEUB; vitoria.pessoa@sempreceub.com

<sup>2</sup> Professora de imunologia básica e clínica do curso de Biomedicina do CEUB; kelly.simi@ceub.edu.br

## 1. Introdução

Olhando para os últimos avanços da medicina de prevenção e tratamento de doenças, a vacinação é a maior descoberta da medicina moderna. A partir do momento que a vacina do sarampo foi introduzida em 1968, as evidências sugerem que a imunização salvou mais vidas em todo o mundo do que qualquer outro produto ou procedimento médico (ANDERSON, 2016). Além disso, no século XX, as doenças como poliomielite, sarampo, caxumba e rubéola, por exemplo, causaram 39 milhões de infecções apenas nos Estados Unidos da América (NABEL, 2013). Dentro dessa realidade, as vacinas tornaram essas infecções incomuns no século XXI. Com os avanços no desenvolvimento vacinal, atualmente, as vacinas reduziram as taxas de mortalidade por doenças infecciosas no mundo todo, sendo aproximadamente 3 milhões de pessoas por ano (EHRETH, 2003; RODRIGUES *et al.*, 2015).

O primeiro sistema de proteção usado para imunizar humanos ficou conhecido como variolização, que se popularizou na Europa por meio do trabalho do médico britânico Edward Jenner em 1796. Para a proteção, Jenner introduziu o vírus vivo da varíola bovina para inocular em humanos e protegê-los, após observar que fazendeiros que conviviam com bovídeos não se infectaram com a varíola bovina, procedimento que o médico deu o nome de *Vaccine* (MCCOLLUM *et al.*, 2014; RIEDEL, 2017).

Somente no século XX, especificamente na década de 30, que a forma que as vacinas eram produzidas foi revolucionada. A introdução de culturas de células de animais permitiu a propagação *in vitro* de vírus e abriu caminho para desenvolver diversos tipos de vacinas. A técnica de inativação ou atenuação viral se tornou a prática padrão e a forma mais utilizada para desenvolvimento de novas vacinas nesse século, no qual foi marcado pelo maior estudo clínico já realizados para testes vacinais, em que 1.8 milhões de participantes ajudaram a testar a eficácia da vacina inativada para a poliomielite que levava o nome de Salk, em homenagem ao seu criador: Jonas Salk (PLOTKIN, 2005; TAVARES, 2015).

Apesar de todo avanço presente, as vacinas ainda se mostraram muito reativas, e em alguns casos, pouco ou sem nenhuma eficiência. Então, a pesquisa vacinal moveu-se para empregar frações cada vez menores desses patógenos, visando aumentar a segurança sem comprometer a eficácia. Assim, os grupos ou gerações vacinais foram classificados em razão das suas estratégias ou dos conceitos que foram utilizados na preparação do seu princípio ativo, os antígenos virais (DINIZ; FERREIRA, 2010).

As vacinas de primeira geração ou tradicionais, empregam em sua composição o agente patogênico completo, porém, submetido a tratamentos que vão inativá-lo ou atenuá-lo. Ainda nessa categoria, se destacam o uso de microrganismos não patogênicos oriundos de outros hospedeiros para serem utilizados como antígenos vacinais no controle de doenças

causadas por patógenos semelhantes. Tal abordagem pode ser exemplificada pela aplicação da bactéria *Mycobacterium bovis* (BCG), originalmente obtida de bovinos, na composição da vacina contra a tuberculose (BRAZ; GUIMARÃES; VAZ, 2014).

A segunda geração usa toxinas, proteínas e polissacarídeos purificados como estratégias imunológicas. Porque em alguns patógenos, é possível neutralizar e eliminar bactérias ou vírus (se não houver tal resposta imune) pela indução de anticorpos contra um único alvo (neste caso, toxinas ou açúcares de superfície), podendo então obter-se proteção por meio do uso de vacinas. Destacam-se a vacina antitetânica, hepatite B e o controle da meningite meningocócica (DINIZ; FERREIRA, 2010).

Por fim, a terceira geração parte de um conceito inovador e radical com relação às outras categorias vacinais. Essa vacina consiste em introduzir nas células do hospedeiro um gene que vai codificar uma proteína antigênica de um patógeno pré-determinado, o qual será inserido em um DNA plasmidial com o objetivo de gerar uma resposta imune com memória imunológica permanente (AZEVEDO *et al.*, 1999). Em geral são chamadas de vacinas de DNA (Ácido desoxirribonucleico) ou gênicas, foram descobertas de forma experimental na década de 1990 quando se pesquisava sobre terapias genéticas, na qual se introduzia no hospedeiro genes que iriam substituir a informação genética defeituosa que ali, originalmente, estava presente (NARDI; TEIXEIRA; SILVA; 2002);

Com o uso da biotecnologia, isto é, uso de agentes biológicos, podendo ser organismos vivos ou seus derivados, que vão ser utilizados com o intuito de fabricar produtos ou transformar processos visando um uso específico, modificou o desenvolvimento e a pesquisa de novas vacinas, seja de primeira, segunda ou terceira geração (SOUZA; MORAES, 2014). Por meio de técnicas de manipulação genética, estratégias de clonagem ou mutagênese é possível gerar microrganismos atenuados de forma precisa e com muito mais segurança biológica, por exemplo, podendo reverter um estado de virulência nativo que um patógeno apresenta (DINIZ; FERREIRA, 2010).

O uso de vacinais com a biotecnologia empregada apresenta uma grande vantagem, pois vai fornecer ao hospedeiro a informação genética necessária para que ele próprio fabrique o antígeno com as características essenciais para que haja uma resposta imune efetiva, sem os efeitos colaterais vistos quando se utiliza o patógeno inteiro ou mesmo subunidades dele. Além disso, as vacinas que utilizam o DNA, por exemplo, utilizam uma metodologia que vai se aproximar da infecção de forma natural, porém de maneira que ocorra a indução da proteção desejada sem que tenha que usar o patógeno em si, logo, pacientes imunocomprometidos ou indivíduos com sistema imunológico imaturo ou deficiente (crianças e idosos, respectivamente), não correm o risco de desenvolver efeitos adversos por esse tipo de imunização (MANCIBO *et al.*, 2016; BOLHASSANI; YAZDI, 2009).

Atualmente, com um conhecimento crescente na área de imunologia combinado com avanços significativos na área de biologia molecular e das bioengenharias, foi fornecido ferramentas para novos projetos vacinais. Como resultado, é possível visualizar no mercado vacinas mais complexas e com *design* mais seguros e eficientes, por exemplo, as VLPs quiméricas (*virus-like particles*) e vetorizados, vacinas vetorizadas e híbridas (RODRIGUES *et al.*, 2015).

As VLPs são estruturas produzidas por meio da biotecnologia do DNA recombinante, na qual as proteínas sintetizadas em sistemas de expressão, tanto procarióticos e eucarióticos, se unem para formar partículas que mimetizam as estruturas dos vírus nativos, porém, sem conter o material genético que causaria a infecção (JENNINGS; BACHMANN, 2008; EFFIO; HUBBUCHE, 2015). As VLPs quiméricas são compostas por subconjuntos de VLPs que contém proteínas virais de vírions não relacionados, porém as VLPs vetorizadas são compostas por pequenas moléculas ou proteínas incorporadas em seus materiais genéticos que terão a finalidade de serem vetores de expressão, isto é, vão levar o gene do vírus incorporado até o hospedeiro (SCHELLENBACHER, 2013; VISCIANO *et al.*, 2011; WATSON *et al.*, 2002).

As vacinas vetorizadas são definidas como veículos não patogênicos carreadores de genes virais, com o objetivo de expressá-lo nas células hospedeiras para induzir uma resposta imune protetora, são altamente exploradas com o uso de vírus com replicação defeituosa, por exemplo os adenovírus e poxvírus (MENDEZ, 2014). Por fim, as vacinas híbridas vão combinar a tecnologia das VLPs com o DNA em um único tipo vacinal. Nessa vacina, usam-se plasmídeos administrados como se fossem vacinas de DNA, mas que expressam os componentes necessários para a formação das VLPs retrovirais, tal técnica promete combinar a estabilidade e segurança das vacinas de VLPs com a grande produção em escala e com o baixo custo das vacinas de DNA (BELLIER, 2006).

Sendo assim, a biotecnologia, sendo usada como estratégia de intervenção imunológica preventiva, tem contribuído diretamente para não só aumentar a expectativa de vida da população, mas também baratear os custos da produção vacinal e diminuir o tempo médio para o desenvolvimento de novas vacinas. Além disso, traz a possibilidade do uso de vacinas como terapias contra cânceres e doenças autoimunes (DINIZ; FERREIRA, 2010; NARDI; TEIXEIRA; SILVA; 2002).

O objetivo deste trabalho consistiu em uma análise do uso da biotecnologia no desenvolvimento de vacinas, bem como na explanação das principais técnicas e avaliação de sua eficácia.

## 2. Métodos

Tratou-se de uma revisão narrativa da literatura, com uma ampla gama de características, e que visou descrever o desenvolvimento de um determinado assunto por meio da análise e interpretação das realizações científicas existentes sob a perspectiva da teoria e do contexto. Esta síntese do conhecimento, a partir da descrição de temas abrangentes, auxiliou na identificação de lacunas de conhecimento para subsidiar a realização de novas pesquisas. (BRUM *et al.*, 2015).

Para a seleção dos artigos foram utilizadas pesquisas da Biblioteca Virtual em Saúde (BVS) nas base de dados Latino Americana, a plataforma de busca PMC (*Pubmed central*) que utiliza a base de dados da MEDLINE (*Medical Literature Analysis and Retrieval System Online*) e na biblioteca SciELO - *Scientific Electronic Library Online*.

Como critério de busca foram utilizados os termos Vacina e Biotecnologia, além de Técnicas Biotecnológicas e Phage Display. Para melhores resultados, filtros com os quais os assuntos principais se resumem a “Biotecnologia” e “Vacinas” foram aplicados. Artigos em português, inglês e espanhol com publicações entre o ano de 2011 a 2021 foram usados, no entanto, em situações excepcionais, artigos anteriores ao ano de 2011 foram selecionados.

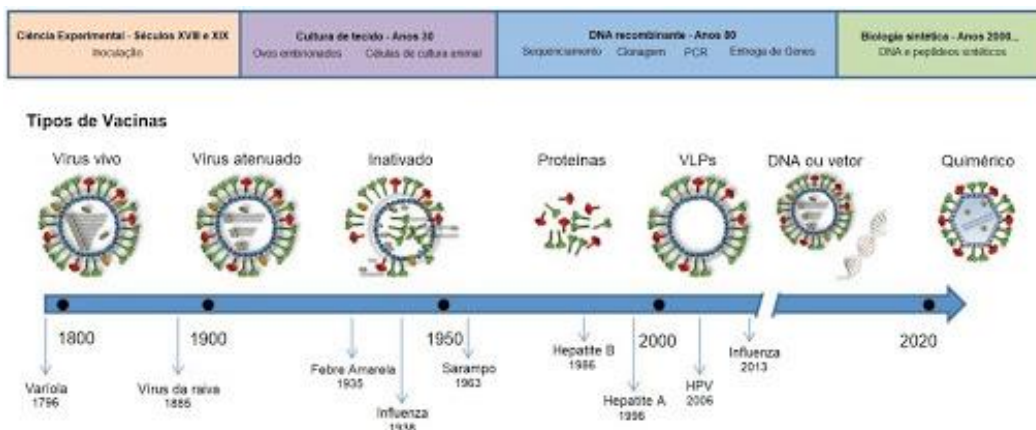
## 3. Desenvolvimento

No início do século XX, pela primeira vez, o termo “biotecnologia” foi utilizado, ainda que o termo seja novo, o princípio pode ser considerado antigo. Considerando que diz respeito a um conceito amplo, pode-se dizer que a biotecnologia se iniciou com a agricultura ou agropecuária, isto é, com a capacidade do homem de dominar plantas e animais para o próprio benefício. Acompanhado pela evolução científica, incontáveis metodologias biotecnológicas foram sistematizadas, aumentando suas vantagens econômicas, sociais e ambientais. Com a experimentação do uso de microrganismos houve a primeira revolução biotecnológica, que ocorreu com a produção de vacinas (FALEIRO; ANDRADE; REIS JUNIOR, 2011).

Com a introdução da cultura de células de animais na década de 30 e o uso de técnicas de DNA recombinante a partir da década de 1970, houve um salto tecnológico no desenvolvimento de vacinas (figura 1). O uso da biologia molecular e da engenharia genética proporcionou não apenas novas estratégias para atenuação viral, mas também novos tipos de vacinas. A expressão de proteínas antigênicas a partir do seu cDNA era agora possível, resultando na produção de grandes quantidades de antígenos altamente puros e, portanto, fornecendo mais doses. Os avanços na tecnologia da cultura celular de animais introduziram

uma nova linha de células, melhorando o bioprocesso de produção ao permitir o aumento da escala em culturas em suspensão e proporcionando rendimentos mais competitivos (RODRIGUES *et al.*, 2015).

**Figura 1:** Desenvolvimento no *design* de vacinas.



**Fonte:** Adaptado de Rodrigues *et al.* (2015).

Atualmente, as opções para o desenvolvimento de vacinas são bastante vastas. Junto com uma compreensão mais profunda do sistema imunológico, associado com as notáveis inovações tecnológicas, levou ao projeto de uma miríade de diferentes vacinas virais, por exemplo, vacinas de DNA, partículas virais quiméricas, vacinais vetoriais ou híbridas. As vacinas têm evoluído continuamente com a tecnologia a fim de proporcionar meios mais seguros de proteção imunológica aos pacientes e reduzir possíveis efeitos colaterais. Além disso, as tecnologias moleculares mais novas podem desempenhar um papel nessa demanda melhorando o perfil de segurança de uma vacina, tanto por meio de seu projeto quanto pelo seu processo de fabricação (PLOTKIN, 2005; RODRIGUES *et al.*, 2015).

As vacinas comercialmente disponíveis contra patógenos virais podem ser classificadas em três tipos gerais: vacinas vivas atenuadas; vacinas inativadas e vacinas subunitárias. Dentro desta classificação geralmente aceita, diferentes abordagens tecnológicas podem ser aplicadas, dando origem ao desenho de vários subtipos de vacinas (STRUGNELL *et al.*, 2011). Os tipos de vacinas que serão exploradas neste trabalho estão listados no quadro 1 e suas vantagens e desvantagens no quadro 2.



**Quadro 1:** Breve descrição dos tipos vacinais e seus exemplos.

<b>Tipo de Vacina</b>	<b>Descrição</b>	<b>Exemplos</b>
<b>Atenuadas e Inativadas</b>	Uso do vírus como um todo; de forma atenuada que possui um nível de replicação mais baixa que o normal ou inativada (vírus morto).	<b>Atenuada:</b> Febre amarela e Poliomielite oral (VOP) <b>Inativada:</b> Poliomielite injetável (VIP) e Influenza
<b>Subunidades</b>	É uma vacina inativada composta por um determinado componente do microorganismo e por não ser muito imunoestimuladora, faz necessário o uso de adjuvantes.	Hepatite B
<b>Vírus-like particle (VLP)</b>	São partículas que mimetizam o vírus mas que não causam infecção por não possuírem o material genético do vírus nativo.	Papiloma vírus humano (HPV)
<b>VLPs quiméricas</b>	São VLPs que em sua composição possuem duas proteínas de diferentes vírus.	Partículas de HPV e glicoproteínas de envelope de HIV (Vacina experimental)
<b>Ácidos nucleicos (NAVs)</b>	Uso de DNA ou mRNA para estimular o organismo a sintetizar uma proteína que induzirá uma resposta do sistema imunológico.	Vacina contra SARS-CoV-2 da Pfizer e BioNTech utiliza o mRNA
<b>Vetorizadas</b>	Veículos não patogênicos que transportam genes de vírus, com o objetivo de expressá-los nas células hospedeiras para induzir uma resposta imunoprotetora. No caso de VLPs vetorizadas, usa-se o núcleo como sistema de entrega, na qual pode ser incorporado drogas, enzimas ou peptídeos.	Vacina contra SARS-CoV-2 da AstraZeneca/Oxford
<b>Híbridas</b>	Combinam técnicas diferentes de <i>design</i> de vacinas no mesmo sistema.	PspA-PLY (Vacina pneumocócica experimental)
<b>Propriedades terapêuticas</b>	São vacinas que buscam reverter situações nas quais o sistema imunológico do indivíduo não foi capaz de ativar uma resposta imune efetiva	T-VEC (vacina para tratamento de câncer)
<b>Nano anticorpos</b>	São estruturas muito pequenas e que podem ser de vários tipos, como polímeros, lipídios e proteínas. Essa estrutura mimetiza as características virais e pode ser desenvolvida com diferentes propósitos	Vacina contra SARS-CoV-2 em produção na USP

**Fonte:** Elaborada pela autora.

**Quadro 2:** Vantagens e desvantagens dos tipos vacinais.

<b>Tipo de Vacina</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
<b>Atenuadas</b>	Alta imunogenicidade; mimetiza a infecção natural; resposta duradoura.	Possibilidade de reversão ao estado nativo de virulência; maiores chances de efeitos colaterais; não recomendado para imunodeprimidos ou pessoas que tenham o sistema imune deficiente ou imaturo.
<b>Inativadas</b>	Baixo risco de efeitos colaterais, pode ser administrada em imunodeprimidos e grávidas; não há risco de reversão ao estado de virulência.	Baixa imunogenicidade, necessário uso de adjuvantes; uso de doses múltiplas.
<b>Subunidades</b>	Baixo risco de efeitos colaterais, pode ser administrada em imunodeprimidos e grávidas; não há risco de reversão ao estado de virulência.	Baixa imunogenicidade, necessário uso de adjuvantes; uso de doses múltiplas.
<b>Vírus-like particle (VLP)</b>	Seguras; podem ser usadas para vírus não cultiváveis.	Alto custo e dificuldade de produção.
<b>Ácidos nucléicos (NAVs)</b>	Alta imunogenicidade; segurança; termoestáveis.	Dificuldade no armazenamento e transporte (precisam de refrigeração a $-80^{\circ}\text{C}$ ); alto custo.
<b>Vetorizadas</b>	Alta imunogenicidade.	Sensíveis a temperatura; podem reverter ao estado nativo de virulência.
<b>Propriedades terapêuticas</b>	Capacidade de reverter o quadro infeccioso ou degenerativo instalado.	Alto custo, são vacinas complexas que precisam ser específicas para as doenças alvo.
<b>Nano anticorpos</b>	Resposta imune mais específica e eficiente.	Alto custo e dificuldade de produção.

**Fonte:** Elaborada pela autora.

### 3.1 Vacinas atenuadas e inativadas

Algumas das chamadas vacinas de primeira geração, datadas do século XX, são constituídas por microrganismos inteiros que foram tratados de modo a serem inativados ou enfraquecidos, para que dessa forma não causarem mais a doença, porém continuem com sua imunogenicidade, além disso, são vantajosas pois induzem todos os tipos de respostas imunes inatas e adaptativas (humoral ou celular), logo, a forma ideal de indução de imunidade protetora (BRAZ; GUIMARÃES; VAZ, 2014; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019)

Louis Pasteur, no final do ano de 1870, com sua técnica de dessecação, conseguiu demonstrar que os microorganismos ficam menos patogênicos, mas ainda imunogênicos,

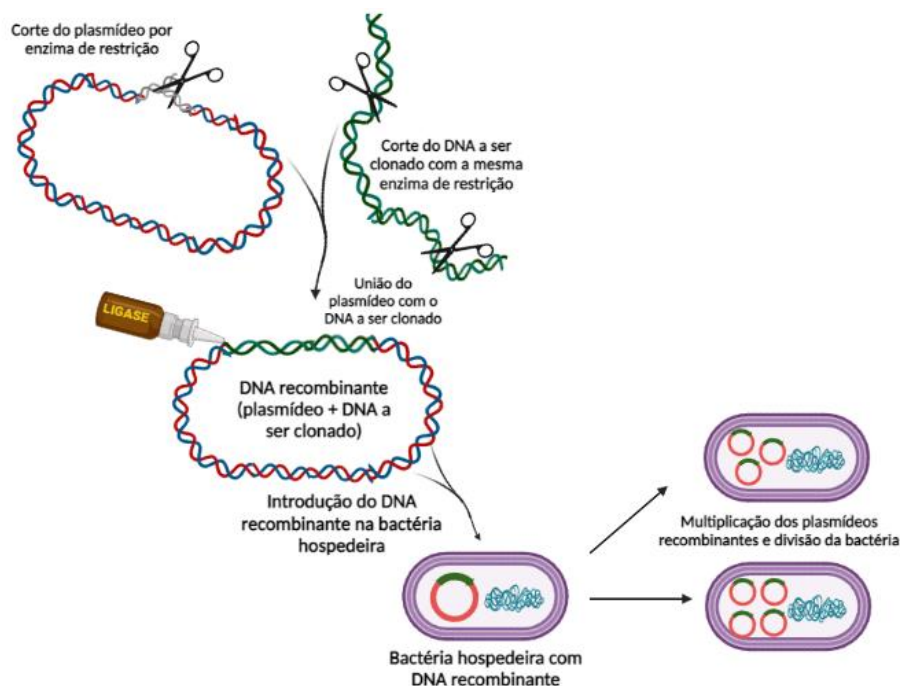
sendo umas das primeiras técnicas de atenuação relatada, na qual o cientista deu o nome de vacinação (BONANNI; SANTOS, 2011; DELVES *et al.*, 2018). A atenuação é um processo que a patogenicidade do agente infeccioso é reduzida para que não tenha possibilidade de causar a doença, mas, concomitantemente, seja capaz de causar resposta imunológica. O causador da patologia é enfraquecido por meio de passagens por um hospedeiro não natural ou por um meio que seja desfavorável. Assim sendo, quando em contato com o organismo do indivíduo (inoculação), se multiplica sem causar a doença, mas acionando o sistema imune (BRAZ; GUIMARÃES; VAZ, 2014).

Uma preocupação relacionada a vacinas atenuadas é a possibilidade de reversão ao estado nativo de virulência, como foi visto em alguns casos para a primeira vacina oral para a poliomielite. Em muitos casos, não se sabe integralmente a natureza da alteração genética que o microrganismo sofre durante o processo de atenuação, logo, pode trazer alguns riscos. Conseqüentemente, pessoas com algum tipo de imunodepressão, idosos e gestantes, não é recomendado o uso desse tipo de vacina para evitar a chance de desenvolver infecções graves (DINIZ; FERREIRA, 2010; RODRIGUES *et al.*, 2015).

Atualmente, como forma de evitar os riscos, é usada a tecnologia do DNA recombinante (como ilustrado na figura 2) que, com relativa facilidade, obtém-se mutantes atenuados através de estratégias de clonagem gênica. Podem ser elaborados microrganismos nos quais as mutações são desejáveis, isto é, genes envolvidos com a patogenia são inativados de forma que não comprometa a viabilidade do organismo, mas traz uma segurança maior para os vacinados (BRAZ; GUIMARÃES; VAZ, 2014; MURPHY, 2014).

Na busca de desenvolver um perfil de vacina mais segura e estável, foram criadas as vacinas com microrganismos inativados. Essas vacinas são geradas matando e destruindo o patógeno por agentes químicos (formaldeído, fenol) ou por agentes físicos, como o calor ou irradiação. Desse modo, o organismo torna-se incapaz de fazer a multiplicação, mas continua com a capacidade de estimular o sistema imunológico, pois suas estruturas e componentes permanecem intactos. Embora as vacinas inativadas possuam alta eficácia para alguns patógenos, para outros não há a indução de um efeito duradouro, uma vez que não dão origem a T citotóxicos que são importantes para combater patógenos intracelulares. Diante disso, o uso de adjuvantes e doses múltiplas são usados com frequência para melhorar a efetividade nesses casos (BRAZ; GUIMARÃES; VAZ, 2014; MURPHY, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2015).

**Figura 2:** Esquema para o entendimento da técnica de DNA recombinante.



Fonte: Elaborado pela autora.

### 3.2 Vacinas de subunidades

Durante as décadas de 1950 e 1960 a compreensão dos cientistas sobre a genética microbiana molecular aumentou. Novos conhecimentos quanto ao papel do DNA na célula, a natureza dos genes, a função do fago e a descoberta de enzimas de restrição levou à proposta de que a molécula de DNA poderia ser modificada para incluir um material genético diferente (BERG; MERTZ, 2010).

Dentro de quinze anos, as técnicas foram desenvolvidas para gerar DNA recombinante, em que consiste a dá para um organismo a capacidade de produzir algo que essencialmente ele não faz, como usar a bactéria *Escherichia coli* para produzir proteínas. Esta revolução na biologia permitiu que os vacinologistas abordassem o conceito de vacinas sob um novo prisma, trabalhando sob a hipótese de que usando antígenos específicos de vários agentes infecciosos, vacinas candidatas seguras, baratas e eficazes podem ser produzidas (KARCH; BURKHARD, 2016).

Para construção de vacinas inativadas ou atenuadas, exigia que fosse feito uma cultura de um determinado agente infeccioso antes que pudesse começar a desenvolver a vacina candidata. Ao usar a tecnologia de DNA recombinante, antígenos de proteínas de

organismos que são de difícil cultura, altamente patogênicos ou extremamente caros, possuem maior viabilidades para serem gerados (MOYLE; TOTH, 2013).

As vacinas virais de subunidade são um desenvolvimento adicional de vacinas virais inativadas, mas em vez de gerar anticorpos contra todos os antígenos de patógenos, apenas um ou apenas alguns antígenos são usados. Essas vacinas usam antígenos imunodominantes, partes específicas do vírus (proteínas completas ou peptídeos) conhecidas por estimular a geração de anticorpos neutralizantes, além disso, podem incorporar uma série de diferentes componentes, como um ou mais antigênicos de diferentes espécies e diversos adjuvantes (PULENDRAN; AHMED, 2011; RODRIGUES *et al.*, 2015)

Essas vacinas, assim como as inativadas, são estáveis, reduzem os efeitos como as reversões espontâneas de vacinas atenuadas e por isso são consideradas mais seguras. O problema resultante é que as vacinas de subunidade em geral não são tão imunoestimuladoras. Este efeito é provavelmente causado por capacidade reduzida de serem reconhecidas por receptores de células B, bem como redução da capacidade de estimular APCs (células apresentadoras de antígenos). Portanto, é necessário a coadministração de adjuvantes (sais de alumínio são os mais comuns) e muitas vezes doses múltiplas, além disso, outros componentes podem ser adicionados para melhorar as características da vacina (por exemplo, estabilidade, potência, eficácia protetora e o número de doses necessárias). Estes incluem sistemas de entrega (por exemplo, emulsões, lipossomos e polímeros) e frações de direcionamento capazes de sinalizar células específicas do sistema imune, como células dendríticas (MOSER; LEO, 2010; MURPHY, 2014; KARCH; BURKHARD, 2016).

Projetos de vacinas complexas, como VLPs, vacinas de material genético, vacinas vetorizadas e vacinas VLPs vetorizadas são frequentemente classificadas como vacinas de subunidade, uma vez que elas usam alguns antígenos do patógeno, seja na forma de proteína ou material genético. Para o propósito desta revisão mais detalhes sobre esses tipos de vacinas serão dados a seguir.

### **3.3 Vacinas de *Virus-like particle* (VLP)**

*Virus-like particle* (VLP) são compostas por uma ou várias proteínas que têm a capacidade de se auto montarem quando expressada de forma recombinante. São estruturas, no geral, idênticas ou altamente relacionadas ao vírus nativo correspondente, tanto de forma antigênica quanto física, que não possuem em sua montagem o material genético viral, portanto, não há potencial replicativo. Fazendo com que sejam candidatas efetivas e seguras para o desenvolvimento vacinal (ZELTINS, 2012; MOHSEN *et al.*, 2017).

VLPs podem ser sub-categorizadas em envelopadas ou não-envelopadas. As partículas sem o envelope são compostas por uma ou mais proteínas virais estruturais, enquanto as envelopadas são mais complexas estruturalmente, pois são envoltas por uma membrana lipídica derivada da célula hospedeira, na qual os antígenos virais são fixados (KUSHNIR; STREATFIELD; YUSIBOV, 2012). Além disso, podem ser classificados segundo a taxonomia do vírus derivado ou de acordo com o método de expressão utilizado, as proteínas virais são expressas em sistemas como bactérias, leveduras, mamíferos, insetos ou células de plantas (VICENTE *et al.*, 2011; LUA *et al.*, 2014).

As VLPs são estáveis e versáteis e exibem excelentes propriedades adjuvantes capazes de induzir respostas imunes inatas e adaptativas. Na verdade, VLPs podem montar uma proteção imunológica eficaz sem o uso de moléculas coadjuvantes e exigindo doses mais baixas do que os antígenos de proteína solúvel. Além disso, a estrutura de VLPs favorece sua aceitação por células apresentadoras de antígeno (APCs), essenciais para induzir proteção imunológica duradoura. APCs exibem antígenos estranhos ao complexo de histocompatibilidade (MHC) em sua superfície, então as células T podem reconhecer esses complexos por meio de seus receptores de células T (TCRs) iniciando uma resposta imune que estimula linfócitos TCD8 e linfócitos B, como foi ilustrado na figura 3 (CHROBOCZEK; SZURGOT; SZOLAJSKA, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2015).

O interesse em novas VLPs foi amplamente inspirado pelo desenvolvimento e a introdução bem sucedida do vírus de hepatite B (HBV) como antígeno de superfície e o papiloma vírus humano (HPV) proteína L1 de seu capsídeo viral em vacinas comerciais contra hepatite B e câncer de colo de útero induzido por HPV, respectivamente. Recentemente, várias candidatas a vacinas baseadas em VLP entraram em diferentes estágios de investigações clínicas como vacinas para malária e norovírus (ROLDÃO *et al.*, 2010; ZELTINS, 2012).

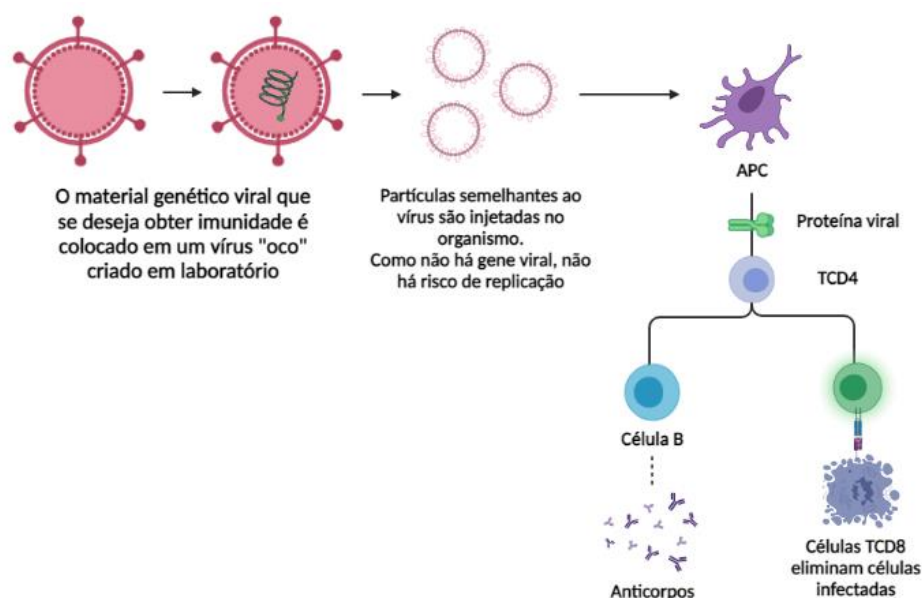
### **3.3.1 Vacinas VLP's quiméricas**

O desenvolvimento de VLPs revelou-se um verdadeiro desafio por muitos vírus, como, rotavírus, vírus da hepatite C (HCV) e influenza. Para tentar atingir novos alvos, foi criado um subconjunto de VLPs que são compostas por proteína viral e o seu envelope é derivado de um segundo vírus (heterólogo), conhecido como VLPs quiméricos, no caso de VLPs não envelopados a apresentação do antígeno heterólogo pode ser alcançada por meio de fusão molecular ou conjugação química (BELLIER; KLATZMANN, 2013; RODRIGUES *et al.*, 2015).

Como já existe uma vacina para HBV comercial, as VLP's quiméricas baseadas em HBV são um dos suportes mais utilizados para a exibição de outras proteínas e peptídeos.

Ainda, como forma de manter a estabilidade das partículas, é possível combinar duas proteínas diferentes usando VLP híbridas, por exemplo, partículas compostas por proteínas L1 e L2 de HPV e glicoproteínas de HIV, que foram comprovadas que geram respostas imunes fortes e amplas (VISCIANO, 2011; RODRIGUES *et al.*, 2015). Por engenharia genética, as VLP's quiméricas permitem o desenvolvimento de vacinas bivalentes ou multivalentes que poderiam transmitir proteção contra coinfeções de múltiplos vírus tal como vírus da doença de Newcastle e o vírus influenza A ou vírus da raiva e o vírus ebola (SHEN *et al.*, 2013; BLANEY *et al.*, 2013; LEI; CAI; YANG; 2020).

**Figura 3:** Estímulo imunológico das VLPs.



**Fonte:** Elaborada pela autora.

### 3.3.2 Vacinas VLP's vetorizadas

As VLP's também podem ser desenvolvidas como um sistema de entrega *in vivo* devido ao núcleo ser "vazio", pois não é usado gene viral, por isso o núcleo poderia incorporar enzimas, drogas, materiais genéticos, macromoléculas ou reagentes de imagem, fazendo com que essas partículas pseudo virais tenha novas aplicações como na entrega de drogas, nas terapias gênicas e tratamento de câncer. O desenvolvimento dessas estratégias criou-se uma classe de vacinas baseadas em VLP, conhecidas como vacinas VLPs vetorizadas (YAN *et al.*, 2015; RODRIGUES *et al.*, 2015; LEI; CAI; YANG; 2020).

Proteínas ou peptídeos completos podem ser fundidos com proteínas do capsídeo, com ou sem ligantes cliváveis para serem liberados após a entrada na célula. Isso pode ser

aplicado a proteínas solúveis, epítomos de antígenos específicos entregues como peptídeos ou para entregar proteínas imunomoduladoras funcionais como fatores de transcrição, citocinas, ligantes de TLR ou adjuvantes. A modificação da superfície de VLPs pode ser usada para diversos fins; polímeros como a polietilenimina agem como adjuvantes, enquanto o polietilenoglicol (PEG) pode aumentar a estabilidade das VLPs (WU; ROTH, 2014; SHEPPARD, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2015).

### 3.4 Vacinas de ácidos nucleicos (NAVs)

O uso terapêutico de ácidos nucleicos surgiu como alternativa promissora às abordagens convencionais de vacinas. O primeiro relato do uso bem-sucedido de transcritos *in vitro* foi publicado em 1990. O primeiro passo crucial para o sucesso das NAVs é a sua internalização no citoplasma e núcleo (se necessário) das células hospedeiras, especialmente as células dendríticas (DCs), que são o tipo mais importante de células apresentadoras de antígenos (APCs) (PARDI *et al.*, 2018; JAHANAFROOZ *et al.*, 2020)

Um estudo publicado na *Science* por Wolff *et al.* (1990), demonstrou que os chamados "naked DNA", ou seja, o DNA de plasmídeo que não foi formulado em agentes de transfecção, poderia ser injetado diretamente no músculo resultando em expressão de antígenos nos miócitos. A observação foi importante porque até então, um esforço significativo tinha sido dedicado às formulações para entregar DNA *in vivo*, e muitos desses compostos eram usados para transfecção *in vitro* (QIN *et al.*, 2021). A surpreendente simplicidade da abordagem gerou interesse significativo, e quando foi logo demonstrado (em 1993) que o DNA plasmidial que codifica uma proteína de influenza interna poderia gerar proteção em um modelo de camundongo pré-clínico contra influenza, muitos grupos começaram a desenvolver DNA de plasmídeo para vacinas, imunoterapias de câncer e intervenções imunes para doenças autoimunes e alérgicas (KOCH; FATHI; ADDO, 2021; LIU, 2019)

As vacinas de DNA têm muitas vantagens sobre as vacinas tradicionais, sendo o projeto da vacina simples, geralmente exigindo apenas uma clonagem de uma etapa no vetor plasmídeo, reduzindo assim o custo e o tempo de produção. Além disso, a expressão *in vivo* de um gene de antígeno conduzido por um promotor eucariótico e a modificação pós-tradução endógena resulta em estruturas de proteínas nativas, garantindo o processamento apropriado e a apresentação imune. Do ponto de vista da segurança, a clonagem ou síntese de ácidos nucleicos em vez de ter que purificar proteínas de patógenos evita a necessidade de uso de microorganismos patogênicos na fabricação de vacinas. A tecnologia de DNA recombinante permite quase qualquer tipo de manipulação molecular no DNA de plasmídeo, incluindo mutação *in vitro*, permitindo um redesenho rápido de antígenos para patógenos, como a gripe,

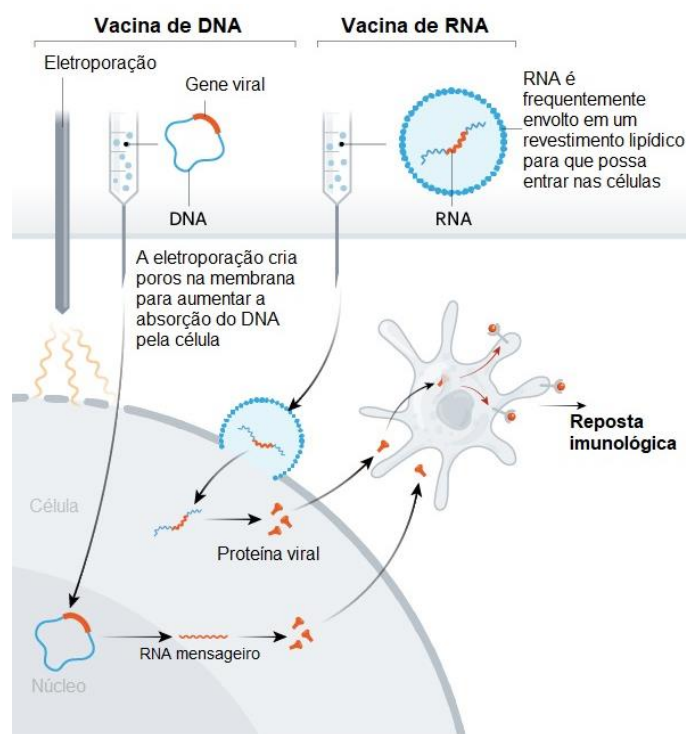


que exibe uma deriva antigênica constante. O DNA de plasmídeo tem um bom histórico de segurança em humanos, sendo os efeitos colaterais mais comuns uma inflamação leve no local da injeção. O DNA plasmidial é estável à temperatura ambiente, evitando a necessidade de rede de frio durante o transporte. As vacinas de DNA permitem que os antígenos expressos sejam apresentados pelos complexos MHC classe I e classe II, permitindo assim a estimulação de células TCD8 e TCD4, respectivamente (LIU, 2011; LI; PETROVSKY, 2016).

O RNA mensageiro (mRNA) é a etapa intermediária entre a tradução de DNA que codifica proteínas e a produção de proteínas pelos ribossomos no citoplasma. Dois tipos principais de RNA são atualmente estudados como vacinas: não replicantes mRNA e RNA auto-amplificador derivado de vírus. As vacinas convencionais baseadas em mRNA codifica o antígeno de interesse e contêm regiões 5' e 3' não traduzidas (UTRs), enquanto os RNAs de auto amplificação codificam não apenas o antígeno, mas também a maquinaria de replicação viral que permite à amplificação de RNA intracelular e abundante expressão de proteína (PARDI *et al.*, 2018).

Como base tecnológica de terapêutica e vacinas, o mRNA, caracteriza-se por uma grande flexibilidade quanto à produção e aplicação. Qualquer proteína pode ser codificada e expressa por mRNA, em princípio permitindo o desenvolvimento de vacinas profiláticas e terapêuticas que combatem doenças tão diversas como infecções e câncer, bem como terapias de substituição de proteínas. Como as mudanças da proteína codificada apenas alteram a sequência da molécula de RNA, deixando suas características físico-químicas amplamente inalteradas, diversos produtos podem ser fabricados usando o mesmo processo de produção estabelecido sem qualquer ajuste, economizando tempo e reduzindo custos em comparação com outras plataformas de vacinas. Em termos de eficácia, as terapêuticas baseadas em mRNA lucram com o fato de que não precisam cruzar o envelope nuclear, ao contrário do DNA. Em contraste com os peptídeos, as vacinas de mRNA carecem de restrição do haplótipo MHC. Além disso, o mRNA se liga a receptores de reconhecimento de padrões e as vacinas de mRNA podem ser projetadas para serem auto-adjuvantes, uma propriedade que falta às vacinas baseadas em peptídeos e proteínas (MLECZEK *et al.*, 2011; SCHLAKE *et al.*, 2012). A figura 4 exemplifica o funcionamento dos dois tipos vacinais, DNA e RNA.

**Figura 4:** Funcionamento das vacinas de ácidos nucleicos.



**Fonte:** Adaptado de Callaway (2020).

### 3.5 Vacinas vetorizadas

As vacinas vetorizadas (figura 5) são definidas como veículos não patogênicos que transportam genes de vírus, com o objetivo de expressá-los nas células hospedeiras para induzir uma resposta imunoprotetora. Sua capacidade de infectar células e expressar antígenos codificados que podem ser eliminados no meio extracelular ou direcionados para as vias de processamento intracelular do hospedeiro garantem indução altamente eficiente da resposta humoral e celular (RODRIGUES *et al.*, 2015; EWER, 2016).

A deleção de genes selecionados é uma estratégia amplamente utilizada para reduzir ou eliminar a capacidade replicativa de vetores virais, o que garante segurança para uso humano sem perda de potência. No entanto, alguns vetores virais competentes para replicação também podem ser administrados com segurança e podem fornecer potência equivalente em doses mais baixas. A principal desvantagem das vacinas de vetor viral é que a resposta específica do gene transportado pode ser atenuada ou por respostas imunes adaptativas a alvos antigênicos dentro do próprio vetor. As estratégias para superar isso incluem o uso de doses mais altas, permitindo a tolerabilidade, e regimes de vacinas heterólogas de reforço. (EWER, 2016).

Uma abundância de vetores virais está disponível com base em adenovírus, poliovírus, vírus herpes simplex, citomegalovírus, alfavírus ou vírus adeno associado. Os adenovírus têm sido o vetor de vacina mais utilizado. Os adenovírus são facilmente produzidos em células comerciais para cultura celular e em altos títulos e expressam os transgenes em níveis elevados, ativando o sistema imunológico inato e estimulando a maturação das células dendríticas (RODRIGUES *et al.*, 2015).

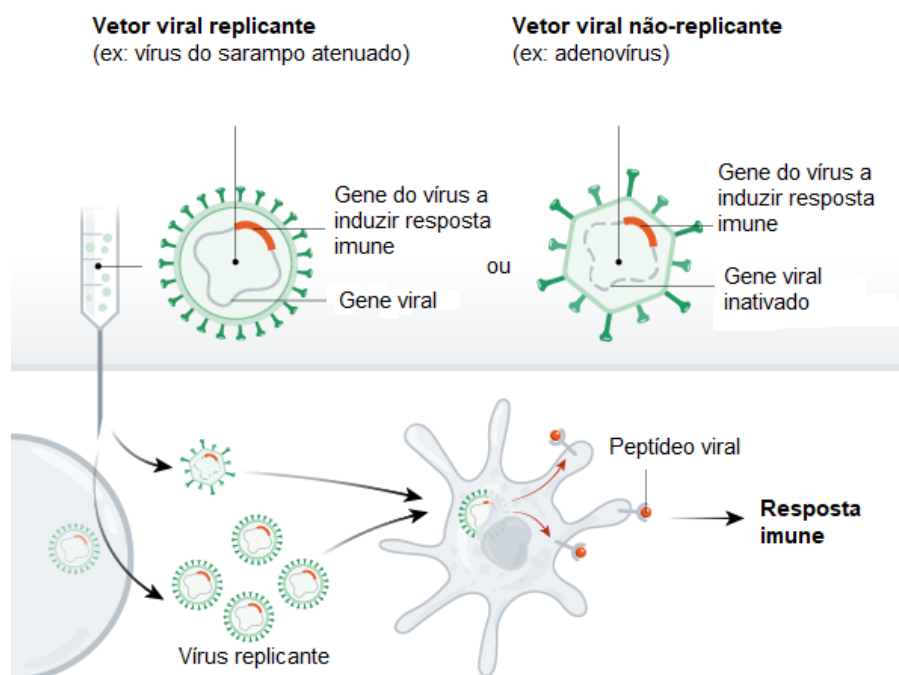
### 3.6 Vacinas híbridas

Um novo conceito que também está surgindo é a expressão *in vivo* de VLPs, ou plasmovLPs, usando a tecnologia de vacinação de DNA. PlasmovLPs combinam vacinas do tipo DNA e VLP em uma, por isso são consideradas vacinas híbridas, pois combinam técnicas diferentes no mesmo sistema. Os plasmov-retro VLPs são plasmídeos administrados como vacinas de DNA que expressam todos os componentes necessários para a formação de VLPs baseada em retrovírus (retrovLPs) estas são baseadas no vírus da leucemia murina (MLV) (BELLIER *et al.*, 2006). Plasmov-retrovLPs combinam a simplicidade, a estabilidade, a produção em larga escala e baixo custo de vacinas de DNA com as propriedades imunoestimuladoras das vacinas VLP, porém contornando-os seus processos trabalhosos de produção, purificação e formulação da vacina VLP (BELLIER *et al.*, 2009).

Esta tecnologia induziu níveis mais precoces e significativamente mais elevados de anticorpos neutralizantes do que simplesmente expressar as proteínas do envelope viral em um DNA de plasmídeo. Também esses anticorpos circulantes foram mantidos por um longo período e podem ser aumentados por uma dose de reforço desse tipo vacinal. Estudos posteriores, usando modelos animais, mostraram que plasmovLPs foram capazes de preparar APCs e gerar resposta imune protetora para HCV, HIV e aparecem como uma estratégia promissora para o tratamento de cânceres induzidos por HPV (BELLIER *et al.*, 2009; GARRONE *et al.*, 2011; RODRIGUES *et al.*, 2015)

Outros projetos híbridos de vacinas são os casos de vacinas vetorizadas combinadas com VLPs vetorizadas, isto é, a exibição dos antígenos na forma de proteína é combinada com a entrega do antígeno na forma de material genético, em DNA ou RNA. Este é o caso de alphavirus e flavivirus que podem ser produzidos sem uma porção de seu genoma e posteriormente modificados para codificar um antígeno viral estranho de interesse (LJUNGBERG *et al.*, 2007).

**Figura 5:** Ação das vacinas vetorizadas.



Fonte: Adaptado de Callaway (2020).

### 3.7 Outras vacinas

#### 3.7.1 Vacinas com propriedades terapêuticas

Vacinas terapêuticas têm como objetivo controlar infecções crônicas ou doenças degenerativas instaladas no indivíduo a ser tratado. Nesse aspecto, a definição de vacina terapêutica se confunde com o conceito de terapia gênica, particularmente quando se lança mão de vacinas de DNA ou vetores vivos que, em última instância, introduzem informação genética nas células do hospedeiro que se encarrega de produzir as proteínas que irão desencadear uma resposta imunológica capaz de reverter o quadro infeccioso ou degenerativo instalado. A base de qualquer vacina terapêutica é, portanto, reverter situações nas quais o sistema imunológico do indivíduo não foi capaz de ativar uma resposta imune na intensidade ou na qualidade adequada, o que, em geral, resulta na instalação de um quadro de tolerância imunológica. Evidentemente, a relevância do conceito vacinal terapêutico traz sentido apenas nos casos em que não existam opções terapêuticas disponíveis mais eficientes. Além disso, para que uma vacina terapêutica possa ter sucesso, deve haver evidências de que a doença e, conseqüentemente, o patógeno que a causou possam ser controlados pelo sistema imunológico do indivíduo, uma vez que ativado corretamente, como no caso de doenças crônicas como aquelas causadas pelos vírus da imunodeficiência

adquirida (HIV), herpes humano (HSV), da hepatite B (HBV) e do papiloma humano (HPV) (DINIZ; FERREIRA, 2010).

A principal característica deste tipo de abordagem é a geração de linfócitos T citotóxicos responsáveis pela destruição de células infectadas ou transformadas. Enquanto anticorpos exercem papel chave na neutralização do patógeno, os linfócitos TCD8 + podem destruir células infectadas e impedir a progressão da doença. Diversas abordagens foram empregadas para o desenvolvimento de uma vacina com tal característica, como aquelas baseadas em peptídeos sintéticos, proteínas purificadas, vetores virais ou bacterianos, e mesmo células dendríticas ou tumorais, entre outras. Nesse contexto, as vacinas de DNA surgem como uma estratégia interessante para a geração de respostas imunes antígeno-específicas que, por sua capacidade de indução de respostas citotóxicas, atuam somente sobre as células tumorais, evitando efeitos colaterais como os observados nos tratamentos de radio e quimioterapia atualmente empregados (DINIZ; FERREIRA, 2010; BRAGA, 2011;).

### **3.7.2 Vacinas com uso de nano anticorpos com técnica de Phage Display**

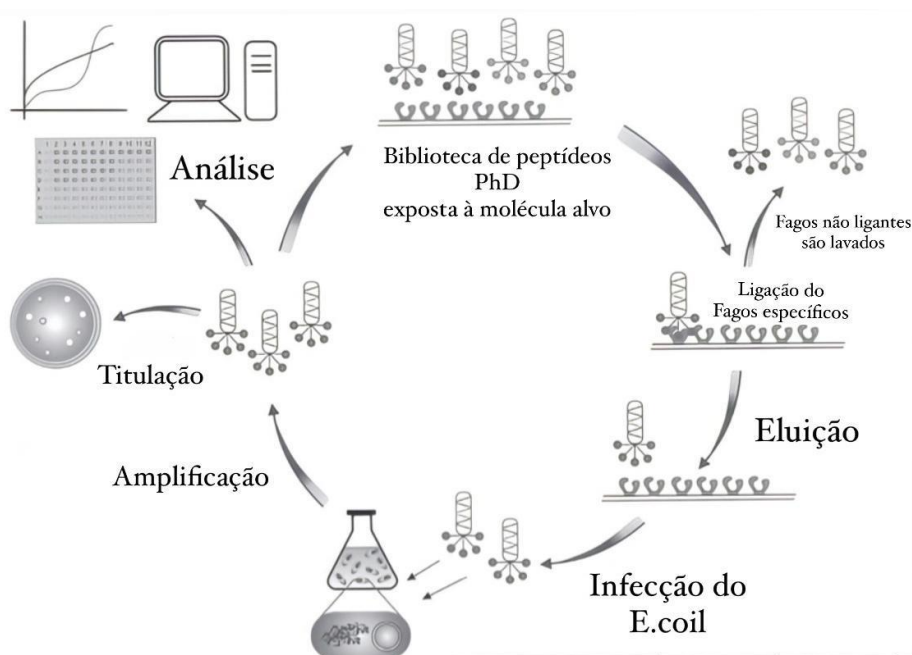
Uma série de coincidências nos anos 90, levou à descoberta de um grupo distinto de anticorpos na família *Camelidae* (*Camelus dromedarius*, *Camelus bactrianus*, *Llama glama*, *Lhama guanaco*, *Lhama alpaca* e *Lhama vicugna*), compostos unicamente por duas cadeias pesadas idênticas que passaram a ser conhecidos por anticorpos de cadeia pesada (HCAbs). Estes têm recebido considerável atenção pelas suas características, tais como, estabilidade conformacional, alta solubilidade, produção econômica, tamanho reduzido e facilidade de clonagem; ainda há uma grande diversidade de genes, característica essa que faz com que os nano anticorpos tenham uma grande capacidade de ligação ao antígeno. Além disso, devido à sua reduzida massa molecular (~16 kDa), permite aos fragmentos uma melhor farmacocinética e penetração ao nível dos tecidos, reconhecimento de tecidos pouco comuns ou escondidos e uma baixa resposta imunológica (ROCHA, 2012).

A técnica de *phage display* (figura 6) é uma tecnologia molecular emergente com mais de duas décadas e que, em junção com a nanotecnologia, nos últimos anos tem provado o seu potencial na investigação científica. O phage display é baseado em clonagem de fragmentos de DNA codificantes de milhares de ligantes (ex: peptídeos, proteínas ou fragmentos de anticorpos) no genoma viral, fusionando o gene codificante a uma das proteínas do capsídeo viral (geralmente a pIII, podendo ser ainda a pIV, pVI ou pVIII). A fusão com a proteína do capsídeo é incorporada às novas partículas do fago que são montadas no espaço periplasmático da bactéria. A expressão do produto gênico fusionado e sua subsequente incorporação à proteína do capsídeo já madura resultam na exposição do ligante

na superfície do fago, enquanto o DNA está encapsulado em seu interior (ROCHA, 2012; RESENDE, 2016).

A sequência do DNA exógeno inserida entre dois domínios proteicos da pIII não perturba sua função e permite a exibição da sequência peptídica de forma imunologicamente acessível na partícula infecciosa. A purificação por afinidade desses fagos com a fusão peptídica pode proporcionar a identificação de alvos em uma biblioteca de inserções aleatórias, quando um anticorpo específico reconhece e se associa ao peptídeo exógeno na fusão. Os fagos ligantes são amplificados, purificados e então sequenciados para que seus peptídeos em fusão sejam caracterizados. Sua utilização compreende tanto a seleção de bibliotecas combinatórias de peptídeos para identificar ligantes de receptores celulares, mapear epítomos de anticorpos monoclonais e selecionar substratos enzimáticos quanto a seleção do repertório de fragmentos de anticorpos para identificar antígenos protéicos ou não protéicos sem a necessidade de imunização e produção de hibridomas (RESENDE, 2016). Diante disso, os nano anticorpos são selecionados via técnica de *phage display* sendo possível aumentar qualitativamente suas bibliotecas, logo, há desenvolvimento de vacinas mais eficazes, com maior segurança e com uma perspectiva terapêutica mais eficiente face a doenças crônicas que tanto afeta as pessoas atualmente (ROCHA, 2012).

**Figura 6:** Ciclo de seleção por *phage display*.



**Fonte:** Resende (2016).

### 3.8 Fases do desenvolvimento vacinal

Os ensaios clínicos são indicados para avaliar a segurança e eficácia de: 1. um novo produto; 2. uma nova formulação de um mesmo produto ou associação de produtos já em uso e 3. uma nova indicação clínica de um produto já aprovado. Os ensaios podem avaliar o efeito terapêutico (drogas) ou profilático (vacinas). Toda substância para uso médico deve ter uma indicação específica, em função de seu efeito biológico desejado para o qual se elabora um ensaio clínico (OLIVEIRA; PARENTE, 2010; BRASIL, 2015)

O desenho do protocolo e documentação clínica dos estudos devem seguir as recomendações dos órgãos normativos e de vigilância de medicamentos do país, para que os resultados possam ser considerados válidos para aprovação do produto. Um novo produto só é levado à experimentação em seres humanos depois de conhecido seus aspectos químicos, farmacológicos, mecanismos de ação e toxicidade em provas pré-clínicas, *in vitro* ou em modelos experimentais quando disponíveis (CAMACHO, 2013; BRASIL, 2015).

O processo de pesquisa e desenvolvimento (P&D) de uma nova vacina é constituído de diversas etapas, tratando-se, portanto, de um processo demorado, de alto investimento e associado a riscos elevados, particularmente quando se trata das doenças negligenciadas. A primeira etapa corresponde à pesquisa básica e é onde novas propostas de vacinas são identificadas. Segunda etapa: realização dos testes pré-clínicos (*in vitro e/ou in vivo*) que têm por objetivo demonstrar a segurança e o potencial imunogênico da vacina. Terceira etapa: ensaios clínicos, que é a mais longa e a mais cara do processo de P&D, na qual se divide em fases I, II, III e IV, como está ilustrado na figura 7 (BUTANTAN, 2020; FIOCRUZ, 2020a).

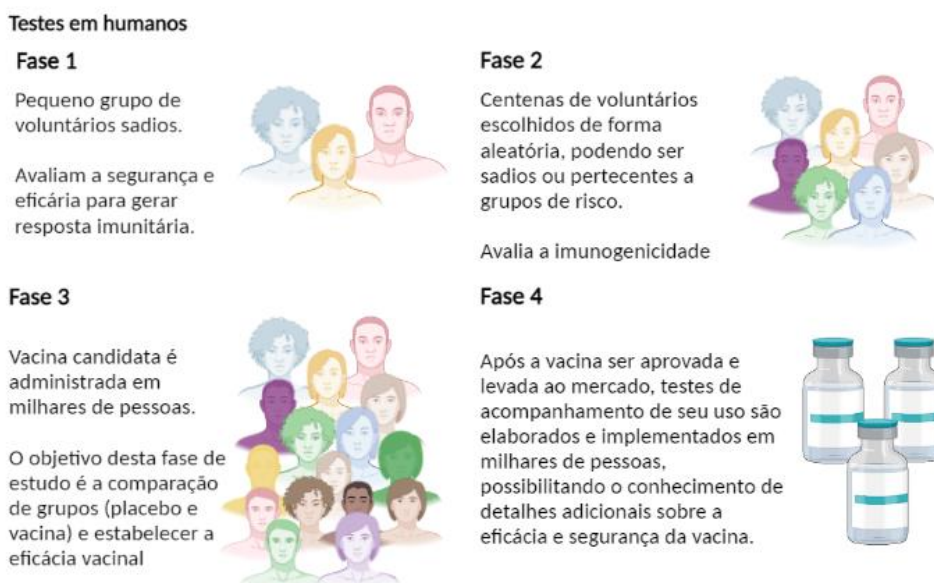
A fase I é o primeiro estudo a ser realizado em seres humanos e tem como objetivo principal demonstrar a segurança da vacina. Esta é administrada a um pequeno número de pessoas (frequentemente varia de 10 a 100 participantes de pesquisa) além da segurança, se avalia a dose e a capacidade inicial de estimular o sistema imunológico (FIOCRUZ, 2020a; FIOCRUZ, 2020b). A fase II tem por objetivo estabelecer a imunogenicidade (capacidade que a vacina tem de estimular o sistema imunológico a produzir anticorpos). A imunogenicidade, constantemente, é medida por meio de coletas de sangue, utilizando metodologias de análise adequadas para avaliar a resposta imunológica à vacina administrada (FIOCRUZ, 2020a).

Na fase III a vacina candidata é administrada a milhares de pessoas (de 5 a 10 mil voluntários), visando confirmar a sua eficácia, isto é, a prevenção da infecção, e conhecer mais dados sobre reações adversas em grupos variados de indivíduos, por exemplo, crianças e idosos. O objetivo desta fase de estudo é a comparação de grupos (placebo e vacina) e estabelecer a eficácia vacinal. Os testes de fase III devem fornecer todas as informações necessárias para a elaboração do rótulo e da bula da vacina. A análise dos dados obtidos

nessa fase pode levar ao registro e aprovação para uso comercial do novo imunizante, pelas autoridades sanitárias (UNICAMP, 2020; BUTANTAN, 2020).

Por fim, a fase IV é conhecida como “estudo pós-comercialização”, após a vacina ser aprovada e levada ao mercado, testes de acompanhamento de seu uso são elaborados e implementados em milhares de pessoas, possibilitando o conhecimento de detalhes adicionais sobre a eficácia e segurança da vacina. Um dos objetivos importantes dos estudos de fase IV é detectar e definir efeitos colaterais previamente desconhecidos ou incompletamente qualificados, assim como os fatores de risco relacionados (UNICAMP, 2020; FIOCRUZ, 2020a).

**Figura 7:** Fases do desenvolvimento de vacinas.



**Fonte:** Elaborada pela autora.

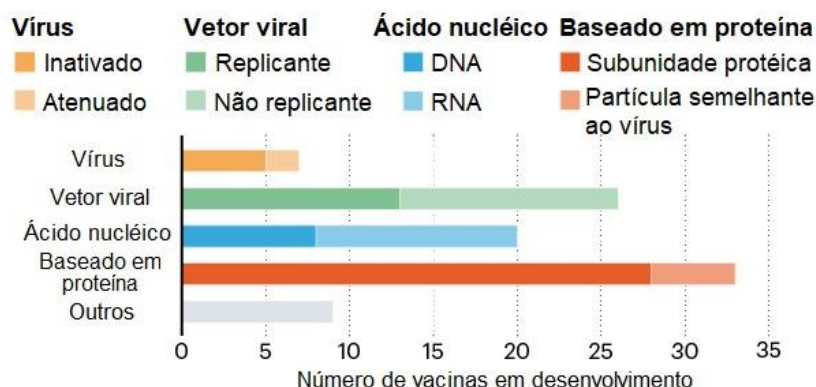
### 3.9 Vacinas para SARS-CoV-2

A pandemia causada pelo coronavírus SARS-CoV-2 trouxe nas vacinas a esperança de controle da doença que já matou mais de 3 milhões de pessoas e já acometeu cerca de 156 milhões de indivíduos no mundo todo (WHO, 2021). A imunidade garantida de toda a população permitirá a volta da normalidade e diminuirá todas as grandes implicações sociais e econômicas que a enfermidade trouxe (YAMEY *et al.*, 2020). No geral, as vacinas pesquisadas contra a COVID-19 visa introduzir anticorpos neutralizantes contra subunidades específicas do vírus, a maioria delas tem como alvo a região conhecida como RBD (domínio de ligação do receptor) da proteína viral mais estável, a proteína S (*Spike*), dessa forma, os



anticorpos induzidos pela vacina irão impedir a captação do SARS-CoV-2 pelo receptor ECA2 humano (enzima conversora de angiotensina 2) (LE *et al.*, 2020). Na figura 8 podem ser vistas os diferentes tipos de vacina contra a COVID-19 que estão em desenvolvimento.

**Figura 8:** Diferentes tipos de vacinas contra SARS-CoV-2 em desenvolvimento.



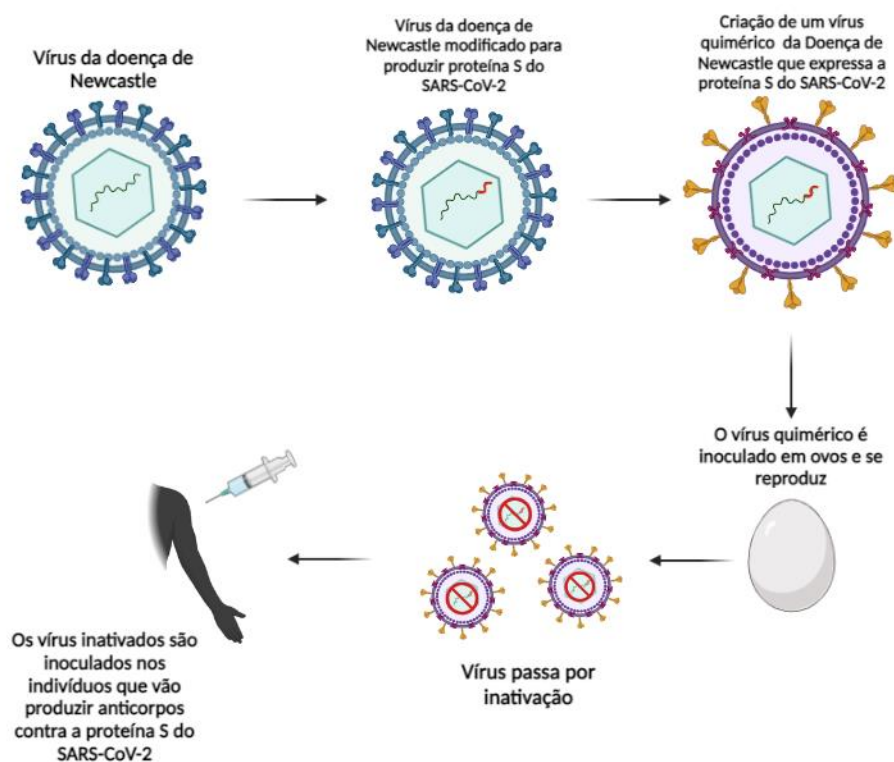
**Fonte:** Adaptado de Callaway (2020).

As vacinas contra a COVID-19 fazem uso de várias técnicas que usam a biotecnologia, além disso, trouxeram novos tipos vacinais, por exemplo, o uso da tecnologia de ácidos nucléicos para indução de anticorpos que está presente na vacina da fabricante *Pfizer-Biontech* e Moderna, ambas utilizam um RNA mensageiro modificado com sistema de entregas em lipídeos para o organismo sintetizar a proteína S do SARS-CoV-2 que será reconhecida por células imunitárias e desencadeará respostas de células B e T. Por isso que essas vacinas conseguem chegar a quase 95% de eficácia, pois induzem respostas imunológicas diferentes que auxiliam no combate viral. (ZHANG *et al.*, 2020; EMA, 2021a; PFIZER, 2021).

As vacinas baseadas em vetores virais também estão sendo muito usadas no combate da doença, essa técnica pode ser vista nos imunizantes desenvolvidos pela Oxford/Astrazeneca e pela Rússia, a chamada *Sputnik V* (LIMA; ALMEIDA; KFOURI, 2021). As duas usam um adenovírus como vetor, sendo que a primeira faz uso de um adenovírus de chimpanzé e a segunda, dois adenovírus humanos, não são vetores replicantes e expressam a proteína *spike*. Ao entrar na célula a glicoproteína S do SARS-CoV-2 é expressa localmente estimulando anticorpos neutralizantes e resposta imune celular, no caso da *Sputnik V*, a segunda dose é composta por um segundo adenovírus (diferente do primeiro), que na teoria induzirá uma resposta imunológica maior e a longo prazo (ANVISA, 2021a; LOGUNOV, 2021; SPUTNIK, 2021).

Recentemente, o próprio Instituto Butantan anunciou que irá começar a produzir uma vacina totalmente brasileira, a Butanvac, que contará com a mesma plataforma de produção e tecnologia da vacina da Influenza, que é produzida a partir da inoculação do vírus em ovos embrionados de galinhas. Após um período de incubação, o líquido alantóico que envolve o embrião é colhido, centrifugado, concentrado, fragmentado e inativado. Além disso, a vacina será baseada em vetores virais, por meio do vírus de Newcastle modificado para expressar uma super proteína S, que promete imunizar de forma mais efetiva que as proteínas S que estão sendo usadas por outras vacinas (figura 9) (BUTANTAN, 2021a).

**Figura 9:** Esquema funcional da Butanvac.



**Fonte:** Elaborada pela autora.

As técnicas tradicionais de fabricação de vacinas também estão sendo usadas para tentar conter essa pandemia, a Coronavac, produzida pelo Instituto Butantan em parceria com o laboratório Chinês, Sinovac, faz uso da plataforma de vírus inativado, com cultivo celular do vírus em células vero com posterior inativação, além disso, é a vacina mais utilizada no Brasil para imunização da população (LIMA; ALMEIDA; KFOURI, 2021; BUTANTAN, 2021b). As vacinas de subunidade ou de partículas semelhantes ao vírus (VLP) também aparecem como candidatas, por exemplo, a vacina do laboratório Novavax faz uso da proteína S recombinante desenvolvida com nanopartículas e associada com um adjuvante (KRAMMER, 2020).

A Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), órgão regulatório que faz aprovação do uso das vacinas no Brasil, já registrou no país as vacinas da *Pfizer* e da *Oxford/Astrazeneca* para uso definitivo, a *Coronovac* também tem seu registro, porém, para uso emergencial, ainda, a vacina da *Jassen*, que utiliza o vetor viral como tecnologia e é uma das únicas vacinas no mercado que necessita somente de uma dose para imunização, no dia 31 de março conseguiu sua aprovação para uso emergencial, sendo uma validação importante para aumentar a as vacinas no país (ANVISA, 2021b; ANVISA, 2021c; EMA, 2021b). A *Sputnik V*, vacina da Rússia, foi aprovada pelo órgão para importação, mas com alguns limitantes, pois há uma quantidade de doses específica para alguns estados e nem toda a população poderá fazer uso dessa vacina, somente pessoas saudáveis, entre 18 e 60 anos, que não possuam hipersensibilidade a nenhum componente do imunizante. Além disso, grávidas, lactantes, mulheres em idade fértil que queiram engravidar nos meses seguintes, pessoas com comorbidades e soropositivas não são candidatas a tomar a vacina. Ainda precisa passar pelos aspectos de qualidade laboratorial do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fiocruz (ANVISA, 2021d).

Por fim, a vacina da *Covaxin*, produzida pela Índia, que faz uso do SARS-CoV-2 inativado, foi aprovada da mesma forma que a vacina russa, além das mesmas restrições, ainda há condições especiais para o modo de fabricação da vacina, que devem, obrigatoriamente, seguir as adequações de Boas Práticas de Fabricação (BPF), com isso, há uma garantia maior da segurança da população, pois independente da urgência que o momento atual pede, os rigores metodológicos e científicos devem sempre ser seguidos para assegurar a integridade da população brasileira (ANVISA, 2021e; ANVISA, 2021f).

#### **4. Considerações Finais**

Diante do apresentado, fica evidente como o uso da biotecnologia está presente na construção de vacinas, além de contribuir para um desenvolvimento mais seguro e eficaz desses imunizantes.

A introdução de novos *designs* de vacinas se mostra mais explícita nos casos de doenças para que nenhuma vacina ou tratamento esteja disponível, especificamente para aquelas que são fatais ou muito debilitantes, como foi evidenciado na pandemia causada pelo SARS-CoV-2. Essa situação gerou uma pressão e uma corrida na comunidade científica para que imunizantes ou tratamentos fossem desenvolvidos mais rapidamente, nesse caso, a existência de tecnologias mais modernas que já estavam sendo pesquisadas e testadas foram essenciais para que em 10 meses a primeira vacina contra a COVID-19 fosse aprovada no mundo, sendo um recorde na criação vacinal.

Além disso, o conhecimento científico e o desenvolvimento tecnológico é enorme, sendo assim, é esperado que continue a crescer de forma exponencial, oferecendo uma gama de novas ferramentas e ideias diferentes para o *design* de vacinas. Dessa maneira, quando se trata de vacina viral, é certo que o mundo entrou na era da vacinologia moderna.

## Referências

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2019. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788595150355/cfi/6/8!/4/2/56/4@0:34.8>. Acesso em: 30 mar. 2021.
- ANDERSON, R. M. The Impact of Vaccination on the Epidemiology of Infectious Diseases. In: BLOOM, B. R.; LAMBERT, P. H. **The Vaccine Book**. USA: Elsevier, 2016. cap. 1, p. 3-32.
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Vacina COVID-19 (recombinante)**. Rio de Janeiro, 2021a. Disponível em: [https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2021/bulas-saiba-mais-sobre-as-vacinas-autorizadas-para-uso-emergencial/bula-vacina-covid-19-recombinante\\_vps\\_001\\_21-01-2021.pdf](https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2021/bulas-saiba-mais-sobre-as-vacinas-autorizadas-para-uso-emergencial/bula-vacina-covid-19-recombinante_vps_001_21-01-2021.pdf). Acesso em: 8 maio 2021.
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Vacinas COVID-19**. Rio de Janeiro, 2021b. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/paf/coronavirus/vacinas>. Acesso em: 23 jun 2021.
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Jassen**. Rio de Janeiro, 2021c. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/paf/coronavirus/vacinas/janssen>. Acesso em: 23 jun 2021.
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Sputnik**. Rio de Janeiro, 2021d. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/paf/coronavirus/vacinas/sputnik>. Acesso em: 23 jun 2021.
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Covaxin**. Rio de Janeiro, 2021e. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/paf/coronavirus/vacinas/covaxin>. Acesso em: 23 jun 2021.
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Anvisa autoriza importação da Covaxin sob condições controladas**. Rio de Janeiro, 2021f. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2021/anvisa-autoriza-importacao-da-covaxin-sob-condicoes-controladas>. Acesso em: 23 jun 2021.
- AZEVEDO, V. *et al.* Main features of DNA-based immunization vectors. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Brasil, v. 32, n. 2, p. 147-153, 1 fev. 1999. DOI <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X1999000200002>.
- BELLIER, B. *et al.* DNA vaccines encoding retrovirus-based virus-like particles induce efficient immune responses without adjuvant. **Vaccine**, United States of America, v. 24, n. 14, p. 2643-55, 24 mar. 2006. DOI [10.1016/j.vaccine.2005.11.034](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.11.034).
- BELLIER, B. *et al.* DNA vaccines expressing retrovirus-like particles are efficient immunogens to induce neutralizing antibodies. **Vaccine**, United States of America, v. 27, n. 42, p. 5772-5780, 25 set. 2009. DOI <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.07.059>.
- BELLIER, B.; KLATZMANN, D. Virus-like particle-based vaccines against hepatitis C virus infection. **Expert Review of Vaccines**, London, v. 12, n. 2, p. 143-54, 9 jan. 2014. DOI <https://doi.org/10.1586/erv.13.10>.

BERG, P.; MERTZ, J. E. Personal Reflections on the Origins and Emergence of Recombinant DNA Technology. **Genetics**, United Kingdom, v. 184, n. 1, p. 9-17, 1 jan. 2010. DOI <https://doi.org/10.1534/genetics.109.112144>.

BLANEY, J. E. *et al.* Antibody Quality and Protection from Lethal Ebola Virus Challenge in Nonhuman Primates Immunized with Rabies Virus Based Bivalent Vaccine. **PLOS Pathogens**, San Francisco, v. 9, n. 5, p. e1003389, 30 maio 2013. DOI [10.1371/journal.ppat.1003389](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003389).

BRAGA, C. J. M. **Pesquisa de novos adjuvantes para vacinas terapêuticas**. 2011. 134p. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

BRASIL. **Resolução RDC nº 9**, de 20 de fevereiro de 2015. Dispõe sobre o Regulamento para a realização de ensaios clínicos com medicamentos no Brasil. Disponível em: [https://mooc.campusvirtual.fiocruz.br/rea/medicamentos-da-biodiversidade/DOU\\_03\\_03\\_2015.pdf](https://mooc.campusvirtual.fiocruz.br/rea/medicamentos-da-biodiversidade/DOU_03_03_2015.pdf). Acesso em: 5 maio 2020.

BRAZ, L. C. C.; GUIMARÃES, D. T.; VAZ, M. R. F. Contribuições da biotecnologia no desenvolvimento e produção de vacinas de primeira, segunda e terceira gerações. **Revista Saúde e Ciência online**, Paraíba, v. 3, n. 3, p. 189-206, 30 dez. 2014. DOI <https://doi.org/10.35572/rsc.v3i3.324>.

BRUM, C. N. *et al.* Revisão narrativa de literatura: aspectos conceituais e metodológicos na construção do conhecimento da enfermagem. *In*: LACERDA, M. R.; COSTENARO, R. G. S. **Metodologias da pesquisa para a enfermagem e saúde: da teoria à prática**. 1 ed. Porto Alegre: Moriá, 2016. p. 77-95.

BOLHASSANI, A.; YAZDI, S. R.. DNA Immunization as an Efficient Strategy for Vaccination. **Avicenna journal of medical biotechnology**, Iran, v. 1, n. 2, p. 71-88, 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3558129/>. Acesso em: 20 out. 2020.

BONANNI, P.; SANTOS, J. I. Vaccine evolution. **Perspectives in Vaccinology**, United States of America, v. 1, n. 1, p. 1-24, 2011. DOI <https://doi.org/10.1016/j.pervac.2011.05.001>.

CAMACHO, L. A. B. **Ensaio Clínicos com vacinas: fases I, II e III e pós-comercialização**. Rio de Janeiro, 2013. Disponível em: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2013/CursoVacinas-LuizCamacho-BRA2013.pdf>. Acesso em: 5 maio 2021.

CALLAWAY, E. The race for coronavirus vaccines: a graphical guide. **Nature**, London, v. 580, p. 576 e 577, 28 abr. 2020. Disponível em: <https://media.nature.com/original/magazine-assets/d41586-020-01221-y/d41586-020-01221-y.pdf>. Acesso em: 8 maio 2021.

CHROBOCZEK, J.; SZURGOT, I.; SZOLAJSKA, E. Virus-like particles as vaccine. **The Journal of the Polish Biochemical Society**, Polish, v. 61, n. 3, p. 531-539, 18 set. 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25273564/>. Acesso em: 21 abr. 2021.

DELVES, P. J. *et al.* **ROITT - Fundamentos de Imunologia**. 13. ed. Rio de Janeiro: GUANABARA KOOGAN, 2018. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788527733885/cfi/6/10!/4/8/2@0:87.1>. Acesso em: 30 mar. 2021.

DINIZ, M. O.; FERREIRA, L. C. S.. Biotecnologia aplicada ao desenvolvimento de vacinas. **Instituto de Estudos Avançados da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 24, n. 70, p. 19-30, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-40142010000300003>.

EFFIO, C. L.; HUBBUCH, J.. Next generation vaccines and vectors: Designing downstream processes for recombinant protein-based virus-like particles. **Biotechnology Journal**, USA, v. 10, n. 5, p. 715-727, 16 abr. 2015. DOI <https://doi.org/10.1002/biot.201400392>.

EHRETH, J.. The value of vaccination: a global perspective. **Vaccine**, USA, v. 21, p. 4105-4117, 1 out. 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(03\)00377-3](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(03)00377-3).

EMA, European medicines agency. **Covid-19 vaccine moderna epar product information**. Europe, jan. 2021a. Disponível em: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/covid-19-vaccine-moderna-epar-product-information\\_pt.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/covid-19-vaccine-moderna-epar-product-information_pt.pdf). Acesso em: 8 maio 2021.

EMA, European medicines agency. **Covid-19 vaccine janssen epar product information**. Europe, mar. 2021b. Disponível em: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/covid-19-vaccine-janssen-epar-product-information\\_pt.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/covid-19-vaccine-janssen-epar-product-information_pt.pdf). Acesso em: 23 jun 2021.

ESTADÃO, O Estado de São Paulo. **Entenda como funciona o processo de desenvolvimento de uma vacina**. São Paulo, 7 abr. 2020. Disponível em: <https://saude.estadao.com.br/noticias/geral,entenda-como-funciona-o-processo-de-desenvolvimento-de-uma-vacina,70003263247>. Acesso em: 5 maio 2021.

EWER, K. J. *et al.* Viral vectors as vaccine platforms: from immunogenicity to impact. **Current Opinion in Immunology**, United States of America, v. 41, p. 47-54, ago. 2016. DOI <https://doi.org/10.1016/j.coi.2016.05.014>.

FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M. de; REIS JUNIOR, F. B. dos. **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. 1. ed. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2011. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/916213/biotecnologia-estado-da-arte-e-aplicacoes-na-agropecuaria>. Acesso em: 18 mar. 2021.

FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz). **Entenda como acontece o estudo clínico de uma vacina**. Rio de Janeiro, 5 nov. 2020a. Disponível em: <https://www.bio.fiocruz.br/index.php/br/noticias/1992-entenda-como-acontece-o-estudo-clinico-de-uma-vacina>. Acesso em: 5 maio 2021.

FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz). **Ensaios clínicos em andamento**. Rio de Janeiro, 2020b. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/vacina-covid-19-ensaios-clinicos>. Acesso em: 5 maio 2021.

GARRONE, P. *et al.* A prime-boost strategy using virus-like particles pseudotyped for HCV proteins triggers broadly neutralizing antibodies in macaques. **Science Translational Medicine**, United States of America, v. 3, n. 94, p. 94ra71, 3 ago. 2011. DOI [10.1126/scitranslmed.3002330](https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002330).

IB (Instituto Butantan). **Ensaios clínicos**. São Paulo, 2020. Disponível em: <https://www.butantan.gov.br/pesquisa/ensaios-clinicos>. Acesso em: 5 maio 2021.

IB (Instituto Butantan). **Vacinas**. São Paulo, 2021a. Disponível em: <https://butantan.gov.br/soros-e-vacinas/vacinas>. Acesso em: 8 maio 2021.

IB (Instituto Butantan). **Vacina adsorvida covid-19 (inativada)**. São Paulo, 23 abr. 2021b. Disponível em: [https://vacinacovid.butantan.gov.br/assets/arquivos/Bulas\\_Anvisa/2021.04.23%20-%20Bula%20profissional%20da%20sa%C3%BAde.pdf](https://vacinacovid.butantan.gov.br/assets/arquivos/Bulas_Anvisa/2021.04.23%20-%20Bula%20profissional%20da%20sa%C3%BAde.pdf). Acesso em: 8 maio 2021.

JAHANAFROOZ, Z. *et al.* Comparison of DNA and mRNA vaccines against cancer. **Drug Discovery Today**, United States of America, v. 25, n. 3, p. 552-560, mar. 2020. DOI <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.12.003>.

JENNINGS, G. T.; BACHMANN, M. F. The coming of age of virus-like particle vaccines. **Biological chemistry**, v. 389, n. 5, p. 521–536, 2008. DOI 10.1515/bc.2008.064.

KARCH, C. P.; BURKHARD, P. Vaccine technologies: From whole organisms to rationally designed protein assemblies. **Biochemical Pharmacology**, United States of America, v. 120, p. 1-14, 15 nov. 2016. DOI <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.05.001>.

KOCH, T.; FATHI, A.; ADDO, M. M. The COVID-19 Vaccine Landscape. In: REZAEI, N. **Coronavirus Disease - COVID-19**. Switzerland: Springer, 2021. cap. 31, p. 549-573.

KRAMMER, F. SARS-CoV-2 vaccines in development. **Nature**, London, v. 586, p. 516–527, 23 set. 2020. DOI <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2798-3>.

KUSHNIR, N.; STREATFIELD, S. J.; YUSIBOV, V. Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: Diversity of targets and production systems and advances in clinical development. **Vaccine**, United States of America, v. 31, n. 1, p. 58-83, 17 dez. 2012. DOI <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.10.083>.

LI, L.; PETROVSKY, N. Molecular mechanisms for enhanced DNA vaccine immunogenicity. **Expert Review of Vaccines**, London, v. 15, n. 3, p. 313-329, 1 jan. 2017. DOI 10.1586/14760584.2016.1124762.

LIMA, E. J. da F.; ALMEIDA, A. M.; KFOURI, R. de À. Vacinas para COVID-19 - o estado da arte. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, Recife, v. 21, n. 1, p. 13-19, 24 fev. 2021. DOI <http://dx.doi.org/10.1590/1806-9304202100s100002>.

LIU, M. A. DNA vaccines: an historical perspective and view to the future. **Immunological Reviews, England**, v. 239, n. 1, p. 62-84, 3 jan. 2011. DOI 10.1111/j.1600-065X.2010.00980.x.

LIU, M. A. A Comparison of Plasmid DNA and mRNA as Vaccine Technologies. **Vaccines**, Switzerland, v. 7, n. 2, p. 37-57, 24 abr. 2019. DOI 10.3390/vaccines7020037.

LE, T. T. *et al.* The COVID-19 vaccine development landscape. **Nature**, London, v. 19, p. 305-306, 9 abr. 2020. DOI <https://doi.org/10.1038/d41573-020-00073-5>.

LEI, X.; CAI, X.; YANG, Y. Genetic engineering strategies for construction of multivalent chimeric VLPs vaccines. **Expert Review of Vaccines**, London, v. 19, n. 3, p. 235-246, 17 mar. 2020. DOI <https://doi.org/10.1080/14760584.2020.1738227>.

LJUNGBERG, K. *et al.* Increased immunogenicity of a DNA-launched Venezuelan equine encephalitis virus-based replicon DNA vaccine. **Journal of Virology**, United States of America, v. 81, n. 24, p. 13412-23, 3 out. 2007. DOI 10.1128/JVI.01799-07.



LOGUNOV, D. Y. *et al.* Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia. **The Lancet**, England, v. 397, n. 10275, p. 671-681, 20 fev. 2021. DOI [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00234-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00234-8).

LUA, L. H. L. *et al.* Bioengineering Virus-Like Particles as Vaccines. **Biotechnology and Bioengineering**, United States of America, v. 111, n. 3, p. 425-440, 20 nov. 2013. DOI [10.1002/bit.25159](https://doi.org/10.1002/bit.25159).

MANCEBO, A. M. *et al.* Vacinas de DNA e RNA recombinante: revisão de literatura. In: CIC - Congresso de Iniciação Científica das FIO – Faculdades Integradas de Ourinhos, 15, 2016, Ourinhos. **Anais do Congresso de Iniciação Científica das FIO**. Brasília: CIC, 2016. Disponível em: [https://cic.unifio.edu.br/anaisCIC/anais2016/pdf/10\\_04.pdf](https://cic.unifio.edu.br/anaisCIC/anais2016/pdf/10_04.pdf). Acesso em: 20 out. 2020.

MCCOLLUM, A. M. *et al.* Poxvirus Viability and Signatures in Historical Relics. **Emerging Infectious Diseases**, USA, v. 20, n. 2, p. 177-184, 3 fev. 2014. DOI: [10.3201/eid2002.131098](https://doi.org/10.3201/eid2002.131098).

MENDEZ, N. *et al.* Encapsulation of adenovirus serotype 5 in anionic lecithin liposomes using a bead-based immunoprecipitation technique enhances transfection efficiency. **Biomaterials**, USA, v. 35, n. 35, p. 9554-61, 22 ago. 2014. DOI [10.1016/j.biomaterials.2014.08.010](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.08.010).

MLECZEK, M. F. *et al.* Messenger RNA-based vaccines with dual activity induce balanced TLR-7 dependent adaptive immune responses and provide antitumor activity. **Journal of Immunotherapy**, United States of America, v. 34, n. 1, p. 1-15, jan. 2011. DOI [10.1097/CJI.0b013e3181f7dbe8](https://doi.org/10.1097/CJI.0b013e3181f7dbe8).

MOHSEN, M. O. *et al.* Major findings and recent advances in virus-like particle (VLP)-based vaccines. **Seminars in Immunology**, United States of America, v. 34, p. 123-132, 1 dez. 2017. DOI <https://doi.org/10.1016/j.smim.2017.08.014>.

MOSER, M.; LEO, O. Key concepts in immunology. **Vaccine**, United States of America, v. 28, n. 3, p. C2-C13, 31 ago. 2010. DOI <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.07.022>.

MOYLE, P. M.; TOTH, I. Modern Subunit Vaccines: Development, Components, and Research Opportunities. **Chemistry Europe**, Europe, v. 8, n. 3, p. 360-376, 11 jan. 2013. DOI <https://doi.org/10.1002/cmdc.201200487>.

MURPHY, K. **Imunobiologia de Janeway**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NABEL, G. J. Designing Tomorrow's Vaccines. **The New England Journal of Medicine**, Massachusetts, v. 368, n. 6, p. 551-560, 7 fev. 2013. DOI: [10.1056/NEJMra1204186](https://doi.org/10.1056/NEJMra1204186).

NARDI, N. B.; TEIXEIRA, L. A. K.; SILVA, E. F. Á. Terapia gênica. **Associação Brasileira de Saúde Coletiva**, Brasil, v. 7, n. 1, p. 109-116, 2002. DOI <https://doi.org/10.1590/S1413-81232002000100010>.

OLIVEIRA, M. A. P. DE; PARENTE, R. C. M. Entendendo Ensaios Clínicos Randomizados. **Brazilian Journal of Videoendoscopic Surgery**, Rio de Janeiro, v. 3, n. 4, p. 176-180, jul. 2010. Disponível em: [https://www.sobracil.org.br/revista/jv030304/bjvs030304\\_176.pdf](https://www.sobracil.org.br/revista/jv030304/bjvs030304_176.pdf). Acesso em: 5 maio 2021.

PARDI, N. *et al.* mRNA vaccines — a new era in vaccinology. **Nature Reviews Drug Discovery**, England, v. 17, p. 261-279, 12 jan. 2018. DOI <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.243>.

PFIZER. **COMIRNATY™ (VACINA COVID-19)**. São Paulo, 20 abr. 2021. Disponível em: [https://www.pfizer.com.br/sites/default/files/inline-files/Comirnaty\\_Profissional\\_de\\_Saude\\_06.pdf](https://www.pfizer.com.br/sites/default/files/inline-files/Comirnaty_Profissional_de_Saude_06.pdf). Acesso em: 8 maio 2021.

PLOTKIN, S. A. Vaccines: past, present and future. **Nature Medicine**, United Kingdom, v. 11, p. 5-11, 5 abr. 2005. DOI <https://doi.org/10.1038/nm1209>.

PULENDRAN, B.; AHMED, R. Immunological mechanisms of vaccination. **Nature Immunology**, United States of America, v. 12, p. 509–517, 18 mai. 2011. DOI <https://doi.org/10.1038/ni.2039>.

QIN, Furong *et al.* A Guide to Nucleic Acid Vaccines in the Prevention and Treatment of Infectious Diseases and Cancers: From Basic Principles to Current Applications. **Frontiers in cell and developmental biology**, Switzerland, v. 21, p. 633776, 25 maio 2021. DOI [10.3389/fcell.2021.633776](https://doi.org/10.3389/fcell.2021.633776).

RESENDE, R. R. **Biotecnologia aplicada à saúde: Fundamentos e Aplicações**. São Paulo: Editora Blucher, 2016. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788521209683/>. Acesso em: 27 Apr 2021.

RIEDEL, S. Edward Jenner and the History of Smallpox and Vaccination. **Baylor University Medical Center Proceedings**, USA, v. 18, p. 21-25, 11 dez. 2017. DOI <https://doi.org/10.1080/08998280.2005.11928028>.

ROCHA, V. C. R. B. **Uso de Nano anticorpos no design de vacinas**. 2012. 49p. Tese (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Curso de mestrado em ciências farmacêuticas, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, 2012.

RODRIGUES, A. F. *et al.* Viral vaccines and their manufacturing cell substrates: New trends and designs in modern vaccinology. **Biotechnology Journal**, USA, v. 10, p. 1329-1344, 24 jul. 2015. DOI <https://doi.org/10.1002/biot.201400387>.

ROLDÃO, A. *et al.* Virus-like particles in vaccine development. **Expert Review of Vaccines**, London, v. 9, n. 10, p. 1149-1176, 9 jan. 2014. DOI <https://doi.org/10.1586/erv.10.115>

SHELLENBACHER, C. *et al.* Efficacy of RG1-VLP Vaccination against Infections with Genital and Cutaneous Human Papillomaviruses. **Journal of Investigative Dermatology**, USA, v. 133, n. 12, p. 2706–2713, 27 jun. 2013. DOI [10.1038/jid.2013.253](https://doi.org/10.1038/jid.2013.253).

SCHLAKE, T. *et al.* Developing mRNA-vaccine technologies. **RNA biology**, United States of America, v. 9, n. 11, p. 1319-1330, 17 set. 2012. DOI [10.4161/rna.22269](https://doi.org/10.4161/rna.22269).

SHEN, H. *et al.* Assembly and immunological properties of a bivalent virus-like particle (VLP) for avian influenza and Newcastle disease. **Virus Research**, United States of America, v. 178, n. 2, p. 430-436, 26 dez. 2013. DOI <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.09.009>.

SHEPPARD, N. C. *et al.* Polyethyleneimine is a potent systemic adjuvant for glycoprotein antigens. **International Immunology**, United Kingdom, v. 26, n. 10, p. 531–538, out. 2014. DOI <https://doi.org/10.1093/intimm/dxu055>.

SOUZA, B. C. P.; MORAES, R. P. Impactos da biotecnologia na produção de transgênicos e no meio ambiente. **Revista Eletrônica da Faculdade de Ceres**, Goiás, v. 6, n. 1, 14 jun. 2017. DOI <https://doi.org/10.36607/refacer.v6i1.3337>.

Sputnik vaccine. **Sputnik V**. Moscou, 8 maio 2021. Disponível em: <https://sputnikvaccine.com/prt/about-vaccine/>. Acesso em: 8 maio 2021.

STRUGNELL, R. *et al.* Vaccine antigens. **Understanding Modern Vaccines: Perspectives in Vaccinology**, United States of America, v. 1, n. 1, p. 61-88, 2011. DOI <https://doi.org/10.1016/j.pervac.2011.05.003>.

TAVARES, F. N. O início do fim da poliomielite: 60 anos do desenvolvimento da vacina. **Revista Pan Amazônica de Saúde**, Pará, v. 6, n. 3, p. 09-11, 1 set. 2015. DOI <http://dx.doi.org/10.5123/S2176-62232015000300001>.

UNICAMP, Faculdade de Ciências Médicas. **Quais são as fases da pesquisa clínica?** São Paulo, 2020. Disponível em: <https://www.fcm.unicamp.br/fcm/cpc-centro-de-pesquisa-clinica/pesquisa-clinica/quais-sao-fases-da-pesquisa-clinica>. Acesso em: 5 maio 2021.

VICENTE, T. *et al.* Large-scale production and purification of VLP-based vaccines. **Journal of Invertebrate Pathology**, United States of America, v. 107, p. S42-S48, jul. 2011. DOI <https://doi.org/10.1016/j.jip.2011.05.004>.

VISCIANO, M. L. *et al.* Generation of HIV-1 Virus-Like Particles expressing different HIV-1 glycoproteins. **Vaccine**, USA, v. 29, n. 31, p. 4903-12, 12 jul. 2011. DOI [10.1016/j.vaccine.2011.05.005](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.05.005).

WATSON, D. J. *et al.* Targeted transduction patterns in the mouse brain by lentivirus vectors pseudotyped with VSV, Ebola, Mokola, LCMV, or MuLV envelope proteins. **Molecular Therapy**, USA, v. 5, n. 5, p. 528-37, mai. 2002. DOI [10.1006/mthe.2002.0584](https://doi.org/10.1006/mthe.2002.0584).

World health organization. **WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard**. Switzerland, 8 maio 2021. Disponível em: <https://covid19.who.int/>. Acesso em: 8 maio 2021.

WOLFF, J. A. *et al.* Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. **Science**, United States of America, v. 247, n. 4949, p. 1465-1468, 23 mar. 1990. DOI [10.1126/science.1690918](https://doi.org/10.1126/science.1690918).

WU, D. T.; ROTH, M. J. MLV based viral-like-particles for delivery of toxic proteins and nuclear transcription factors. **Biomaterials**, United States of America, v. 35, n. 29, p. 8416-8426, set. 2014. DOI <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.06.006>.

YAMEY, G. Ensuring global access to COVID-19 vaccines. **The Lancet**, England, v. 395, n. 10234, p. 1405-1406, 2 maio 2020. DOI [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30763-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30763-7)

YAN, D. *et al.* The application of virus-like particles as vaccines and biological vehicles. **Applied Microbiology and Biotechnology**, United States of America, v. 99, p. 10415-10432, 10 out. 2015. DOI <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7000-8>.

ZHANG, J. *et al.* Progress and Prospects on Vaccine Development against SARS-CoV-2. **Vaccine**, Switzerland, v. 8, n. 2, p. 153-165, 29 mar. 2020. DOI <https://doi.org/10.3390/vaccines8020153>.

ZELTINS, A. Construction and Characterization of Virus-Like Particles: A Review. **Molecular Biotechnology**, United States of America, v. 53, p. 92-107, 24 set. 2012. DOI <https://doi.org/10.1007/s12033-012-9598-4>.