

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
ESCOLA DE QUÍMICA

**Matheus Balthazar Martins Oliveira**



ESTIMATIVA DE DEMANDA E DIMENSIONAMENTO  
DE UMA PLANTA INDUSTRIAL PARA PRODUÇÃO  
DE UMA VACINA CONTRA A COVID-19

RIO DE JANEIRO

2023

Matheus Balthazar Martins Oliveira

ESTIMATIVA DE DEMANDA E DIMENSIONAMENTO DE UMA  
PLANTA INDUSTRIAL PARA PRODUÇÃO DE UMA VACINA CONTRA  
A COVID-19

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Engenheiro de Bioprocessos.

Orientador(es): Leda dos Reis Castilho  
Tulio Macedo Lima

Rio de Janeiro

2023

### CIP - Catalogação na Publicação

048e Oliveira, Matheus Balthazar Martins  
Estimativa de demanda e dimensionamento de uma planta industrial para produção de uma vacina contra a COVID-19 / Matheus Balthazar Martins Oliveira. -- Rio de Janeiro, 2023.  
89 f.

Orientadora: Leda dos Reis Castilho.  
Coorientador: Túlio Macedo Lima.  
Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Bacharel em Engenharia de Bioprocessos, 2023.

1. Dimensionamento de projeto industrial. 2. Estimativa de demanda. 3. Vacina de subunidade proteica. 4. Proteína S. 5. COVID-19. I. dos Reis Castilho, Leda, orient. II. Macedo Lima, Túlio, coorient. III. Título.

Matheus Balthazar Martins Oliveira

TÍTULO DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Engenheiro de Bioprocessos.

Aprovado em 4 de agosto de 2023.

---

Leda dos Reis Castilho, D. Sc., PEQ/Coppe

---

Tulio Macedo Lima, Engenheiro de Bioprocessos, PEQ/Coppe e EPQB

---

José Angel Ramón Hernández, D. Sc., DEB/EQ

---

Tito Livio Moitinho Alves, D. Sc., PEQ/COPPE

Rio de Janeiro  
2023

*À memória de Olinete Ferreira, avó, mãe e ser humano excepcional.*

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, primeiramente, à minha avó, Olinete Ferreira, quem me criou, educou e fez de mim a pessoa que sou hoje, porém, não pôde presenciar este momento.

Ao meus pais, Jacqueline e Luis, por proporcionarem todas as oportunidades que puderam para que eu chegasse até aqui.

À minha orientadora, Leda Castilho, pela confiança, pelo suporte, pelos aprendizados, mas, principalmente, pelo exemplo de paixão e dedicação ao ensino.

Ao meu orientador, Tulio Lima, por toda dedicação em ensinar e ajudar, com quem pude aprender muito.

À Escola de Química e à UFRJ, por proporcionarem o ambiente para troca de conhecimentos, crescimento pessoal e profissional e luta histórica pelo ensino público e de qualidade.

Por fim, aos meus queridos amigos de infância, Gabriel, Jonnas, Julia, Leonardo e Pedro, pela irmandade, companheiros e suporte em todos os momentos da minha vida.

Este trabalho é dedicado a cada um vocês. Obrigado por tudo.

## RESUMO

Balthazar Martins Oliveira, Matheus. **Estimativa de demanda e dimensionamento de uma planta industrial para produção de uma vacina contra a COVID-19**. Rio de Janeiro, 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Bioprocessos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

A pandemia de COVID-19 durou, aproximadamente, três anos e atingiu todos os países de forma avassaladora. Durante todo o período foram registradas mais de 702 mil mortes por COVID-19 no Brasil e mais de 6,9 milhões no mundo todo. Graças aos esforços de diversos setores da sociedade foram desenvolvidas e disponibilizadas, em tempo recorde, vacinas seguras e eficazes contra casos graves da doença. O controle epidemiológico que levou a Organização Mundial da Saúde a decretar o fim da pandemia é fruto do sucesso de todas as campanhas de vacinação primárias e de reforço.

Este trabalho tem como objetivo estimar a demanda por uma nova vacina contra a COVID-19, atualizável para novas variantes, como reforço anual e dimensionar a planta industrial capaz de suprir a demanda projetada a partir do processo produtivo desenvolvido pelo Laboratório de Engenharia de Cultivos Celulares (LECC), COPEE/UFRJ. Para esta nova vacina foi estimada a demanda de 10,9 milhões de doses anuais, para as quais foi dimensionado o processo produtivo a partir de 25 cultivos de células animais recombinantes em bateladas alimentadas em biorreatores single use de 500 L.

**Palavras-chave:** vacina de subunidade proteica; dimensionamento de projeto industrial; COVID-19.

## ABSTRACT

Balthazar Martins Oliveira, Matheus. **Estimativa de demanda e dimensionamento de uma planta industrial para produção de uma vacina contra a COVID-19**. Rio de Janeiro, 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Bioprocessos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

The COVID-19 pandemic lasted approximately three years and hit all countries in an overwhelming way. During the entire period, more than 702,000 deaths from COVID-19 were recorded in Brazil and more than 6.9 million worldwide. Thanks to the efforts of various sectors of society, safe and effective vaccines against severe cases of the disease were developed and made available in record time. The epidemiological control that led the World Health Organization to decree the end of the pandemic is the result of the success of all primary and booster vaccination campaigns.

This work aims to estimate the demand for a new vaccine against COVID-19, updatable for new variants, as an annual booster and to scale the industrial plant capable of meeting the projected demand based on the production process developed by the Laboratory of Engineering of Cell Cultures (LECC), COPEE/UFRJ. For this new vaccine, a demand of 10.9 million annual doses was estimated, for which the production process was scaled for 25 cultures of recombinant animal cells under fed-batches applying single use, 500 L, bioreactors.

**Keywords:** protein subunit vaccine; project scale-up; COVID-19.



## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2.</b>	<b>PANDEMIA DE COVID-19 .....</b>	<b>18</b>
2.1.	COVID-19 .....	19
2.2.	SARS-CoV-2.....	22
2.3.	VARIANTES.....	23
2.4.	HISTÓRICO.....	28
2.5.	PANORAMA ATUAL .....	33
<b>3.</b>	<b>VACINAS .....</b>	<b>36</b>
3.1.	VACINAS UTILIZADAS NO BRASIL .....	38
3.2.	PRINCIPAIS TECNOLOGIAS ENVOLVIDAS .....	41
3.2.1.	<i>Vetor viral não replicante (VVnr), adenovírus</i>	42
3.2.2.	<i>Vírus inativado</i>	42
3.2.3.	<i>RNA mensageiro</i>	43
3.3.	VACINAS EM ESTUDO.....	44
3.4.	VACINAS DE SUBUNIDADES PROTEICAS .....	46
<b>4.</b>	<b>ANÁLISE DE MERCADO E ESTIMATIVA DE DEMANDA .....</b>	<b>48</b>
4.1.	DEMANDA POR VACINAS NO BRASIL.....	48
4.2.	MERCADO DE VACINAS .....	52
<b>5.</b>	<b>PROCESSO E DIMENSIONAMENTO .....</b>	<b>54</b>
5.1.	SISTEMA DE EXPRESSÃO .....	55
5.2.	PROPAGAÇÃO DO INÓCULO .....	56
5.3.	CULTIVO DE CÉLULAS.....	58
5.4.	PURIFICAÇÃO.....	59
5.4.1.	<i>Clarificação</i>	61
5.4.2.	<i>Cromatografia de afinidade</i>	61
5.4.3.	<i>Cromatografia in tandem</i>	65
5.4.4.	<i>Filtração estéril</i>	69
5.5.	PROCESSAMENTO FINAL .....	70
5.6.	TANQUES DE MISTURA .....	71
5.7.	CONSOLIDAÇÃO DO PROCESSO EM LARGA ESCALA .....	71

5.7.1.	<i>Upstream</i>	71
5.7.2.	<i>Downstream</i>	73
5.7.3.	<i>Equipamentos</i>	75
5.7.4.	<i>Consumíveis</i>	76
5.8.	ASPECTOS REGULATÓRIOS .....	77
5.9.	PLANEJAMENTO DA PLANTA INDUSTRIAL .....	80
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>82</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>85</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Esquema da estrutura de SARS-CoV-2 e principais elementos estruturais da proteína S .....	22
<b>Figura 2:</b> Esquema representativo da carga viral da variante D614G.....	25
<b>Figura 3:</b> Genomas de SARS-CoV-2 depositados na plataforma GISAID. Dados referentes aos casos no Brasil.....	26
<b>Figura 4:</b> Novos casos de COVID-19 no Brasil por mês .....	29
<b>Figura 5:</b> Novos óbitos por COVID-19 no Brasil por mês .....	29
<b>Figura 6:</b> Doses de vacinas contra COVID-19 aplicadas por mês no Brasil .....	30
<b>Figura 7:</b> Novos casos de COVID-19 no mundo por mês.....	31
<b>Figura 8:</b> Novos óbitos por COVID-19 no mundo por mês.....	31
<b>Figura 9:</b> Evolução da taxa de letalidade da COVID-19 no Brasil e no mundo .....	32
<b>Figura 10:</b> Vacinas contra COVID-19 mais empregadas no mundo por número de países....	37
<b>Figura 11:</b> Total de doses distribuídas pelo Programa Nacional de Imunizações por imunizante .....	40
<b>Figura 12:</b> Visão geral das diferentes plataformas de vacinas contra a COVID-19 .....	41
<b>Figura 13:</b> Doses de vacinas monovalentes aplicadas por faixa etária .....	49
<b>Figura 14:</b> Representação esquemática do processo <i>upstream</i> .....	72
<b>Figura 15:</b> Representação esquemática do processo <i>downstream</i> .....	73
<b>Figura 16:</b> <i>Layout</i> preliminar da planta produtiva de IFA de vacina .....	81

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Detalhamento da definição de caso por COVID-19.....	21
<b>Tabela 2:</b> Relação de amostras classificadas como VOC pela Organização Mundial da Saúde .....	27
<b>Tabela 3:</b> Principais indicadores epidemiológicos da COVID-19 no Brasil.....	33
<b>Tabela 4:</b> Indicadores da COVID-19, comparativo dos 6 primeiros meses de 2023 .....	34
<b>Tabela 5:</b> Casos, óbitos e taxas de mortalidade e letalidade da COVID-19 no Brasil durante os anos epidemiológicos .....	38
<b>Tabela 6:</b> Candidatas a vacina contra COVID-19 por fase de estudos clínicos .....	44
<b>Tabela 7:</b> Candidatas a vacina contra COVID-19 por plataforma produtiva .....	45
<b>Tabela 8:</b> Doses aplicadas nas campanhas vacinais contra COVID-19 e <i>influenza</i> e projeções populacionais para 2021 e 2022 .....	50
<b>Tabela 9:</b> Cobertura vacinal das campanhas contra COVID-19 e <i>influenza</i> .....	51
<b>Tabela 10:</b> Estimativa da demanda pela vacina durante o período de operação proposto .....	51
<b>Tabela 11:</b> Informações mercadológicas de vacinas contra a COVID-19 .....	53
<b>Tabela 12:</b> Etapas de propagação do inóculo .....	57
<b>Tabela 13:</b> Escalonamento do cultivo de células .....	59
<b>Tabela 14:</b> Escalonamento da clarificação .....	61
<b>Tabela 15:</b> Escalonamento do sistema cromatográfico de afinidade com resina Strep-Tactin® XT .....	63
<b>Tabela 16:</b> Principais soluções por etapa da cromatografia de afinidade (CV = Volume de coluna = 5,8 L) .....	64
<b>Tabela 17:</b> Insumos para cromatografia de afinidade.....	64
<b>Tabela 18:</b> Critério de utilização de HRV 3C na clivagem enzimática.....	65
<b>Tabela 19:</b> Escalonamento do sistema de cromatografia de troca aniônica para cromatografia <i>in tandem</i> .....	66

<b>Tabela 20:</b> Escalonamento do sistema de cromatografia multimodal para cromatografia <i>in tandem</i> .....	67
<b>Tabela 21:</b> Escalonamento do sistema de cromatografia de afinidade para cromatografia <i>in tandem</i> .....	68
<b>Tabela 22:</b> Critérios para definição das vazões operacionais durante a cromatografia <i>in tandem</i> .....	68
<b>Tabela 23:</b> Principais dados do sistema cromatográfico <i>in tandem</i> .....	69
<b>Tabela 24:</b> Processo industrial de filtração esterilizante .....	70
<b>Tabela 25:</b> Estimativas de parâmetros do processo <i>upstream</i> .....	73
<b>Tabela 26:</b> Estimativas dos parâmetros e indicadores do processo <i>downstream</i> .....	74
Tabela 27: Principais equipamentos dimensionados para o processo .....	75
Tabela 28: Principais consumíveis necessários do processo dimensionado e quantidades estimadas para um ano de operação .....	76
<b>Tabela 29:</b> Índice de aprovação por fase em ensaios clínicos .....	79
Tabela 30: Horizonte temporal de etapas de desenvolvimento de uma nova vacina contra a COVID-19 .....	79
<b>Tabela 31:</b> Metragem e classificação das salas para <i>layout</i> da planta produtiva proposta.....	80
<b>Tabela 32:</b> Metragem total e referências de custos para construção de salas limpas .....	81

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACE2	Enzima conversora da angiotensina 2
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BPF	Boas Práticas de Fabricação
COVID-19	<i>Coronavirus disease of 2019</i> (Doença do coronavírus de 2019)
EMA	Agência Europeia de Medicamentos
ESPII	Emergência em Saúde Pública de Importância Internacional
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
GISAID	Iniciativa Global de Compartilhamento de Todos os Dados da <i>Influenza</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ISBL	<i>Inside battery limits</i>
LECC	Laboratório de Engenharia de Cultivos Celulares
MAL	Fluxo de material
mRNA	RNA mensageiro
OD	Oxigênio dissolvido
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAL	Fluxo de pessoas
PBS	Tampão fosfato-salino
PES	Polietersulfona
PNI	Programa Nacional de Imunizações
PVDF	Poli (fluoreto de vinilideno)
RBD	<i>Receptor-binding domain</i> – Domínio de ligação ao receptor
RNA	Ácido ribonucleico

SIM-P	Síndrome inflamatória multissistêmica pediátrica
SARS-CoV-2	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2</i>
SRAG	Síndrome respiratória aguda grave
SUS	Sistema Único de Saúde
UNICEF	<i>The United Nations International Children's Emergency Fund</i>
UTI	Unidade de terapia intensiva
VOC	Variantes de preocupação
VOC-LUM	Linhagens de variantes de preocupação sob monitoramento
VOI	Variantes de interesse
VUM	Variantes sob monitoramento
VVnr	Vetor viral não replicante

## 1. INTRODUÇÃO

Em março de 2020 foi decretado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) o início da pandemia de COVID-19, doença viral causada pelo SARS-CoV-2 e inicialmente identificada em Wuhan, República Popular da China, mas que rapidamente se espalhou para todos os continentes (DONG, E., *et al.*, 2020). O período subsequente foi marcado por uma crise sanitária sem igual para a maior parte das gerações. Milhões de pessoas perderam a vida, sistemas de saúde ficaram sobrecarregados, economias foram duramente impactadas e repercussões sociais podem ser sentidas até os dias de hoje.

A COVID-19 é uma doença respiratória altamente contagiosa, a qual pode manifestar casos leves e moderados, em sua maioria, mas que pode levar a quadros de síndrome respiratória aguda grave (SRAG), levando a pessoa acometida a necessitar de cuidados médicos intensos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021a). Diante deste cenário, pesquisadores de todo o mundo iniciaram uma corrida contra o tempo para o desenvolvimento de vacinas seguras e eficazes contra a COVID-19 em tempo recorde. A partir do trabalho conjunto de centros de pesquisa, governos e agências reguladoras, ainda em 2020 foram iniciadas campanhas de vacinação em 46 países (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2023d).

O fim da pandemia foi decretado pela OMS em maio de 2023, graças ao sucesso das campanhas de vacinação em todo o mundo. Contudo, até esse momento ser alcançado, mais de 6,9 milhões de pessoas perderam a vida para esta doença evitável e mais de 750 milhões de casos foram reportados (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2023d). Apesar da situação controlada, especialistas sugerem que o surgimento de novas variantes mais contagiosas ou capazes de contornar as repostas imunológicas promovidas pelas campanhas de vacinação pode ser apenas uma questão de tempo (ESPÍNDOLA, FULLER, *et al.*, 2023).

É neste cenário que o Laboratório de Engenharia de Cultivos Celulares (LECC), COPPE/UFRJ, desenvolveu uma tecnologia de produção e purificação da proteína S de SARS-CoV-2, responsável pela infecção viral nas células humanas e potencial antígeno para imunizantes (ALVIM, LIMA, *et al.*, 2022). O processo proposto é baseado no cultivo em batelada alimentada de células animais recombinantes, modificadas para a expressão e secreção da proteína S, e nas etapas de purificação as quais permitem a obtenção da proteína de interesse com



o grau de pureza necessário para a produção de um insumo farmacêutico ativo (IFA) da nova vacina contra a COVID-19.

Este trabalho tem como objetivos estimar a demanda para uma nova vacina atualizável e anual contra a COVID-19 e dimensionar a planta industrial para a produção deste novo imunizante. Para tal, serão identificados dados relevantes para a projeção da demanda por uma nova vacina de reforço contra a COVID-19 e, baseado nesta demanda, será feito o dimensionamento dos principais equipamentos que compõem o processo produtivo da vacina proposta, a partir dos dados experimentais obtidos pela equipe do LECC.

Este trabalho está organizado em seis capítulos. No Capítulo 2 será apresentada uma revisão bibliográfica com o panorama da pandemia de COVID-19. No Capítulo 3 serão apresentadas as principais vacinas contra COVID-19 aplicadas até então e um panorama geral daquelas em desenvolvimento. No capítulo 4 serão realizadas a análise de mercado de imunizantes contra a COVID-19 e a estimativa de demanda da vacina proposto neste trabalho. No Capítulo 5 será apresentado o processo produtivo proposto para a vacina e será desenvolvido o dimensionamento do processo industrial responsável por atender à demanda projetada. Por fim, no Capítulo 6 serão apresentadas as conclusões e as sugestões para estudos futuros.

## 2. PANDEMIA DE COVID-19

Em dezembro de 2019, foi detectado um surto de casos daquilo que se acreditou ser pneumonia viral na cidade de Wuhan, na República Popular da China, e reportado à OMS. No início de janeiro de 2020, as autoridades locais confirmaram a identificação do real agente causador do surto de casos de síndrome respiratória, uma nova cepa de coronavírus, e passou-se a tratar a doença como COVID-19. Rapidamente, o surto local havia se espalhado por toda a China e 27 outros países (DONG, E., *et al.*, 2020), atingindo em 11 de março de 2020 a marca de mais de 110.000 casos confirmados globalmente, quando foi decretado o início da pandemia de COVID-19 (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2023d).

No mês de maio de 2023, graças à redução do número de casos proporcionada pelos esforços combinados para controlar a disseminação do vírus, desenvolver vacinas eficazes e seguras e distribuir doses destes imunizantes para a população, foi decretado pela OMS o fim da pandemia de COVID-19 (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE E AMBIENTE, 2023). Contudo, esta batalha deixou severas sequelas para a humanidade como um todo. Em três anos de pandemia, foram confirmados mais de 760 milhões de casos e mais de 6,9 milhões de vidas interrompidas em decorrência da COVID-19 em todo o mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2023d). Outra marca severa da COVID-19 é o efeito que ela é capaz de gerar no longo médio e longo prazo, o qual ainda é alvo de estudos. Meses depois da recuperação, pacientes recuperados dos quadros clínicos de COVID-19, ainda podem apresentar complicações respiratórias, cardiovasculares, neurológicas e renais em decorrência da doença, levando à drástica redução da qualidade de vida do indivíduo (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2023b).

Neste capítulo serão discutidos os principais aspectos da COVID-19, o vírus SARS-CoV-2 e suas variantes. Além disso, será apresentado um panorama geral dos efeitos e sequelas dos três anos de pandemia e as principais discussões acerca da COVID-19 no presente.

## 2.1. COVID-19

A COVID-19, do inglês *corona virus disease*, é a doença causada pelo vírus SARS-CoV-2, a nova cepa de coronavírus identificada no final de 2019 em Wuhan, capital da província de Hubei, China (ANDRADE, DE SOUZA, *et al.*, 2022). Ela é uma doença causadora de síndrome respiratória, com alto grau de transmissibilidade, através de contato direto com pessoas e/ou objetos contaminados e, principalmente, por gotículas respiratórias como, as liberadas por tosse e espirros e aerossóis, que são gotículas diminutas, as quais podem permanecer em suspensão no ar por algumas horas, com o risco de contaminação aumentado em locais fechados e com má circulação de ar (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2020a). Dois fatores que contribuem para a grande propagação da doença são mesmo os pacientes assintomáticos serem capazes de propagar o vírus durante o período de infecção e o início da liberação de vírus, através das vias mencionadas, ocorrer antes do desenvolvimento dos primeiros sintomas, por volta do quarto dia após a infecção.

A maioria dos indivíduos não vacinados contaminados pelo SARS-CoV-2 apresenta um quadro assintomático ou desenvolve apenas os quadros mais leves e moderados da COVID-19, o que corresponde a aproximadamente 80% dos casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021b). Por volta do quinto dia da infecção, os primeiros sintomas começam a surgir e, nestes casos, podem ser observados quadros de perda de olfato e paladar, febre moderada, tosse persistente, coriza, dores de cabeça, de garganta e musculares, fadiga e diarreia durante alguns dias (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2020a). Contudo, no primeiro ano de pandemia já foram relatados casos de indivíduos com sintomas persistentes durante semanas e meses após a infecção pelo SARS-CoV-2 (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2023a).

Quadros graves da COVID-19 são desenvolvidos em aproximadamente 15% dos casos, levando ao desenvolvimento da síndrome respiratória aguda grave, origem do nome do vírus SARS-CoV-2 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021b). Nestes casos, os pacientes podem apresentar desconforto respiratório agudo, pressão persistente no tórax, dificuldades para respirar mesmo em repouso, dores no peito e saturação de oxigênio no sangue abaixo de 95% (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2023a). Estes quadros exigem cuidados especiais com os pacientes, com hospitalização e monitoramento médico constante e suporte de oxigênio.

Quadros críticos da COVID-19 são desenvolvidos em cerca de 5% dos indivíduos não vacinados, levando a complicações clínicas severas como falência respiratória, sepse e choque séptico, pneumonia grave, tromboembolismo e lesões hepáticas ou cardíacas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021b). Nestes casos, há a necessidade de suporte respiratório mecânico e internação em unidades de terapia intensiva (UTI) e estes são os principais quadros relacionados às mortes por COVID-19. Estes casos levaram o mundo a um problema indireto da COVID-19. Por ser uma doença de altíssima transmissibilidade, no primeiro ano acumulou-se um total de 100 milhões de casos (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2023d), o que levou à sobrecarga dos sistemas de saúde de países no mundo todo, impossibilitando o tratamento de outros quadros clínicos de emergenciais.

Com o avançar da pandemia, o aumento crescente do número de casos e a demora até o início da vacinação infantil, apesar da liberação para a reabertura das escolas, foram identificados casos da rara síndrome inflamatória multissistêmica pediátrica (SIM-P). Ela se trata de uma condição associada ao contato de crianças e adolescentes com o SARS-CoV-2 e leva o corpo do paciente a desenvolver um quadro hiperinflamatório. Os efeitos da SIM-P podem ser sentidos em todo o corpo do paciente, podendo causar febre persistente, sintomas gastrointestinais, conjuntivite, inflamações na mucosa e problemas cardiovasculares, podendo levar a criança à morte (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE E AMBIENTE, 2023).

Um dos tópicos mais discutidos em termos de políticas públicas nos primeiros anos da pandemia foi sobre os denominados “grupos de risco”. Apesar da maioria dos casos confirmados de COVID-19 ser de quadros assintomáticos e de sintomas leves, há aqueles grupos que são estatisticamente mais propensos a desenvolver as formas mais graves da doença e, potencialmente, vir a óbito devido a condições fisiológicas em decorrência de idade ou comorbidade e/ou debilidade do sistema imunológico (ANDRADE, DE SOUZA, *et al.*, 2022). Os principais grupos de atenção são os de pessoas acima dos 60 anos e pessoas com algumas condições médicas subjacentes, como respiratórias crônicas, cardiovasculares ou renais, obesidade, diabetes e indivíduos portadores de câncer, imunossuprimidos ou imunodeficientes.

No Brasil, o Ministério da Saúde e as secretarias locais estabeleceram medidas para resposta e enfrentamento da COVID-19 semelhante às adotadas em outros países e de acordo com algumas das orientações da OMS. Entre as medidas indicadas pelo Ministério e pelas secretarias estaduais e municipais, destacam-se a restrição de atividades não essenciais e movimentação de pessoas, distanciamento social, etiqueta respiratória, higienização das mãos, uso de máscaras apropriadas, preferencialmente PFF2 e N95, limpeza e desinfecção de ambientes,

isolamento de indivíduos com suspeita de COVID-19 e com confirmação laboratorial e quarentena de pessoas que tiveram contato estes indivíduos. Todas estas medidas, de maneira integrada, foram adotadas para conter a disseminação de SARS-CoV-2. Em paralelo, incontáveis esforços eram realizados para o desenvolvimento de vacinas seguras e eficazes contra a COVID-19 as quais deveriam, idealmente, ser garantidas à população pelos Estados.

O princípio da pandemia de COVID-19 demandou um esforço inicial muito grande para o desenvolvimento de metodologias e ferramentas de testagem para dar suporte à elaboração de políticas públicas de monitoramento, controle e resposta à situação da pandemia à época. Um grande entrave durante este período foi o fato da maioria dos casos ser da forma assintomática ou leve da doença, pois pessoas infectadas pelo SARS-CoV-2 e capazes de atuar como disseminadores do vírus não apresentavam sintomas ou apresentavam sintomas comuns a outras doenças às quais a população também está exposta. Com isto em mente, o Ministério da Saúde elaborou a metodologia descrita na Tabela 1 para o monitoramento epidemiológico, considerando contato com outras pessoas com os sintomas da COVID-19, desenvolvimento dos sintomas e testagem laboratorial.

**Tabela 1:** Detalhamento da definição de caso por COVID-19

	<p>Teste de Biologia molecular com resultado “Detectável para SARS-Cov-2” *</p> <p>OU</p> <p>Pesquisa de antígeno com resultado “Reagente para SARS-CoV-2” **</p>	Histórico de contato próximo ou domiciliar nos sete dias anteriores ao aparecimento dos sinais e sintomas com caso confirmado para COVID-19
<b>Síndrome Gripal</b>		
Indivíduo com quadro respiratório agudo, caracterizado por pelo menos dois dos seguintes sinais e sintomas: febre (mesmo que referida), calafrios, dor de garganta, dor de cabeça, tosse, coriza, distúrbios olfativos ou distúrbios gustativos.	Caso de COVID-19 confirmado pelo critério laboratorial	Caso de COVID-19 confirmado pelo critério clínico-epidemiológico
<b>Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG)</b>		
Indivíduo com SG que apresenta: dispnéia/desconforto respiratório ou pressão ou dor persistente no tórax ou saturação de O <sub>2</sub> ≤ 94% em ar ambiente ou coloração azulada (cianose) dos lábios ou rosto.	Caso de COVID-19 confirmado pelo critério laboratorial	Caso de COVID-19 confirmado pelo critério clínico-epidemiológico

\*Métodos moleculares RT-PCR em tempo real ou RT-LAMP.

\*\*Método de imunocromatografia para detecção de antígeno.

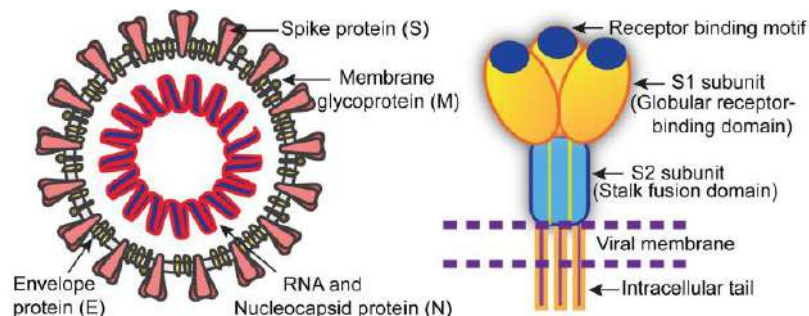
Fonte: SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE E AMBIENTE (2023)

## 2.2. SARS-COV-2

A nova cepa de coronavírus, denominada inicialmente de novo coronavírus ou n-cov, recebeu no início de 2020 o nome de SARS-CoV-2, do inglês *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2*, por ser o segundo dos coronavírus a ser capaz de desenvolver quadros de SRAG em humanos (TURK, TURK, 2020). Os coronavírus são muito comuns no ambiente e grandes causadores de doenças respiratórias. Eles pertencem à família *Coronaviridae*, uma grande família de vírus capazes de infectar diversas espécies animais e, de tempos em tempos, algum destes coronavírus desenvolve a capacidade de infectar seres humanos, como foi o caso com o SARS-CoV, o MERS-CoV e agora com o SARS-CoV-2.

O SARS-CoV 2 é composto por uma cápsula viral formada por quatro proteínas estruturais principais: a proteína do envelope (E), a da matriz (M), a glicoproteína *spike* (S), e a proteína que forma o núcleo capsídeo contendo o genoma viral, constituído por uma única fita de RNA com sentido positivo (MITTAL, MANJUNATH, *et al.*, (2020) e TURK, TURK, (2020)). As principais estruturas constituintes de SARS-CoV-2 podem ser observadas na Figura 1. A proteína S é uma glicoproteína trimérica e transmembranar presente na superfície externa do envelope viral. Ela é composta pelas subunidades S1 e S2 e é responsável por mediar a entrada do vírus nas células alvo (VOLZ, HILL, *et al.*, 2021). Por isso, é um dos principais candidatos em pesquisas de desenvolvimento de imunizantes contra a COVID-19.

**Figura 1:** Esquema da estrutura de SARS-CoV-2 e principais elementos estruturais da proteína S



Fonte: Adaptado de MITTAL, MANJUNATH, *et al.* (2020)

O processo de entrada de SARS-CoV-2 nas células do trato respiratório de humanos se dá através de três principais etapas, a partir da ação da proteína S. O processo se inicia com a interação do domínio de ligação ao receptor (RBD – *receptor-binding domain*) da subunidade S1 com o receptor da enzima conversora da angiotensina 2 (ACE2) que faz parte da composição da membrana das células humanas alvo (MITTAL, MANJUNATH, *et al.*, 2020). Com a interação RBD-ACE2 estabelecida, proteases transmembranares da célula atacam a proteína S, promovendo alterações conformacionais significativas, principalmente na subunidade S2. Por fim, ocorre a fusão do capsídeo à membrana plasmática e a inserção do material genético de SARS-CoV-2 na célula (ARRUDA, LIMA, *et al.*, 2023) que faz parte da composição da membrana das células humanas alvo (MITTAL, MANJUNATH, *et al.*, 2020). Com a interação RBD-ACE2 estabelecida, proteases transmembranares da célula atacam a proteína S, promovendo alterações conformacionais significativas, principalmente na subunidade S2. Por fim, ocorre a fusão do capsídeo à membrana plasmática e a inserção do material genético de SARS-CoV-2 na célula (ARRUDA, LIMA, *et al.*, 2023).

Dada a importância e particularidades da proteína S do novo coronavírus, há dois aspectos que a destacam no estudo e no combate à COVID-19. O primeiro é a maior probabilidade dela ser alvo de mutações que alterem características físico-químicas e estruturais e tornem o vírus mais transmissível ou infeccioso (MITTAL, MANJUNATH, *et al.*, 2020). O segundo é a capacidade da proteína S de estimular uma resposta imunológica eficaz, fato que a levou a ser um dos principais alvos para desenvolvimento de imunizantes contra a COVID-19 (ALVIM, LIMA, *et al.*, 2022).

### 2.3. VARIANTES

Dada a alta transmissibilidade de SARS-CoV-2, em menos de um ano foi atingida a marca dos 100 milhões de casos registrados e, em junho de 2023, já haviam sido confirmados mais de 760 milhões de casos (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2023d). Uma consequência potencialmente grave desta característica é o aumento da probabilidade de mutações que promovam o aumento da patogenicidade e da infecciosidade. Mutações virais são, na maioria dos casos, silenciosas ou mesmo prejudiciais ao patógeno. Contudo, ocasionalmente

pode ocorrer uma mutação capaz de tornar a nova linhagem do vírus um maior risco à população em relação àquela mais prevalente até o dado momento (REDE GENÔMICA FIOCRUZ, 2022).

Por se replicar muito rapidamente e infectar um grande número de pessoas, a ocorrência constante de novas mutações é totalmente esperada com o decorrer do cenário epidemiológico de SARS-CoV-2. Variantes são, portanto, novas linhagens de coronavírus que compartilham um ancestral e apresentam um grupo de mutações em comum, sem o critério de serem benéficas ou prejudiciais ao vírus (REDE GENÔMICA FIOCRUZ, 2022). A falta de medidas claras de contenção à disseminação da COVID-19, a não adesão da população a medidas propostas pelos órgãos governamentais de saúde e a distribuição desigual e lenta das vacinas a partir do momento no qual estiveram disponíveis foram fatores determinantes para o número de casos observados nos dois primeiros anos de pandemia e surgimento de variantes que abalaram todo o mundo (ESPÍNDOLA, FULLER, *et al.*, 2023).

Com o decorrer da pandemia, o aumento incontrolado do número de casos e a promoção de respostas imunes, tanto por infecções anteriores quanto por vacinação, pressões ambientais passaram a ser exercidas sobre o SARS-CoV-2 (ESPÍNDOLA, FULLER, *et al.*, 2023). O estresse evolutivo gerado pode ter sido uma das causas de surgimento de variantes capazes de representar uma nova ameaça significativa à pandemia, com, principalmente, maiores capacidades infecciosas, maiores cargas virais e capacidade de contornar as respostas imunológicas geradas até então (ARRUDA, LIMA, *et al.*, 2023). Para garantir rápidas respostas ao surgimento de novas variantes, grupos de trabalho e institutos de pesquisa foram organizados com o intuito de acompanhar as mutações sofridas pelo SARS-CoV-2 a partir do monitoramento do genoma viral.

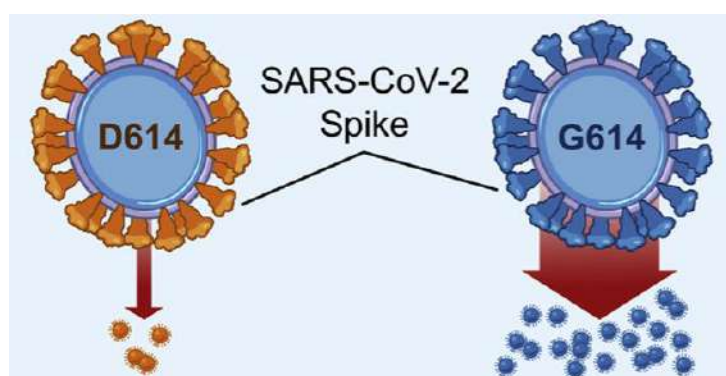
Ainda em 2020, a OMS definiu critérios para a classificação das novas variantes de acordo com o risco que representavam à saúde pública, principalmente em relação à maior transmissibilidade ou capacidade de contornar o sistema imunológico de hospedeiros. Conforme são identificadas novas variantes, elas são classificadas em variantes de preocupação (VOC), variantes de interesse (VOI), variantes sob monitoramento (VUM) ou linhagens de variantes de preocupação sob monitoramento (VOC-LUM) (REDE GENÔMICA FIOCRUZ, 2022). As variantes com mais destaque na mídia geral e especializada ao longo dos últimos anos foram as VOCs, por apresentarem os maiores riscos imediatos à população em geral e por promoverem as maiores mudanças epidemiológicas da COVID-19 durante as conhecidas “ondas” da pandemia.



Os principais critérios para uma nova variante ser classificada como uma VOC é ela representar um maior risco global por ser mais transmissível, ter maior virulência, desenvolver manifestações clínicas mais severas ou de algum modo estar relacionada à diminuição na efetividade de medidas de saúde pública, como as políticas de vacinação. Contudo, para uma variante ser classificada como VOC e, portanto, ser tratada como uma ameaça urgente ao cenário pandêmico posto, ela também deve atender aos critérios de uma variante de interesse. Enquanto VOIs, novas variantes são tratadas como uma possível ameaça à saúde pública, se tornar uma variante prevalente em populações e possuir mutações genéticas capazes de promover os efeitos de maior transmissibilidade, virulência e escape de medidas sanitárias e respostas imunológicas, conforme detalhado anteriormente (REDE GENÔMICA FIOCRUZ, 2022).

Em março de 2020, uma nova linhagem de SARS-CoV-2 começou a ganhar destaque epidemiológico em relação à inicial de Wuhan, a D614G, ao ponto de por certo momento se tornar a variante mais prevalente na Europa (KORBER, FISCHER, *et al.*, 2020). A linhagem D614G, ou 614G, apresenta três principais mutações no RNA do vírus as quais favorecem a entrada nas células do hospedeiro por promover alterações conformacionais na proteína S capazes de tornar a interação RBD-ACE2 mais provável e também estão associadas à promoção de maior carga viral após a infecção, por apresentar replicação aprimorada nas células do trato respiratório, como representado na Figura 2 (VOLZ, HILL, *et al.*, 2021).

**Figura 2:** Esquema representativo da carga viral da variante D614G

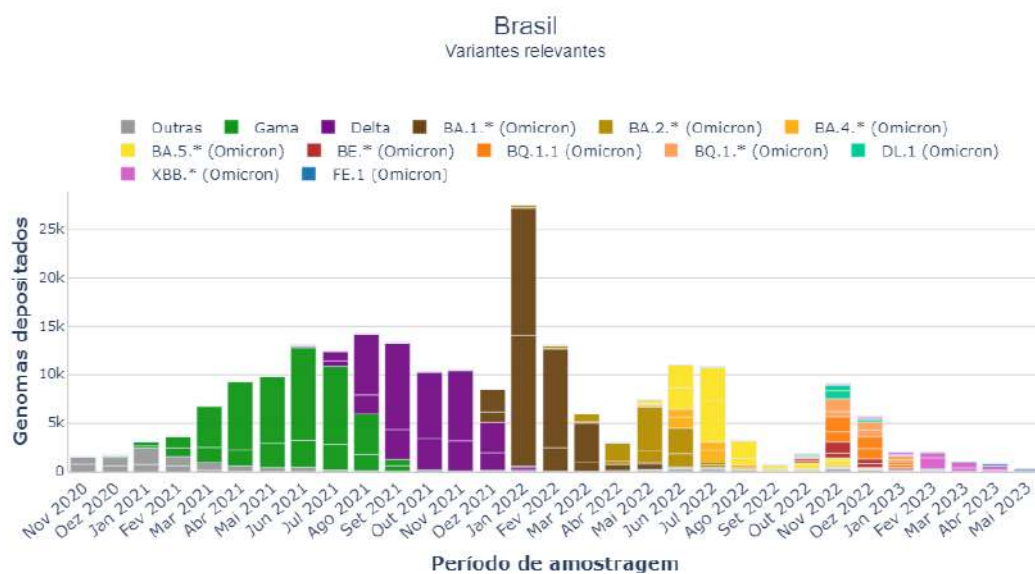


Fonte: Adaptada de KORBER, FISCHER, *et al.* (2020)

Após o surgimento da D614G, foram identificadas algumas VOCs com mutações importantes no sítio RBD, promotoras de maior afinidade ao receptor ACE2, e preocupante capacidade de evasão imunológica, as variantes Alfa (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Gama (P.1), as

conhecidas como linhagens 501Y (ESPÍNDOLA, FULLER, *et al.*, 2023). Contudo, duas principais variantes abalaram o mundo em 2021 e 2022, as variantes Delta e Ômicron. A Figura 3 apresenta o comportamento epidemiológico de SARS-CoV-2 no Brasil, pela perspectiva evolutiva, considerando os genomas coletados e sequenciados pela Rede Genômica Fiocruz e submetidos à iniciativa GISAID, responsável pelo mapeamento de mais de 15 milhões de genomas de SARS-CoV-2 (REDE GENÔMICA FIOCRUZ, 2022).

**Figura 3:** Genomas de SARS-CoV-2 depositados na plataforma GISAID. Dados referentes aos casos no Brasil



Fonte: REDE GENÔMICA FIOCRUZ (2023)

As mutações presentes na D614G relacionadas à maior transmissibilidade foram continuamente observadas em algumas das variantes posteriores a ela e são reconhecidas como mutações D614G. Dentre elas, as principais são as da linhagem 501Y e a VOC Delta (B.1.617.2), responsável pela segunda onda da pandemia no ano de 2021, apresentando a maior transmissibilidade observada até então entre as variantes de SARS-CoV-2. Em novembro de 2021, a variante Ômicron (B.1.1.529) foi classificada pela OMS como VOC e, em 2022, foi responsável pela maior onda em número de casos da COVID-19 vivida em todo o período da pandemia. Em pouco tempo ela superou todas as demais variantes em termos de prevalência entre os casos e, atualmente, é responsável por mais de 98% dos genomas sequenciados e, provavelmente, novas VOCs que surgirem serão a partir de linhagens da Ômicron (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2023).

Desde o surgimento da Ômicron e controle da pandemia a partir das campanhas de vacinação em todo o mundo, as principais novas variantes identificadas foram todas linhagens descendentes da B.1.1.529 (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2023). Deste modo, muitas das outras VOCs supracitadas foram consideradas fora de circulação pela OMS no ano de 2022, como é apresentado na Tabela 2 junto às principais informações de cada uma das variantes de preocupação registradas até o momento.

**Tabela 2:** Relação de amostras classificadas como VOC pela Organização Mundial da Saúde

<b>Nomenclatura OMS</b>	<b>Linhagem Pango</b>	<b>Amostras mais antigas documentadas</b>	<b>Data de classificação VOC</b>	<b>Declarada como não circulante</b>
Alfa	B.1.1.7	Reino Unido, setembro de 2020	18/12/2020	09/03/2022
Beta	B.1.351	África do Sul, maio de 2020	18/12/2020	09/03/2022
Gama	P.1	Brasil, novembro de 2020	11/01/2021	09/03/2022
Delta	B.1.617.2	Índia, outubro de 2020	11/05/2021	Em circulação
Ômicron	B.1.1.529	Múltiplos países, novembro de 2021	26/11/2021	Em circulação

Fonte: Adaptada de REDE GENÔMICA FIOCRUZ (2022)

Em 15 de março de 2023, a OMS alterou os critérios de caracterização de novas variantes de SARS-CoV-2, deixando mais restrita a classificação de VOCs para novas linhagens para as quais grandes intervenções em políticas de saúde pública sejam necessárias (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2023). Isto se deu, principalmente após a supremacia da variante Ômicron em relação às demais, quando a maior parte de VOIs registradas passou a ser de sublinhagens da Ômicron. Com isto, espera-se ter mais clareza para controle da COVID-19 enquanto o mundo vive a iminência do surgimento de variantes com capacidades de superar a resposta imune promovida pelas vacinas aplicadas até o momento.

## 2.4. HISTÓRICO

Desde a identificação do surto de quadros de síndrome respiratória em Wuhan, República Popular da China, em dezembro de 2019, o avanço de SARS-CoV-2 por todo o mundo foi implacável. Em 30 de janeiro, a COVID-19 foi declarada pela OMS uma “Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional (ESPII)”, o mais alto nível de alerta sanitário da organização, com o objetivo de aprimorar a coordenação e cooperação global para conter a propagação do vírus (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS), 2020). Em menos de três meses da identificação dos primeiros surtos, já haviam sido registrados mais de 100.000 casos e 4.000 mortes por COVID-19 (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2020c) e em 11 de março foi decretado o início da pandemia (DONG, E., *et al.*, 2020).

Enquanto outros países já enfrentavam graves surtos, sobrecarga no sistema de saúde e um número de mortes sem precedentes recentes, o Brasil teve algumas semanas para se preparar para a iminente catástrofe até o primeiro caso de COVID-19 ser registrado no dia 26 de fevereiro de 2020 em território brasileiro (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020). Menos de três semanas depois, dia 17 de março, foi reportada a primeira morte por COVID-19 no Brasil, um idoso de 62 anos portador de diabetes e hipertensão (G1 SP, 2020).

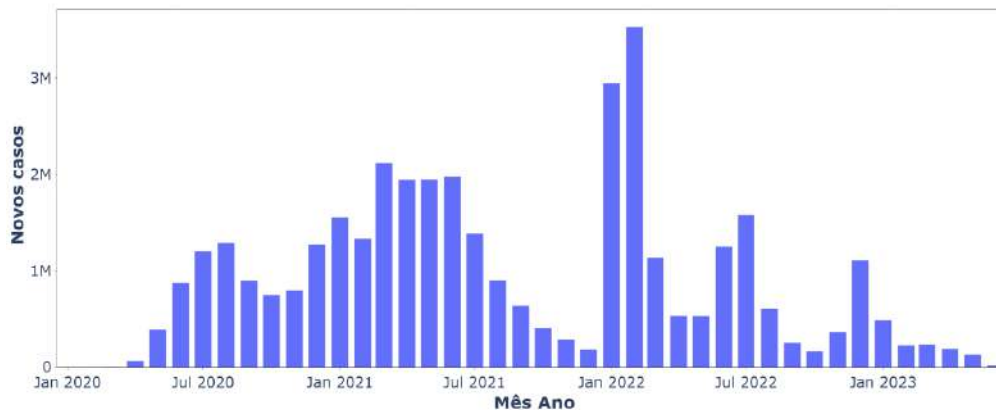
Em resposta à declaração de pandemia dada a situação global da COVID-19, foram interrompidas momentaneamente atividades econômicas não essenciais, a movimentação de pessoas foi desincentivada, pelas agências sanitárias e alguns governos estaduais e práticas de restrições sociais eram promovidas. Estas eram alternativas apontadas por especialistas para controle da disseminação de SARS-CoV-2. Deste modo, seria possível evitar grandes surtos de contaminação e consequente sobrecarga dos sistemas de saúde. Apesar de toda a estrutura de referência mundial do Sistema Único de Saúde (SUS) e centros de pesquisa nacionais, a falta de articulação do Governo Federal para o preparo de uma resposta centralizada para o enfrentamento da COVID-19 é apontado como um dos principais fatores para o terrível cenário que se desenrolou durante a pandemia.

O primeiro ano de pandemia apresentou muitos desafios para a população. Pela falta de imunizantes seguros e eficazes, parte da população seguiu práticas de restrição social ao longo de todo o ano. Escolas e universidades interromperam as aulas ou mudaram para modalidades remotas e muitos negócios adotaram o trabalho remoto, enquanto outros até mesmo foram

fechados. Os impactos sociais e econômicos das restrições foram severos e podem ser sentidos até hoje. Contudo, o impacto naqueles cujos parentes ou amigos não conseguiram sobreviver será sentido para sempre. No primeiro ano ocorreram, só no Brasil, mais de 190.000 mortes por COVID-19 e foram registrados mais de 7,7 milhões de casos (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2023e).

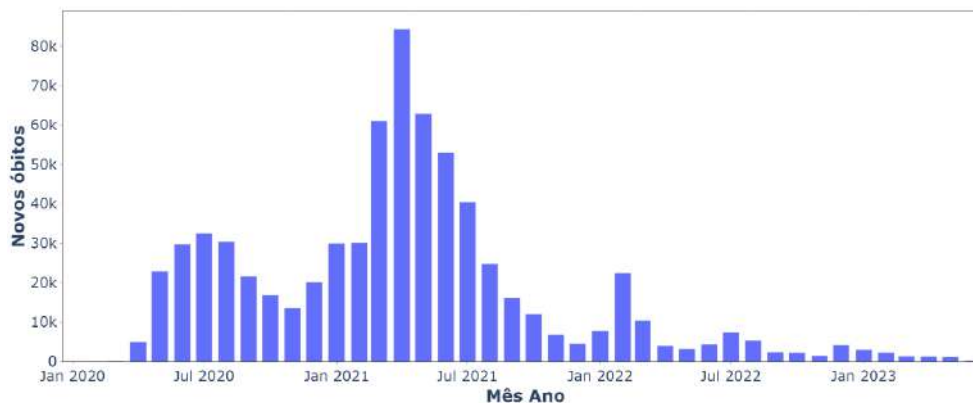
Dada a indisponibilidade de imunizantes seguros e eficazes, a taxa de letalidade da COVID-19 no primeiro ano foi de 2,5%. Contudo, ao ser observada a evolução dos casos e das mortes ao longo do tempo na Figura 4 e na Figura 5, respectivamente, observa-se entre os meses de junho e agosto o maior pico de casos do ano de 2020, durante o qual foi reportada a letalidade de 2,7%.

**Figura 4:** Novos casos de COVID-19 no Brasil por mês



Fonte: Adaptada de WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (2023c)

**Figura 5:** Novos óbitos por COVID-19 no Brasil por mês

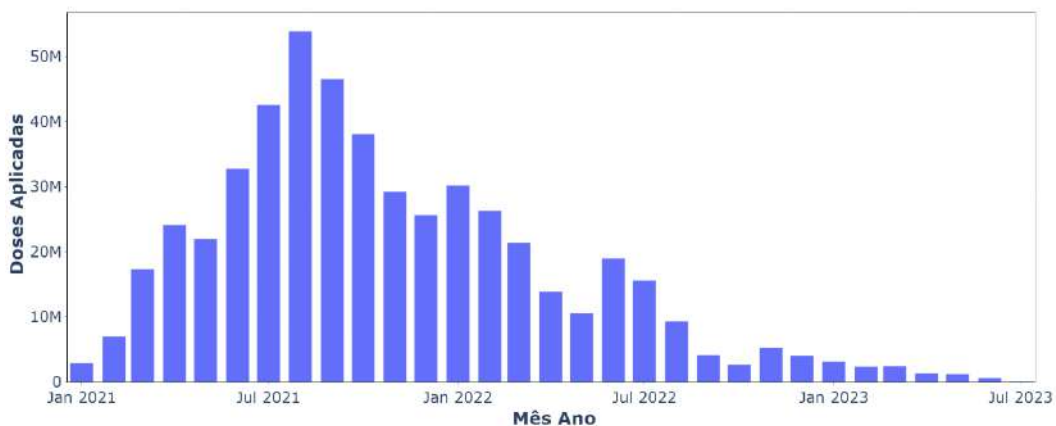


Fonte: Adaptada de WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (2023c)

No começo de 2021, dois fatos concomitantes afetaram o andamento da pandemia. A VOC mais transmissível, Gama, passou a ser a variante mais prevalente de SARS-CoV-2 no Brasil, refletido em um grande aumento do número de casos e, no dia 17 de janeiro, o Brasil passou a ser o 64º país do mundo a aplicar os novos imunizantes contra a COVID-19 (MACHADO, JUNIOR, *et al.*, 2021). Durante o ano de 2021, toda a população brasileira acima dos 18 anos teve a oportunidade de concluir o esquema vacinal primário completo, com vacinas de dose única e duas doses, além de doses de reforço para populações imunossuprimidas.

Contudo, a evolução da vacinação, conforme observada na Figura 6, ocorreu ao mesmo tempo do surgimento de novas variantes de preocupação cada vez mais transmissíveis e infecciosas. A variante Gama, que teve grande destaque nos primeiros meses do ano, rapidamente perdeu espaço para a responsável pela onda de casos observada no meio de 2021, a variante Delta. A emergência inevitável destas novas variantes provocou o pior ano da pandemia para o povo brasileiro. Foram mais de 14,5 milhões de casos e mais de 420.000 mortes por conta da COVID-19.

**Figura 6:** Doses de vacinas contra COVID-19 aplicadas por mês no Brasil



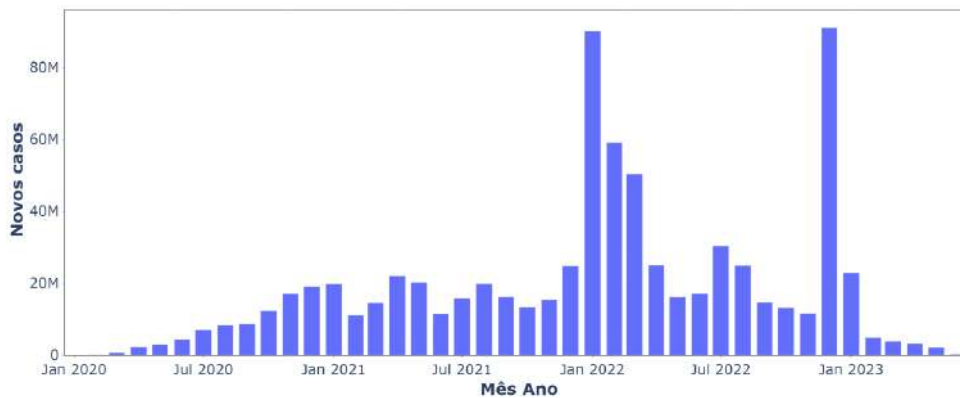
Fonte: Adaptada de MINISTÉRIO DA SAÚDE (2023b)

O ano de 2022 foi um grande marco para a pandemia e, principalmente, para a vacinação. Logo no começo do ano, como discutido na seção anterior, surgiu a VOC Ômicron, a variante mais transmissível entre todas as identificadas até hoje. Esta foi a responsável pelo maior pico de casos registrados durante os três anos de pandemia, com 2,9 e 3,5 milhões de

casos em janeiro e fevereiro, respectivamente. Entretanto, graças aos esforços coletivos em prol das campanhas de imunização, foi atingida a cobertura vacinal de 82% do esquema primário de vacinação e a taxa letalidade foi a menor até então, 0,5% (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE E AMBIENTE, 2023).

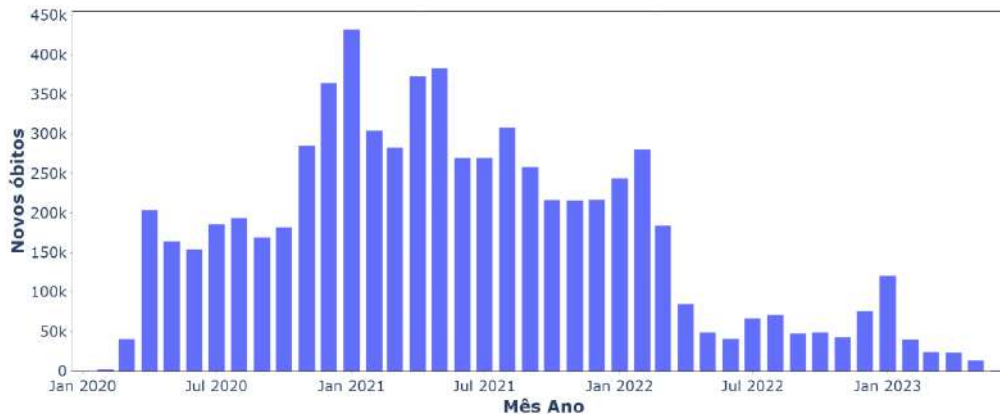
O ano de 2023 começou após o número recorde de 91 milhões casos de COVID-19 no mundo em dezembro de 2022, como apresentado na Figura 7, causado por uma nova linhagem da Ômicron. Contudo, este surto não se estendeu para o ano de 2023 nem foi acompanhado pelo aumento do número de mortes, apresentado na Figura 8, graças ao sucesso das campanhas de vacinação primário e, já à época, de reforço. Por outro lado, este surto não foi sentido no Brasil de forma equivalente, não podendo ser descartada a hipótese da subnotificação de casos.

**Figura 7:** Novos casos de COVID-19 no mundo por mês



Fonte: Adaptada de WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (2023c)

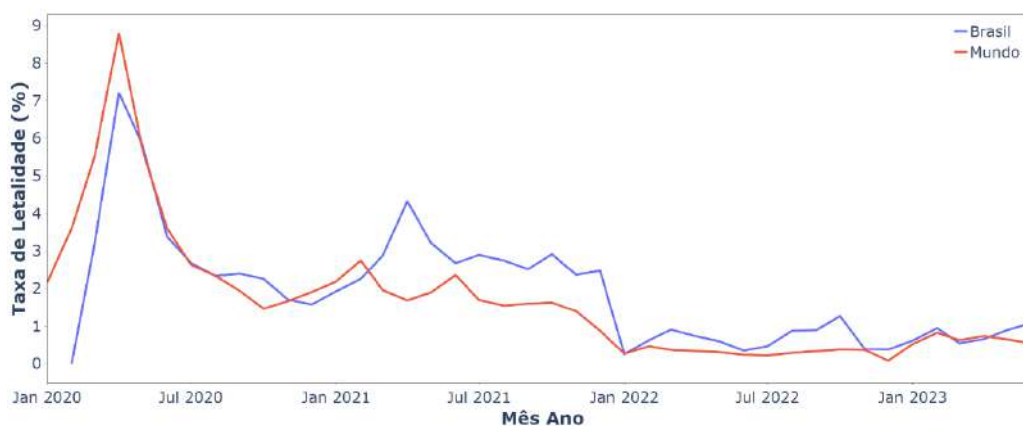
**Figura 8:** Novos óbitos por COVID-19 no mundo por mês



Fonte: Adaptada de WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (2023c)

Com a rápida recuperação do cenário epidemiológico de 2023 após a última onda de casos mencionada, foi declarado pela OMS o fim da pandemia de COVID-19 no mês de maio (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE E AMBIENTE, 2023). Ao longo dos anos de 2022 e 2023, foi observada a redução da taxa de letalidade da doença e manutenção dela em níveis baixos, tanto no Brasil quanto no resto do mundo, conforme apresentado na Figura 9. Graças ao sucesso das campanhas de vacinação, a pressão sobre os sistemas de saúde foi reduzida, o número de mortes diminuiu drasticamente e as atividades econômicas e sociais retornaram à normalidade.

**Figura 9:** Evolução da taxa de letalidade da COVID-19 no Brasil e no mundo



Fonte: Adaptado de WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (2023c)

Apesar dos recentes sucessos registrados no combate à pandemia, os últimos anos deixaram uma marca na história da humanidade a qual não pode ser apagada. De acordo com a OMS (2020c), 6.948.717 pessoas haviam perdido a vida para a COVID-19 até junho de 2023. Este número jamais irá representar a dor enfrentada por milhões de famílias em todo o globo as quais perderam algum ente querido, e a dor delas jamais poderá ser negligenciada.

O controle da COVID-19 é marcado, principalmente, pela redução das taxas de letalidade e hospitalização, os quais podem ser ainda menores que os reportados para o Brasil. A provável subnotificação dos casos, considerando a baixa busca por testagem, reforça esta hipótese (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE E AMBIENTE, 2023). No Brasil, os principais números que representam a luta contra a pandemia estão consolidados na Tabela 3. No momento, o número de casos e mortes encontra-se reduzidos e as taxas controladas, contudo, o histórico foi desastroso. Mais de 700 milhões de pessoas perderam a vida por uma doença



evitável, fato que deixa o Brasil no patamar de segundo país com mais mortes por COVID-19 no mundo e o sexto em número de casos (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2020c).

**Tabela 3:** Principais indicadores epidemiológicos da COVID-19 no Brasil

Métrica	2020	2021	2022	2023*	Acumulado
Casos registrados (milhões)	7,7	14,6	14,0	1,1	37,3
Óbitos por COVID-19	195.725	423.380	74.748	7.980	701.833
Taxa de hospitalização	9,1%	8,3%	1,7%	1,6%	5,8%
Taxa de letalidade	2,50%	2,80%	0,50%	0,60%	0,51%
Doses aplicadas (milhões)	0	342,2	162,5	11,3	516,0

\*Dados até o mês de junho de 2023

Fonte: Adaptada de SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE E AMBIENTE (2023) e MINISTÉRIO DA SAÚDE (2023b)

## 2.5. PANORAMA ATUAL

Graças às campanhas de vacinação primário e de reforço contra a COVID-19 nos anos de 2021, 2022 e 2023, em maio de 2023 foi declarado o fim da Emergência em Saúde Pública de Importância Internacional (ESPII) da COVID-19. Com a publicação deste informe, a OMS indica que a doença não mais é considerada uma emergência global e sim um problema de saúde contínuo e estabelecido (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE E AMBIENTE, 2023), o qual deve ser monitorado e continuamente combatido pelos Estados, principalmente devido à possibilidade constante de surgimento de novas variantes capazes de superar as respostas imunológicas estimuladas pelas vacinas distribuídas até o momento.

Os principais resultados globais que estimularam esta decisão foram: o avanço das campanhas de imunização de reforço; a redução no número de quadros graves, os quais demandam hospitalizações e internações em UTIs; capacidades de infecciosidade e virulência em níveis consistentes das subvariantes Ômicron atualmente em circulação, quando comparadas às de variantes anteriores; e taxa de letalidade mantida baixa e estável. No Brasil, os resultados são consistentes àqueles observados de forma global e são apresentados na Tabela 4 através de um

comparativo dos principais indicadores epidemiológicos de 2023 até o momento e a média dos seis primeiros meses dos anos anteriores.

**Tabela 4:** Indicadores da COVID-19, comparativo dos 6 primeiros meses de 2023

<b>Indicador</b>	<b>Média de 2020 a 2022</b>	<b>2023</b>	<b>Desempenho em 2023</b>
Taxa de incidência por 100 mil hab.	3.522	536	-85%
Hospitalizações de SRAG por COVID-19	398.198	18.541	-95%
Taxa de mortalidade por 100 mil hab.	68	4	-95%
Taxa de letalidade	2,6%	0,7%	-73%

Fonte: Adaptado de SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE E AMBIENTE (2023)

Durante todo o período da pandemia, a maior parte das pessoas que contraíram a doença se recuperaram totalmente. Contudo, quanto mais cresciam os casos de COVID-19, mais eram observadas sequelas e efeitos duradouros causados por ela. Este quadro de sintomas persistentes, por volta de 12 semanas após a recuperação, é tratado como a “COVID longa” ou “condição pós-COVID”. É apontado pela OMS que, em média, 10% a 20% dos indivíduos infectados apresentam sequelas de longo e médio prazo, mesmo após a recuperação do quadro clínico (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2023b). Os sintomas mais prevalentes em casos de COVID longa são perda de olfato e/ou paladar, fadiga, falta de ar, ansiedade e disfunções cognitivas, como confusão, falta de foco ou clareza mental (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2023a). Portanto, controlar os casos de COVID-19 é também controlar os casos de COVID longa, e pode ser feito tanto pelas práticas aplicadas ao longo da pandemia quanto pelo desenvolvimento de imunizantes capazes de combater a transmissão das variantes em circulação.

Casos de SIM-P e COVID longa têm tido grande atenção das autoridades de saúde, contudo, o principal foco em relação à COVID-19 é a iminência do surgimento de novas variantes, associada à eficácia no longo prazo das vacinas aplicadas até o momento. Desde o surgimento da variante Ômicron, evidências da redução da eficácia das vacinas aplicadas frente às novas subvariantes são continuamente reportadas na literatura (ESPÍNDOLA, FULLER, *et al.*,

2023). Este fato é refletido no aumento das contaminações durante diferentes surtos ao longo de 2022 e início de 2023. Contudo, até o momento, é reportada apenas a redução de resposta imune contra a contaminação pelo SARS-CoV-2 e quadros leves da doença, mantendo-se a eficácia no controle dos números de hospitalizações e mortes associados a quadros graves da COVID-19 (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE E AMBIENTE, 2023).

Com o surgimento de novas variantes, o índice de letalidade em crianças aumentou em relação aos anos iniciais da pandemia. Acredita-se que este fenômeno possa ser explicado pela menor capacidade de resposta imunológica, considerando o fato de a campanha de vacinação infantil ser mais recente e contar com poucas doses de reforço. O grupo dos idosos, pessoas com 60 anos ou mais, segue sendo aquele mais afetado pela COVID-19, representando 63% dos casos e 83% dos óbitos registrados em 2023 (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE E AMBIENTE, 2023). É reportado na literatura a redução da meia-vida dos anticorpos IgG anti-proteína S de SARS-CoV-2 estimulado pelas vacinas aplicadas (ESPÍNDOLA, FULLER, *et al.*, 2023).

Como alternativa para o controle da COVID-19, foi iniciada em fevereiro de 2023 a vacinação de reforço com um imunizante bivalente, adaptado para responder também a infecções por novas sublinhagens da variante Ômicron (CHRISTIAN, 2023). Contudo, há grande preocupação entre especialistas e Ministério da Saúde por conta da baixa adesão da população à campanha de reforço com este novo imunizante, tendo apenas 14,87% da população alvo se vacinado até meados de julho (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023b).

Cada uma das discussões propostas neste capítulo converge para a importância do monitoramento e controle da COVID-19. As principais ferramentas para realizá-los são o acompanhamento constante do cenário epidemiológico pelos órgãos responsáveis pelas políticas de saúde pública e o desenvolvimento de imunizantes capazes de responder a rápidas mudanças no cenário da COVID-19, considerando que o surgimento de novas VOCs pode levar a humanidade a enfrentar novos surtos da dimensão e severidade daqueles vividos durante os anos de pandemia. O desenvolvimento de uma plataforma de vacina capaz de ser atualizada para o combate a variantes mais prevalentes, como é a vacina contra *influenza* produzida pelo Instituto Butantan, é uma alternativa promissora para o combate eficaz de uma nova pandemia de COVID-19.

### 3. VACINAS

A velocidade de propagação SARS-CoV-2 desencadeou um nível de emergência que moveu centros de pesquisa em todo mundo para o desenvolvimento intenso e em tempo recorde de uma vacina segura e eficaz contra a COVID-19. No dia oito de abril de 2020, menos de um mês após o início da pandemia, 115 vacinas deram início ao desenvolvimento pré-clínico, enquanto outras cinco já estavam em processo de ensaios clínicos de Fase I (KALINKE, BAROUCH, *et al.*, 2022).

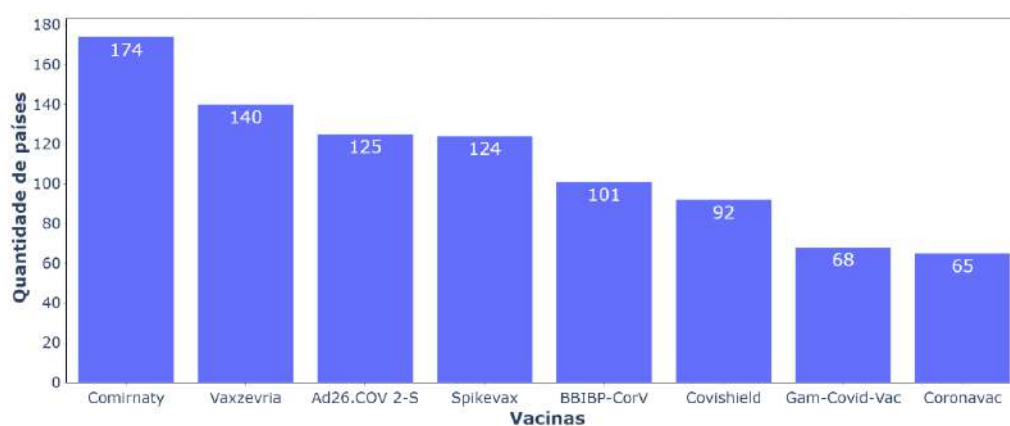
Apesar da agilidade jamais vista no desenvolvimento de um imunizante, o procedimento regulatório vigente não atendia às demandas urgentes de alternativas dada a situação na qual o mundo se encontrava. Com isso, a estadunidense *Food and Drug Administration* (FDA), a Agência Europeia de Medicamentos (EMA) e outros órgãos reguladores adotaram uma nova forma de desenvolvimento contínuo dos ensaios clínicos. Diferentes fases clínicas foram autorizadas a ocorrer paralelamente e as decisões passaram a ser tomadas em tempo real, conforme os dados eram obtidos e divulgados pelos centros de pesquisa e desenvolvimento. Para além deste facilitador, foram emitidas orientações exclusivas para as candidatas a imunizante contra a COVID-19, visando auxiliar e agilizar a estruturação e submissão de relatórios. Através destas atitudes, em dezembro de 2020, 45 países já haviam iniciado a vacinação contra a COVID-19 (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2023d).

A corrida por vacinas ressaltou a importância da parceria entre o conhecimento acadêmico universitário e as empresas detentoras de capital e capacidade produtiva para o desenvolvimento e produção de medicamentos de importância crítica à população. O maior exemplo deste fato é o trabalho conjunto entre o Jenner Institute, vinculado à Universidade de Oxford, e a farmacêutica AstraZeneca, através do qual o corpo de pesquisadores da universidade guiou o desenvolvimento inicial da Vaxzevria e a AstraZeneca usou a sua experiência em desenvolvimento e fabricação de medicamentos em larga escala para garantir a produção das doses a partir da aprovação do imunizante.

Outro fator determinante para a agilidade no desenvolvimento de vacinas eficazes contra a COVID-19 foi a disponibilidade de informações na literatura sobre imunizantes contra causadores de outros surtos de coronavírus, como o SARS-CoV e o MERS-CoV (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023b). Todos estes fatores convergiram para que, em tempo recorde,

vacinas seguras e eficazes contra, principalmente, casos graves da COVID-19 fossem desenvolvidas, aprovadas e distribuídas à população como forma de frear a pandemia. Na Figura 10 são apresentadas as oito vacinas aprovadas e aplicadas em mais países do mundo e, dentre elas, estão os cinco imunizantes distribuídos à população brasileira.

**Figura 10:** Vacinas contra COVID-19 mais empregadas no mundo por número de países



Fonte: WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (2020b)

Até junho de 2023, mais de 13 bilhões de doses de vacinas contra a COVID-19 foram aplicadas em todo o mundo e mais de 5,5 bilhões de pessoas foram vacinadas com pelo menos uma dose de algum dos imunizantes disponíveis (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS), 2020). Tratando-se do Brasil, 89% da população dentro de algum dos critérios de vacinação tomou pelo menos uma das doses disponibilizadas e, no total, foram entregues mais de 514 milhões de doses, incluindo os cronogramas vacinais primário e de reforço (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023b). Todas as vacinas contra COVID-19 foram distribuídas através do SUS de forma gratuita, como parte do Programa Nacional de Imunização (PNI), responsável pela definição e implementação das políticas de vacinação no Brasil (GIURLA MARTINS, 2022).

O sucesso das campanhas de vacinação com as doses primárias e de reforço é observável através da drástica redução das mortes e hospitalizações por COVID-19, conforme apresentado no capítulo anterior. Durante os dois primeiros anos da pandemia foram registrados 88% do total de mortes em decorrência da COVID-19 até junho de 2023. A partir de 2022, quando o PNI iniciou as campanhas de vacinação de reforço e iniciou a campanha de vacinação infantil, a redução dos efeitos letais da doença foi expressiva, conforme apresentado na Tabela 5.

**Tabela 5:** Casos, óbitos e taxas de mortalidade e letalidade da COVID-19 no Brasil durante os anos epidemiológicos

Ano	Casos	Óbitos	Taxa de mortalidade por 100 mil habitantes	Taxa de letalidade
2020	7.716.405	195.725	92,8	2,5%
2021	14.575.102	423.380	201,8	2,8%
2022	14.039.774	74.748	35,6	0,5%
2023	1.156.690	7.980	3,7	0,6%

Fonte: Adaptada de SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE E AMBIENTE (2023)

Neste capítulo serão discutidas as principais vacinas aplicadas na população brasileira, o histórico da vacinação e alguns indicadores das campanhas. A partir disto, serão abordadas as principais tecnologias envolvidas nos imunizantes aplicados e, por fim, as projeções para as futuras campanhas de vacinação a partir dos imunizantes atualmente em desenvolvimento.

### 3.1. VACINAS UTILIZADAS NO BRASIL

A campanha de vacinação contra a COVID-19 no Brasil foi iniciada em janeiro de 2021 com a vacinação de profissionais da saúde e povos indígenas (MACHADO, JUNIOR, *et al.*, 2021). A princípio, foram empregados os imunizantes CoronaVac, da farmacêutica Sinovac, e Covishield/Vaxzevria (ChAdOx1), fruto da parceria entre a farmacêutica AstraZeneca, a Universidade de Oxford, o *Serum Institute of India* (SII) e a Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), para as doses iniciais da campanha vacinal primária. Ainda no início de 2021 foram aprovados os usos das vacinas Comirnaty, Pfizer-BioNTech, e Ad26.COV 2-S, Janssen Pharmaceuticals, que também foram empregadas no esquema vacinal primário. (ESPÍNDOLA, FULLER, *et al.*, 2023).

Produzida a partir da parceria entre a Sinovac e o Instituto Butantan, a CoronaVac foi aprovada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e liberada para uso a partir do dia 17 de janeiro de 2021. Ela utiliza enquanto antígeno o vírus inativado obtido através do cultivo de células Vero. No relatório apresentado, foi indicado que um esquema vacinal de duas

doses em um intervalo de 14 dias apresenta eficácia de 51% contra infecções e desenvolvimento de quadros leves da COVID-19 e é capaz de proteger totalmente contra casos graves e evitar a necessidade de hospitalizações e internações em UTIs a partir do décimo quarto dia dias após o recebimento segunda dose. Foi reportada a redução da eficácia dela diante da nova variante Ômicron para 49,6% - contudo, ainda representa uma alternativa viável ao esquema vacinal de reforço (ESPÍNDOLA, FULLER, *et al.*, 2023).

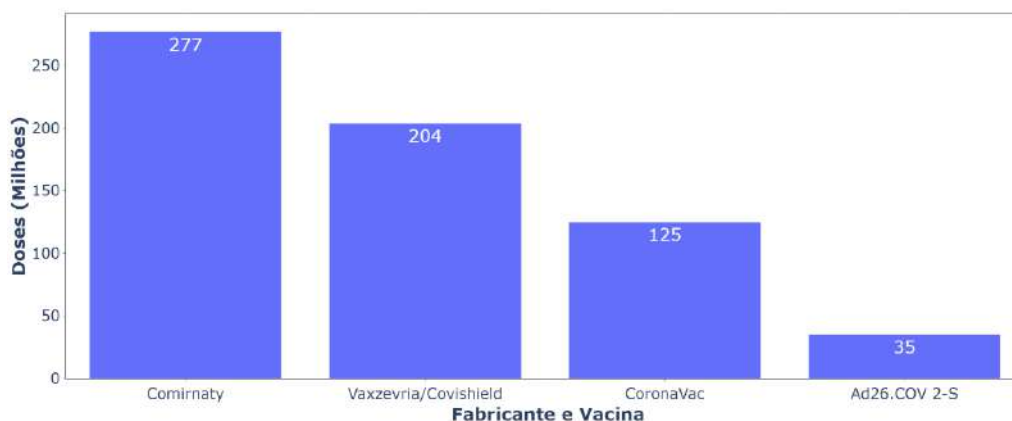
Proveniente da parceria entre a farmacêutica AstraZeneca e a Universidade de Oxford, a vacina Vaxzevria foi desenvolvida baseada no uso de vetores virais não replicantes (VVnr) de SARS-CoV-2, com a eficácia reportada de 82,4% contra a infecção e casos leves de COVID-19 e proteção total contra os casos graves (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2022b). Ela teve o uso e distribuição aprovados pela Anvisa também dia 17 de janeiro de 2021 a partir da parceria firmada com contrato de transferência de tecnologia entre a farmacêutica e a Fiocruz. Inicialmente, o imunizante foi formulado e envasado pela Fiocruz a partir do IFA enviado ao Brasil pelo SII, sob o nome de Covishield, uma vacina igual à Vaxzevria distribuída na Europa e América do Norte, porém, com o IFA advindo de outro centro de distribuição parceiro da AstraZeneca. Em outubro de 2022 foi aprovado o uso do imunizante 100% produzido e formulado pela Fiocruz, após conclusão do contrato de transferência de tecnologia, o qual é a versão atualmente distribuída para as campanhas de vacinação de reforço (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022a).

Em 23 de fevereiro de 2021 foi aprovado o uso da vacina baseada em mRNA responsável pela expressão da proteína S, a Comirnaty (BNT162b2), imunizante desenvolvido através da parceria entre a estadunidense Pfizer e a alemã BioNTech, com distribuição iniciada em 3 de maio de 2021. No relatório submetido à Anvisa foi reportada a eficácia de 95% contra a infecção sintomática pelo SARS-CoV-2 (ESPÍNDOLA, FULLER, *et al.*, 2023). Atualmente é distribuída uma nova versão da vacina, agora bivalente, otimizada para combater casos de infecção da nova variante Ômicron, com mais de 25 milhões de doses de reforço distribuídas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023b).

Dentre os imunizantes disponibilizados pelo SUS, a vacina Adv26.COV 2-S desenvolvida pela Janssen Pharmaceuticals foi a última a ter a aprovação para uso concedida, com distribuição iniciada em 23 de junho de 2021. Ela foi elaborada também a partir da tecnologia de VVnr. Inicialmente foi proposta como uma vacina de dose única, porém, foi reportada a redução da eficácia contra casos leves da COVID-19 para 50% após dois meses da aplicação. Com o reforço de uma segunda dose em um intervalo de 2 meses, uma eficácia de 94% foi reportada

(WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2022a). Contudo, ela foi a vacina com menos doses distribuídas a partir do PNI, conforme observado na Figura 11.

**Figura 11:** Total de doses distribuídas pelo Programa Nacional de Imunizações por imunizante



Fonte: DEPARTAMENTO DE MONITORAMENTO (2021)

As crianças de 5 a 11 anos foram incluídas no Plano de Operacionalização da Vacinação Contra a Covid-19 apenas no dia 5 de janeiro de 2022, com início da campanha de vacinação dia 14 de janeiro (MARIANA GARCIA, LARA PINHEIRO, 2022). Em 29 de dezembro do mesmo ano foi autorizado o início da vacinação de crianças de 6 meses até 5 anos de idade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022c). O plano vacinal das crianças foi iniciado com grupos prioritários de crianças portadoras de comorbidades ou deficiências permanentes, posteriormente crianças de comunidades indígenas e quilombolas e aquelas que moram em lares com pessoas pertencentes a grupos prioritários e, por fim, crianças sem comorbidade.

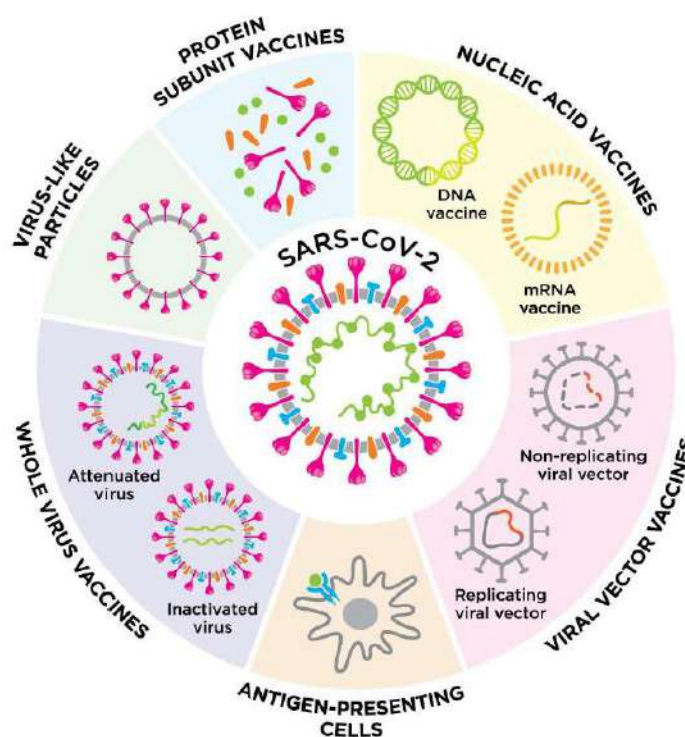
De acordo com o proposto pelo PNI para a vacinação de reforço, é recomendado que seja aplicado um esquema vacinal heterólogo. Baseado em relatórios da literatura, há redução dos níveis de anticorpos IgG anti SARS-CoV-2 com o tempo, promovendo a diminuição da eficácia das vacinas aplicadas mesmo contra quadros leves da COVID-19. Contudo, a adoção de um esquema vacinal de reforço com imunizantes baseados em plataformas diferentes das doses recebidas durante o esquema primário é capaz de gerar respostas imunológicas positivas e duradouras nos indivíduos (ESPÍNDOLA, FULLER, *et al.*, 2023).



### 3.2. PRINCIPAIS TECNOLOGIAS ENVOLVIDAS

Diversas plataformas tecnológicas foram abordadas durante o desenvolvimento de candidatas a vacinas contra a COVID-19, algumas delas podem ser observadas na Figura 12. Contudo, a maioria dos imunizantes aprovados utilizam umas destas plataformas: vírus inativado, vetor viral não replicante (adenovírus) e RNA mensageiro (mRNA) (ESPÍNDOLA, FULLER, *et al.*, 2023). Apesar de cada uma das vacinas apresentar uma eficácia própria na prevenção da doença, todas são eficazes na prevenção de casos graves e foram fundamentais para a redução da letalidade da COVID-19 conforme explicitado anteriormente.

**Figura 12:** Visão geral das diferentes plataformas de vacinas contra a COVID-19



Fonte: Adaptada de KUDLAY, SVISTUNOV (2022)

Nesta seção serão detalhadas as plataformas tecnológicas de produção das principais vacinas distribuídas no Brasil.

### 3.2.1. Vetor viral não replicante (VVnr), adenovírus

A plataforma de VVnr para a produção de vacinas é estudada há mais de 20 anos e apresenta capacidade de induzir respostas imunes fortes e duradouras (KUDLAY, SVISTUNOV, 2022). O vetor viral consiste em um fragmento do material genético do vírus de interesse, sem a capacidade de autorreplicação ou atividade viral, protegido por capsídeo. No caso das vacinas de VVnr contra a COVID-19, o vetor produzido carrega o fragmento de RNA responsável pela expressão da proteína S de SARS-CoV, o qual será utilizado pelo aparelho celular para expressão da proteína S e estímulo ao desenvolvimento de resposta imunológica contra o antígeno.

Dentre as vacinas aplicadas no Brasil, a Ad26.COV 2-S é um dos exemplos que empregam esta tecnologia. No caso dela, o processo definido pela fabricante foi inspirado na bem sucedida plataforma de produção AdVac<sup>®</sup>, empregada na produção da vacina contra Ebola (Zabdeno/Mvabea) (KALINKE, BAROUCH, *et al.*, 2022). Diferentes de outras vacinas as quais empregam a mesma tecnologia, todos os imunizantes contra COVID-19 baseados em VVnr seguiram esquemas vacinais iniciais com duas doses, com exceção da Ad26.COV 2-S e da Sputnik-Light, antes de serem consideradas as doses de reforço nas políticas de vacinação.

Apesar de bem estabelecida, a produção de vacinas baseada na expressão de vetores virais apresenta um entrave muito significativo em termos de controle de qualidade. Por se tratar da expressão de vírus contendo o material genético de interesse em grande escala, o processo apresenta elevado risco de mutações dos vetores. Para a garantia da integridade do imunizante, o monitoramento da qualidade deve ser constante.

### 3.2.2. Vírus inativado

A plataforma de vírus inativados talvez seja a mais bem estabelecida na área de produção de vacinas. Nela é empregado como antígeno o vírus causador da doença, replicado em um hospedeiro, como células animais ou ovos embrionados, e, posteriormente, inativado por meios físicos ou químicos, de modo que a estrutura dos vírus seja mantida, contudo, não sejam capazes de provocar quadros clínicos ou mesmo se replicar no corpo da pessoa vacinada. Como a pessoa

recebe integralmente o vírus com a aplicação das doses, o corpo responde da mesma maneira a qual faria durante um processo infeccioso, porém sem o desenvolvimento de um quadro clínico ou excesso de carga viral. Então, de maneira segura, é feito o reconhecimento do antígeno e a preparação do sistema imunológico passa para o caso de futuras infecções.

Segundo KUDLAY, SVISTUNOV, (2022) esta plataforma demanda um processo produtivo simples e de rápida implementação. Contudo, o controle de cada lote deve ser minucioso, pois, caso o processo de inativação viral não seja bem sucedido, a distribuição das vacinas pode gerar surtos de infecção na população. Outro ponto importante observado nas vacinas contra a COVID-19 é que as vacinas de vírus inativados demonstraram gerar imunogenicidade um pouco baixa contra a infecção de SARS-CoV-2 em comparação com as vacinas de outras plataformas.

Quanto à menor imunogenicidade, isto pode trazer menor eficácia na contenção do vírus e dificultar o controle do surgimento de novas variantes. Por outra perspectiva, essas vacinas são as mais indicadas para pacientes com o sistema imunológico comprometido, devido ao fator mais significativo da definição do imunizante para este grupo ser o risco de reações adversas.

### **3.2.3. RNA mensageiro**

A plataforma de RNA mensageiro (mRNA), empregada na vacina Comirnaty, é a mais recente para o desenvolvimento de imunizantes. Nos anos anteriores à pandemia de COVID-19, apesar de intensos estudos empregando-a, nenhuma das candidatas a novas vacinas havia avançado para a etapa de ensaios clínicos. O mecanismo de ação delas é baseado na entrega de material genético responsável por codificar fragmentos do vírus com capacidade imunogênica. Com a produção das proteínas virais pelas células do indivíduo, o sistema imunológico passa a reconhecer o antígeno e dá seguimento ao processo de resposta (KUDLAY, SVISTUNOV, 2022).

Há dois tipos de tecnologias mRNA para a produção de vacinas. A primeira é baseada apenas na entrega do material genético para que as próprias células da pessoa vacinada realizem a replicação e expressão das proteínas. A segunda é baseada em fitas de mRNA com capacidade de autorreplicação pela introdução da sequência nsP1-4 da proteína de alfavírus à fita original.

Esta segunda tecnologia contorna a necessidade do processo de transcrição e simplifica a produção dos antígenos, contudo, empregar este processo demandaria um tempo maior de estudos o qual não seria compatível à urgência da pandemia (KUDLAY, SVISTUNOV, 2022).

A principal desvantagem desta plataforma é a labilidade do mRNA. São previstos grandes desafios na manutenção da integridade das doses até o momento da aplicação e para manter o antígeno íntegro até que seja assimilado pelo sistema imunológico do indivíduo vacinado e promova o efeito desejado. As principais soluções empregadas foram o emprego de nucleosídeos modificados na estrutura do mRNA para aumentar a estabilidade do material genético, a incorporação de nanopartículas lipídicas para melhor entrega agente e a elaboração de cadeias de suprimento capazes de atender às necessidades de armazenamento e transporte dos imunizantes baseados em mRNA.

### 3.3. VACINAS EM ESTUDO

Foi publicado em março de 2023 um relatório da OMS com análises candidatas a novas vacinas contra a COVID-19 atualmente em fase de pré-clínicos e clínicos. Neste relatório são avaliadas 382 candidatas das quais 48% estão em fases de ensaios clínicos e 68 delas estão, atualmente, nas fases II e III, as mais avançadas para obtenção de aprovação regulatória perante os órgãos responsáveis (R&D BLUE PRINT, 2023). A distribuição das candidatas a imunizantes encontra-se descrita na Tabela 6 por fase do desenvolvimento. Há, portanto, o forte indicativo de que, num futuro próximo, novas opções de imunizantes estarão disponíveis no mercado com plataformas potencialmente inovadoras.

**Tabela 6:** Candidatas a vacina contra COVID-19 por fase de estudos clínicos

<b>Fase de estudos clínicos</b>	<b>Número de candidatas em estudos clínicos</b>
Fase 1	54
Fase 1/2	33
Fase 2	15

<b>Fase de estudos clínicos</b>	<b>Número de candidatas em estudos clínicos</b>
Fase 2/3	18
Fase 3	50
Fase 4	11

Fonte: Adaptado de R&D BLUE PRINT (2023)

Também são apresentados detalhes em relação às plataformas empregadas na produção de cada uma das candidatas avaliadas. Dentre as cinco principais plataformas em número de candidatas, as plataformas discutidas neste capítulo seguem relevantes. Contudo, há grande destaque para vacinas de subunidade proteica dentre as candidatas, conforme é demonstrado na Tabela 7.

**Tabela 7:** Candidatas a vacina contra COVID-19 por plataforma produtiva

<b>Plataforma</b>	<b>Candidatas à vacina</b>	<b>Candidatas à vacina (%)</b>
Subunidades proteicas	59	32%
Vetor viral não replicante	25	14%
DNA	17	9%
Vírus inativado	22	12%
RNA	43	24%
Vetor viral (replicante)	4	2%
Partículas semelhantes a vírus	7	4%
Vetor viral replicante + Células de antígenos	2	1%
Vírus atenuado	2	1%
Vetor vital não replicante + Células de antígenos	1	1%
Antígeno bacteriano - expressão de vetores	1	1%

Fonte: Adaptado de R&D BLUE PRINT (2023)

### 3.4. VACINAS DE SUBUNIDADES PROTEICAS

O uso de subunidades de proteínas virais como antígeno vacinas contra doenças virais é uma tecnologia com muito potencial e apresenta exemplos de sucesso atualmente em distribuição. Vacinas contra as hepatites B e C, *influenza*, coqueluche e papilomavírus humano são atualmente produzidas empregando esta tecnologia e apresentam campanhas de vacinação muito bem sucedidas. Esta plataforma é baseada na expressão de proteínas, fragmentos de proteínas ou conjuntos proteicos de vírus causadores de doenças infecciosas para serem empregadas como antígenos (KUDLAY, SVISTUNOV, 2022).

Vacinas de subunidades proteicas apresentam três pontos favoráveis em relação às outras plataformas discutidas: por não carregar componentes vivos e infecciosos do vírus, elas são incapazes de estimular o desenvolvimento de quadros clínicos, são relativamente estáveis, principalmente quando comparadas às vacinas de mRNA e são seguras para aplicação em pessoas imunossuprimidas. Contudo, elas apresentam alguns percalços para o desenvolvimento. Os principais são a grande dificuldade para definir a proteína capaz de gerar a melhor resposta imunológica possível, a complexidade na produção e a necessidade de adjuvantes para entrega eficiente da proteína e estímulo da resposta desejada (KUDLAY, SVISTUNOV, 2022).

Em vacinas contra a COVID-19 baseadas nesta plataforma é usado como antígeno, principalmente, a altamente glicosilada proteína S de SARS-CoV-2 ou domínio de ligação ao receptor de ACE2 da subunidade S1, protagonistas do processo de infecção de SARS-CoV-2 (KUDLAY, SVISTUNOV, 2022). Esta escolha se dá pela elevada capacidade de geração de resposta imune específica, tanto contra o SARS-CoV-2 quanto contra a variante à qual a proteína pertence, apresentadas por elas. Para a expressão de proteínas complexas, como é o caso da proteína S e da subunidade dela, com altos níveis de glicosilação, se faz necessário o cultivo em células animais recombinantes, pois elas possuem todo o maquinário celular adequados aos processos pós-traducionais necessários para este tipo de vacinas (BUTLER, 2008).

Dada a atual conjuntura da COVID-19, o uso de subunidades proteicas enquanto antígeno apresenta um benefício primordial, a adaptabilidade. Como discutido no Capítulo 1 deste trabalho, o principal ponto de preocupação da OMS, de governos e de pesquisadores é o surgimento de novas variantes de SARS-CoV-2 com mecanismos para superar as defesas promovidas pelas vacinas distribuídas. Contudo, como discutido, a proteína S é o alvo mais provável de

mutações capazes de afetar a virulência e escape imunológico de SARS-CoV-2. Logo, vacinas que se aproveitem da especificidade desta glicoproteína e possam ser atualizadas para responder a emergências sanitárias de forma rápida e eficiente são promissoras alternativas para o controle da COVID-19 no longo prazo.

#### 4. ANÁLISE DE MERCADO E ESTIMATIVA DE DEMANDA

A análise de mercado é uma etapa fundamental para qualquer novo projeto. É através dela que é possível identificar os principais agentes do mercado, mapear o público-alvo para o qual o produto será direcionado, estimar a demanda pelo novo produto a partir das características do mercado em questão e entender o cenário existente, identificando os potenciais concorrentes, as principais tendências e o ambiente de preços existente.

Com uma análise baseada em dados concretos, oportunidades de mercado podem ser encontradas, adequações no produto podem ser propostas e otimizações no processo podem ser avaliadas. Desta forma, é possível desenvolver um projeto economicamente. Também é por meio dessa análise que pode ser realizada a estimativa de demanda de um produto e, consequentemente, pode ser definida a capacidade produtiva de uma planta para manufatura do referido produto.

Neste capítulo foi projetada a demanda da população brasileira de crianças e idosos por vacinas contra a COVID-19. Para isto, foi feito o estudo das demandas pela vacina anual contra a *influenza* e pelas vacinas atualmente disponíveis contra a COVID-19.

##### 4.1. DEMANDA POR VACINAS NO BRASIL

Para realizar as estimativas da demanda pelo imunizante, foram realizadas avaliações da demanda de produtos com características similares. Foram utilizados os dados de vacinação das campanhas vacinais de 2021 e 2022 contra *influenza* e das campanhas vacinais contra a COVID-19 durante o período de pandemia, todos disponibilizados pelo Ministério da Saúde. Para as estimativas da demanda futura foram utilizados os dados de projeção populacional publicados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). (Justificar que

Para o desenvolvimento deste trabalho, foram consideradas como premissas do projeto a vacina ser capaz de atender 20% da demanda brasileira total de vacinas contra a COVID-19 para o público de crianças e idosos e uma dose de reforço aplicada anualmente, seguindo o mesmo protocolo proposto pela OMS para as vacinas contra a *influenza*. O objetivo de 20% da



demanda para este grupo foi selecionado pois uma vacina de subunidade proteica como a proposta é uma das melhores alternativas para imunização do público alvo, visto que crianças têm o sistema imunológico ainda em formação e idosos mais enfraquecido.

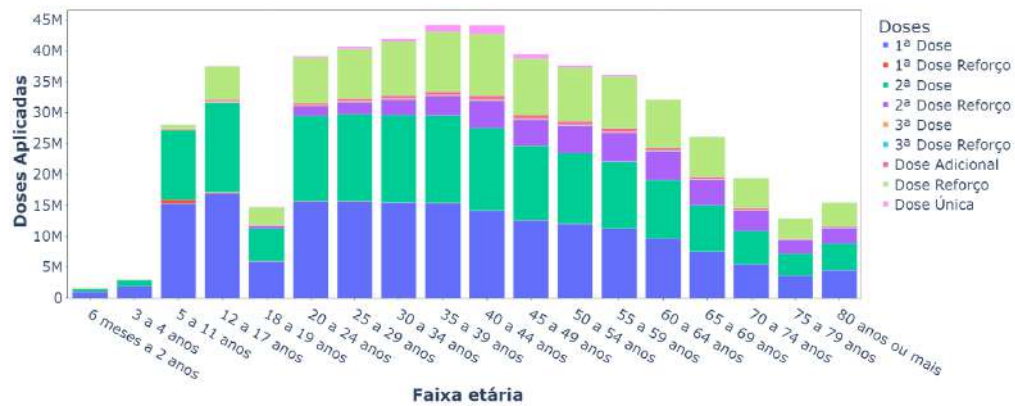
A nova vacina será constantemente adaptada para ter como alvo a variante de maior prevalência no semestre imediatamente anterior e deve ser capaz de garantir os níveis de imunização necessários para o controle da doença na população. Desta forma, visa-se reduzir as probabilidades do surgimento de novas variantes de preocupação e, por consequência, novos surtos como aqueles causados pelas variantes Gama, Delta e Ômicron.

Para caracterizar os grupos etários do público alvo, foram seguidos os critérios do Programa Nacional de Imunizações (PNI). Nele são caracterizadas como crianças pessoas entre os 6 meses e 11 anos de idade e idosos como pessoas a partir dos 60 anos de idade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023a). Para nenhum dos grupos foi feita a separação entre grupos prioritários, considerando-se toda a população dos grupos nos cálculos de projeção de demanda.

Até o presente momento, todas as vacinas aprovadas pela Anvisa foram distribuídas pelo SUS e adquiridas pelo Ministério da Saúde através do PNI, conforme descrito no Capítulo 2. O cronograma vacinal de reforço proposto pelo Ministério da Saúde, atualmente, contempla apenas a vacinação anual de idosos e não crianças. Contudo, com a maior disponibilização de imunizantes e novas propostas de políticas públicas de imunização, estima-se que a vacinação de reforço possa ter caráter anual para todos os públicos, nos mesmos moldes da vacinação contra *influenza*.

A partir dos dados disponibilizados através do “Vacinômetro COVID-19”, e representados na Figura 13, foi constatado que as campanhas de vacinação com maior número de doses aplicadas em todas as faixas etárias foi a campanha do protocolo vacinal primário de duas doses ou dose única inicial.

**Figura 13:** Doses de vacinas monovalentes aplicadas por faixa etária



Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE (2023b)

Para o estudo, então, foram considerados os dados da primeira dose de vacinas monovalentes aplicadas em idosos a partir do início do ano de 2021 e em crianças a partir do início do ano de 2022.

Por se tratar de uma campanha de vacinação anual de uma vacina nacional para as mesmas faixas etárias, atualizada para as cepas mais em circulação durante o ano anterior (INSTITUTO BUTANTAN, 2023) e de grande adesão do público, os dados das campanhas de 2021 e 2022 contra *influenza* também foram empregados na estimativa de demanda. Estes dados foram empregados devido às propostas de cronograma vacinal serem iguais e por acreditar-se que, por se tratar de uma vacina nacional e que possa ter campanhas de vacinação conjunta à contra a *influenza*, a cobertura vacinal da população às campanhas de reforço com este novo imunizante possam atingir os mesmos níveis das campanhas contra a *influenza* dos anos mencionados.

Para avaliar a adesão das populações propostas às campanhas supracitadas, foi construída a Tabela 8, com as doses aplicadas em cada grupo durante cada uma das iniciativas e os números comparados às projeções populacionais do IBGE para os anos das campanhas (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE), 2018). A partir desta análise, os resultados de cobertura vacinal por grupo foram estimados e podem ser encontrados na Tabela 9.

**Tabela 8:** Doses aplicadas nas campanhas vacinais contra COVID-19 e *influenza* e projeções populacionais para 2021 e 2022

Dado	Crianças	Idosos
------	----------	--------

1ª dose COVID-19 (2021)	-	30.799.878
1ª dose COVID-19 (2022)	18.197.234	-
<i>Influenza</i> 2021	18.349.367	21.465.820
<i>Influenza</i> 2022	13.078.378	21.251.902
Projeção da população para 2021	35.251.541	31.330.235
Projeção da população para 2022	35.201.772	32.493.765

Fonte: Adaptada de MINISTÉRIO DA SAÚDE (2022b, 2023b)

**Tabela 9:** Cobertura vacinal das campanhas contra COVID-19 e *influenza*

<b>Campanha</b>	<b>Crianças</b>	<b>Idosos</b>
<i>Influenza</i> 2021	52,1%	68,5%
<i>Influenza</i> 2022	37,2%	65,4%
1ª dose COVID -19	51,7%	98,3%
Média	47,0%	77,4%

Fonte: Adaptada de MINISTÉRIO DA SAÚDE (2022b, 2023b)

Considerando as estimativas de cobertura vacinal das campanhas anteriores do Ministério da Saúde, foram estimadas as demandas por vacinas contra COVID-19 para ambos os grupos etários em relação às projeções populacionais do IBGE para o período de 2029 a 2038. A partir destas estimativas, a demanda pela vacina foi estimada visando atender a 20% deste resultado. Com isso, tem-se na Tabela 10 o total de doses da nova vacina necessárias para atender ao público proposto durante todo o período de operação da planta produtiva proposta.

**Tabela 10:** Estimativa da demanda pela vacina durante o período de operação proposto

<b>Ano</b>	<b>Demanda pela vacina (doses)</b>
2029	9.540.942
2030	9.697.261
2031	9.851.970
2032	10.003.303
2033	10.151.208

2034	10.302.480
2035	10.459.757
2036	10.622.417
2037	10.790.319
2038	10.962.789

Fonte: Elaborada pelo autor

Em junho de 2023 foram divulgados alguns resultados do censo realizado pelo IBGE no ano de 2022. Foi reportado que, no ano da pesquisa, a população brasileira era de 203 milhões de habitantes, 5,5% a menos que a previsão de 214,8 milhões divulgada pelo IBGE em 2018. Contudo, optou-se por realizar este trabalho considerando as projeções populacionais divulgadas em 2018 pois os dados por faixa etária do censo não foram divulgados até a presente data. A premissa de que o erro estatístico do instituto de que os 5,5% de diferença entre projeção e população real está distribuído igualmente entre todas as faixas etárias não foi assumida.

A partir dos resultados calculados, será realizado o dimensionamento dos equipamentos para uma planta produtiva capaz de entregar 10,9 milhões de doses anuais durante 10 anos.

#### 4.2. MERCADO DE VACINAS

Para avaliar o mercado atual de vacinas contra a COVID-19, foram considerados dois principais aspectos do mercado e do projeto proposto. Todas as doses de vacinas contra a COVID-19 continuarão sendo adquiridas pelo Ministério da Saúde por meio do PNI e distribuídas à população brasileira através do SUS, e a plataforma empregada na produção da vacina ser atualizável é uma característica fundamental para a prevenção de novos surtos de COVID-19 e variantes de preocupação de SARS-CoV-2.

Com o objetivo de garantir uma base comparativa em relação às alternativas presentes no mercado, foram levantados os preços por dose de cada uma das vacinas que foram distribuídas pelo SUS ao longo dos últimos dois anos e meio e outras vacinas amplamente utilizadas no mundo. A Tabela 11 reúne os de algumas das principais vacinas aplicadas no mundo e os

preços pagos pelo governo brasileiro, referentes às principais vacinas distribuídas pelo SUS, a partir dos dados compilados pela UNICEF.

**Tabela 11:** Informações mercadológicas de vacinas contra a COVID-19

<b>Instituto/Empresa</b>	<b>Vacina</b>	<b>Preço por dose (USD)</b>	<b>Países nos quais foi aplicada</b>
Pfizer BioNTech	Comirnaty	10,00	112
AstraZeneca/Oxford/Fiocruz	Covishield / Vaxzevria	3,16	101
Sinovac	Coronovac	10,30	42
AstraZeneca/Oxford/Serum Institute of India	Covishield	5,00*	79
Janssen Pharmaceuticals	Ad26.COV 2-S	7,50	86
Moderna	Spikevax	15,00**	77
Beijing Institute of Biological Products	BBIBP-CorV	9,00***	31

\*Preço referente ao custo por dose da vacina enquanto o IFA era importado do Serum Institute of India.

\*\*Não disponível no mercado brasileiro. Valor de compra para o governo dos Estados Unidos da América.

\*\*\*Não disponível no mercado brasileiro. Valor da compra mais recente para o governo da Argentina.

Fonte: UNICEF, [S.d.]

A partir dos dados compilados, observa-se que a vacina produzida pela Fiocruz foi o imunizante com o menor custo por dose dentre os distribuídos no Brasil. Mesmo um esquema vacinal completo de duas doses da Covishield, quando produzida pela Fiocruz, apresenta o custo de 6,32 USD, ainda menor custo menor da vacina de dose única As26.COV 2-S. Dessa forma, ela se destaca como a principal concorrente a quaisquer alternativas que tentem participar do mercado brasileiro.

Em relação às demais vacinas adquiridas pelo Ministério da Saúde, a média de preço por dose é de 8,2 USD e, observando-se o panorama geral apresentado, a média é de 8,57 USD por dose.

## 5. PROCESSO E DIMENSIONAMENTO

Este trabalho aborda uma vacina contra a COVID-19 a qual utiliza subunidades proteicas como plataforma tecnológica. O processo proposto neste trabalho é baseado no trabalho de ALVIM, LIMA, *et al.* (2022) e nos experimentos explicitados no trabalho de qualificação do doutorando Tulio M. Lima, do LECC, COPPE/UFRJ, e orientado pelos professores Leda R. Castilho e Ricardo A. Medronho. Neles, são descritas todas as etapas *upstream* e *downstream* do processo produtivo de proteína S de SARS-CoV-2. Este trabalho é mais um dentre uma série de esforços conjuntos visando o desenvolvimento de uma vacina nacional com tecnologia de ponta contra a COVID-19.

Como discutido anteriormente, a proteína S de SARS-CoV 2 é a principal glicoproteína do envelope viral e é fundamental para a infecção do vírus em células hospedeiras. Por isso, mutações nos genes de expressão desta proteína têm o potencial de afetar diretamente a capacidade de infecção e transmissão do SARS-CoV-2 (KUZEL, FU, *et al.*, 2023), portanto, mutações na proteína S tendem a ser uma das marcadoras de novas variantes. Dadas estas características, e por ter sido observado que a maioria dos anticorpos neutralizantes são gerados contra a proteína S, ela se tornou o principal candidato antígeno em vacinas contra a COVID-19 (ARRUDA, LIMA, *et al.*, 2023) para a infecção do vírus em células hospedeiras. Como um caminho para o controle da COVID-19, a fim de que sejam evitados novos surtos como os vividos no passado recente, é apresentado o projeto de uma vacina nacional de subunidade proteica e atualizável com base na proteína S de SARS-CoV-2.

Neste capítulo serão discutidas todas as etapas que compõem o processo produtivo da vacina proposta. A partir das condições e parâmetros operacionais definidos nos trabalhos supracitados, cada seção deste capítulo se propõe a explicitar uma das etapas do processo e propor o aumento para escala industrial, especificações requeridas para os equipamentos e estimativas de insumos necessários.

O desenvolvimento deste capítulo segue algumas premissas principais para o planejamento do processo industrial.

- I) O processo apresentado é referente ao desenvolvimento do IFA para uma vacina contra a variante D614G de SARS-CoV-2;

- II) Os equipamentos e insumos necessário serão definidos visando a entrega de 10,9 milhões de doses anuais do imunizante;
- III) Cada dose de 0,5 mL será armazenada em um frasco de 0,8 mL com a concentração de proteína S igual a 30 µg/mL, totalizando 24 µg por frasco;
- IV) Com o objetivo de atender à demanda, um fator de segurança de 20% foi definido para caso de perdas ou eventos imprevistos;
- V) A planta operará 321 dias por ano, considerando-se a realização de 25 bateladas;
- VI) O processo industrial proposto foi elaborado considerando a reprodutibilidade dos resultados experimentais para a escala industrial;
- VII) Cada batelada possui a duração de 12 dias, considerando cultivo e preparo do biorreator.

Após cada batelada alimentada, é iniciado o processo *downstream* do sobrenadante obtido, para a obtenção da proteína S secretada pelas células durante o cultivo. Ele é composto por filtrações para clarificação do sobrenadante, uma etapa de cromatografia de afinidade para captura da proteína, seguida por uma etapa de clivagem enzimática, e finalizada com uma etapa de cromatografias de troca aniônica e multimodal em série para polimento. Ao final deste processo é obtida a proteína S nas condições necessárias para preparo do IFA.

## 5.1. SISTEMA DE EXPRESSÃO

Para obter-se uma matriz produtiva capaz de expressar e secretar a altamente glicosilada proteína S do SARS-CoV-2 em níveis apreciáveis e de forma econômica, foi gerada uma linhagem recombinante a partir das células animais recombinantes e adaptadas ao crescimento em suspensão, livre de soro animal.

Segundo Alvim *et al.*, (2022), para a geração da linhagem recombinante capaz de expressar e secretar a proteína S de SARS-CoV-2, foram transfectados os genes de interesse por meio de lipofecção do material genético de interesse. Foi utilizada uma combinação de dois vetores, o vetor pαH (cedido por B. Graham, VRC/NIH) contendo a sequência codificante do ectodomínio da proteína S na conformação de pré-fusão ao receptor celular ACE2 e um vetor vazio (pCIneo, Promega) contendo o gene da neomicina fosfotransferase para adição de um

marcador de seleção para células estáveis. 24 dias após a transfecção, obteve-se mais 90% de viabilidade celular e montou-se o banco de células criopreservado.

Para o processo industrial, a organização responsável por assumir o projeto poderá ser diretamente responsável pela geração da linhagem recombinante ou contratar uma empresa ou laboratório especializado para a geração dos bancos celulares mestre e de trabalho. A metodologia desenvolvida poderá ser reproduzida, adaptando-se o vetor codificante da proteína S para a variante em circulação.

## 5.2. PROPAGAÇÃO DO INÓCULO

Para o início do processo produtivo no biorreator final, a preparação do inóculo é uma etapa fundamental. Durante ela, as células do banco celular são descongeladas e cultivadas em biorreatores de volumes crescentes, em série, até ser atingida uma quantidade de células capaz de inocular o biorreator principal (N) (VÉLIZ, RODRÍGUEZ, *et al.*, 2008). Esta metodologia permite atingir grandes volumes celulares partindo-se de um inóculo inicial pequeno.

De modo a garantir a qualidade e a segurança do processo, é necessário tomar todas as medidas cabíveis para assegurar a assepsia durante as transferências do cultivo entre os biorreatores, evitando contaminações. Outra ação muito importante para esta etapa é realizar as transferências durante a fase exponencial de crescimento celular para reduzir a duração da fase *lag* de crescimento no biorreator seguinte.

Para iniciar a etapa de propagação, os criotubos de 1 mL contendo  $10^7$  células são descongelados e o conteúdo é diluído em 10 mL de modo a ser atingida a concentração de  $10^6$  células/mL. São realizados sucessivos aumentos graduais do volume de trabalho a cada 3 ou 4 dias, de modo a atingir a concentração inicial de, aproximadamente,  $10^6$  células/mL em cada biorreator inoculado. A Tabela 12 apresenta um resumo referente às etapas de preparo do inóculo. São empregados frascos agitados e reatores de tanque agitado com bolsas descartáveis (*single use*) de 1 L, 5 L e 50 L, até ser atingida a quantidade de células necessária para inocular o biorreator selecionado ao processo produtivo com uma concentração inicial de  $10^6$  células/mL.



Durante todas as etapas, células são cultivadas em meio quimicamente definido HEK-TF (Sartorius Xell) livre de soro animal e suplementado com 8 mM de L-alanil-L-glutamina (Sigma Aldrich), sob condições de 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> e agitação entre 140 e 180 rpm. Para o processo produtivo, foi selecionado um biorreator com volume de trabalho igual a 500 L. Como o processo é realizado através de operação em batelada alimentada, o volume inicial do biorreator N equivale ao volume necessário para que a etapa de cultivo seja iniciada com uma concentração celular de 10<sup>6</sup> células/mL. Portanto, ao final desta etapa, o biorreator principal irá começar a operar a batelada alimentada com o volume de 384 L.

**Tabela 12:** Etapas de propagação do inóculo

<b>Etapas da propagação</b>	<b>Volume de trabalho (L)</b>	<b>X<sub>0</sub> (cel./mL)</b>	<b>X (cel./mL)</b>	<b>Tempo acumulado de propagação (dias)</b>
N-6	0,01	1,0E+06	2,50E+06	4
N-5	0,025	1,0E+06	3,50E+06	7
N-4	0,085	1,0E+06	6,00E+06	11
N-3	0,5	1,0E+06	6,00E+06	14
N-2	3	1,0E+06	1,60E+07	18
N-1	48	1,0E+06	8,00E+06	21
N	384*	1,0E+06	-	

\*Biorreator industrial seguirá o regime de batelada alimentada com volume inicial de 384 L em reator com volume de trabalho de 500 L.

Fonte: Elaborada pelo autor com base em dados experimentais de Alvim, Renata G. F. (informação pessoal)

O tempo estimado de preparo do inóculo para o biorreator industrial definido para produção da proteína S é de 21 dias. Para início das operações, este é um tempo que precisa entrar no planejamento da equipe responsável. Contudo, a partir da segunda batelada, todas as etapas de cultivo e propagação de inóculo para o biorreator seguinte ocorrem simultaneamente, de modo a agilizar o processo.

### 5.3. CULTIVO DE CÉLULAS

Todo o processo do cultivo das células produtoras do IFA foi elaborado a partir da demanda projetada no Capítulo 4 deste trabalho. Mantendo-se o sistema produtivo desenvolvido no LECC por Alvim, *et al.*, (2022) o biorreator de tanque agitado 500 L foi definido para o processo em bateladas alimentadas utilizando bolsas descartáveis (*single use*). O cultivo é iniciado em meio HEK-TF com L-glutamina 8 mM e alimentado com solução concentrada de nutrientes composta por HEK-FS (Sartorius Xell) e L-alanil-L-glutamina 8 mM, manipulados de acordo com as instruções do fabricante.

O processo de ALVIM, LIMA, *et al.* (2022) apresenta alguns pontos-chave os quais favorecem a produção industrial da proteína S. Biorreatores de tanque agitado permitem alto nível de homogeneização da cultura, monitoramento, controle e automação de parâmetros cruciais ao cultivo (VÉLIZ, RODRÍGUEZ, *et al.*, 2008), como pH, oxigênio dissolvido (OD) e temperatura, os quais devem ser mantidos em 7,1, 37 °C e 40% de saturação de ar. O uso de meio livre de soro animal facilita o processo de purificação, garantindo maiores rendimentos com menos etapas e evita entraves éticos e regulatórios relacionados ao uso do soro fetal bovino, e o emprego de bolsas *single use* está de acordo com o estado da arte do cultivo de células animais pois facilita o processo de limpeza do biorreator, reduz a necessidade de validação do processo de esterilização e diminui o tempo necessário para o preparo de uma nova batelada.

O processo produtivo é iniciado com o inóculo do biorreator com a concentração de 1 milhão de células por mL no volume inicial de 384 L e, a partir do quarto dia de cultivo, é alimentado com a solução concentrada de nutrientes, contendo 30g/L de glicose, de forma a aumentar a concentração de glicose no meio para entre 3,0 e 3,5 g/L regularmente. O tempo de cada batelada engloba o inóculo do biorreator, fases *lag* e exponencial do crescimento celular e expressão e secreção da proteína S. O processo é finalizado por volta do décimo segundo dia, quando a viabilidade das células tende a estar por volta de 70%. São consideradas a colheita do sobrenadante ao final do processo e o preparo do biorreator para a próxima batelada sendo feitos no mesmo dia.

De forma a garantir a produção de 10.962.789 doses do imunizante, em frascos contendo 24 µg do antígeno, 15 µg por dose de 0,5 mL, é necessária a produção de 263,11 g/ano de proteína S. Visando a proteção contra eventuais perdas e eventos imprevistos, o fator de

segurança de 1,2 foi empregado. Portanto, são necessários 315,73 g ao ano de proteína S já purificada para a produção dos imunizantes.

Mais à frente neste capítulo são detalhados os procedimentos que compõem o processamento *downstream* do IFA da vacina proposta. De acordo com os experimentos apresentados no trabalho de qualificação de Tulio M. Lima, no LECC, o processo de purificação da proteína S da variante D614G apresentou um rendimento global de 24,68 mg de proteína S para cada litro de sobrenadante produzido. Desta forma, é necessária a produção de 12.789 litros anuais de sobrenadante.

Considerando o volume de trabalho de 500 L do biorreator escolhido, foi corrigido para 25 o número de bateladas de produção da vacina proposta. Isto permite a produção de 12.500 litros de sobrenadante e, ao final do processo, a obtenção de 308,57 g de proteína S. Portanto, o processo desenhado neste trabalho é capaz de produzir anualmente 12.857.286 doses, mantendo-se uma margem de segurança de 17,3% da demanda estimada. Os detalhes e principais parâmetros do processo industrial proposto para o processo são descritos na Tabela 13 abaixo.

**Tabela 13:** Escalonamento do cultivo de células

<b>Dado</b>	<b>Processo industrial</b>
Equipamento	Biorreator com bolsas <i>single use</i>
Volume de trabalho do biorreator (L)	500
Volume inicial no biorreator(L)	384
Concentração inicial de células (células/mL)	$1,0 \cdot 10^6$

\*Exemplo: Biorreator Xcellerex XD Single-Vessel 500 L (Cytiva)

Fonte: Elaborada pelo autor

#### 5.4. PURIFICAÇÃO

Por se tratar do IFA da vacina, a proteína S obtida deve atender a critérios rigorosos de concentração, pureza e esterilidade. Graças à plataforma empregada, as proteínas são secretadas pelas células, evitando-se a necessidade de uma etapa de lise celular e posterior remoção de *debris*. O processo *downstream* de um biofármaco pode ser a etapa mais dispendiosa da

produção, pois pode envolver custos de operação muito altos, demandar equipamentos caros e, principalmente, cada uma das etapas as quais o compõem impactam significativamente o rendimento global do processo (MORAES, *et al.*, 2008, cap. 12).

A estratégia de organização e seleção das técnicas de separação e purificação do produto é, então, de extrema importância para a viabilidade do projeto. Através do planejamento adequado e combinação ótima de técnicas é possível atingir o grau de pureza necessário e maximizar o rendimento do processo e minimizar o número de etapas realizadas. O olhar analítico a cada uma das metodologias de separação e purificação também é fundamental. Etapas de otimização dos processos de purificação e separação em laboratório não devem ser negligenciadas, de modo que cada uma das técnicas propostas seja capaz de entregar o melhor rendimento possível.

Cinco pontos principais no desenho de um processo *downstream* eficiente foram considerados para a obtenção da proteína S. São eles: seleção de técnicas baseadas em princípios de separação diferentes; separar impurezas em maior quantidade primeiro; explorar propriedades físico-químicas diferentes, para ter um processo abrangente; utilizar uma etapa com alta resolução o mais cedo possível; e realizar as etapas mais caras e/ou trabalho ao final, quando o volume de trabalho é menor (AMABLE, BUTLER, 2008).

Nesta seção serão descritas as etapas que compõem o processamento de purificação da proteína S para produção do insumo farmacêutico ativo da vacina. Primeiramente, é feita a clarificação do sobrenadante obtido durante cultivo através de filtração em membranas de materiais com baixa adsorção de proteínas, com poros de 1,2 e  $0,45 \pm 2 \mu\text{m}$  (Sartorius Stedim). O processo de purificação é composto por uma etapa de cromatografia de afinidade com resina Strep-Tactin<sup>®</sup> XT (Cytiva) seguido de clivagem enzimática da cauda Strep-Tag II da proteína S. Por fim, a etapa de polimento é composta pelo processamento em série de cromatografia de troca aniônica com membrana Sartobind<sup>®</sup> Q (Sartorius), cromatografia multimodal CaptoCore 400 (Cytiva) e Strep-Tactin<sup>®</sup> XT (Cytiva) em modo *flow-through*, seguida por uma etapa de filtração estéril em membrana com poros de  $0,2 \mu\text{m}$  (Sartorius Stedim).

### 5.4.1. Clarificação

Após o término do cultivo é feita a etapa de clarificação do sobrenadante gerado. São empregadas em série filtrações em membranas de materiais com baixa afinidade a proteínas, como poli (fluoreto de vinilideno) (PVDF) e polietersulfona (PES). Primeiramente, é empregada uma filtração com poros de 1,2  $\mu\text{m}$  (Sartorius Stedim) para a remoção das maiores impurezas e, em seguida, membranas filtrantes com diâmetro de poros de 0,45  $\mu\text{m}$ .

Para o processo industrial de clarificação optou-se pelo uso de módulos filtrantes de mesmos tamanhos de poros, com áreas filtrantes proporcionais ao volume de trabalho e compostos por materiais igualmente com baixa adsorção de proteínas, visando reduzir ao máximo as perdas. A Tabela 14 apresenta as principais informações relacionadas ao escalonamento do processo de clarificação do sobrenadante.

**Tabela 14:** Escalonamento da clarificação

<b>Dado</b>	<b>Laboratório</b>		<b>Industrial</b>	
Tamanho de poros ( $\mu\text{m}$ )	1,2	0,45	1,2	0,45
Equipamento	Sartopure <sup>®</sup> GF Plus	Sartopore <sup>®</sup> 2	Sartopure <sup>®</sup> IND Cartridge 30”	Sartorius Reuse Maximizer41
Volume de trabalho (L)	1,5	1,5	500	500
Área filtrante ( $\text{m}^2$ )	0,12	0,2	1,8	9,74
Quantidade de equipamentos	1	1	23	7

Fonte: Elaborada pelo autor, com base em dados laboratoriais fornecidos por ALVIM, Renata G. F. e em discussões com especialistas da empresa Sartorius sobre os dispositivos para escala industrial

### 5.4.2. Cromatografia de afinidade

O processo de purificação se inicia com uma etapa de cromatografia de afinidade. Através dela, já no começo do processo de purificação é realizada a concentração da proteína S e a

obtenção de um elevado grau de pureza, dada a alta especificidade do processo escolhido. No processo é empregada a resina cromatográfica Strep-Tactin<sup>®</sup> XT (Cytiva), utilizada para a purificação de proteínas recombinantes por possuir altíssima especificidade para a cauda Strep-Tag<sup>®</sup> II (Cytiva), presente na proteína S. Por isso, por mais dispendiosa que esta etapa possa ser, ela é crucial para a obtenção do elevado grau de purificação requerido, elevado rendimento com o processo produtivo e diminuição do tempo necessário em outras etapas de polimento, pela redução do volume de trabalho (MORAES, M., *et al.*, 2008, cap.12).

Seguindo a metodologia proposta em Alvim, *et al.*, (2022) foi empregado o equipamento Äkta Purifier (Cytiva) utilizando-se a coluna XK 26/20 (Cytiva) com 24 mL da resina selecionada. Foi selecionado como tampão para esta etapa tampão fosfato-salino (PBS) e, para eluição, foi empregada solução de PBS mais biotina 50 mM, pois a biotina se liga preferencialmente à resina. Desta forma, é possível isolar a proteína S a partir do sobrenadante do cultivo apenas microfiltrado e a redução do volume de trabalho é da escala de 27 vezes.

A partir dos dados experimentais obtidos para o trabalho de qualificação de Tulio M. Lima em corrida com 2,07 L de sobrenadante para a produção de amostras da vacina para a variante D614G, a coluna selecionada apresentou capacidade dinâmica de, aproximadamente, 4 mg de proteína S por mL de resina. Mantendo-se esta capacidade dinâmica e desconsiderando-se perdas de volume nas etapas de clarificação, para os 500 L de sobrenadante produzidos, são necessários 5,74 L de resina. De acordo com as opções disponíveis no mercado foi selecionada a coluna BPG 200/500 (Cytiva), com um volume de resina igual a 5,8 L. Mantendo-se a metodologia proposta em Alvim, *et al.*, (2022), será eluído um volume igual a 3 volumes de coluna (CV), portanto, 17,4 L de eluído contendo a proteína S purificada.

Seguindo os parâmetros definidos para o processo em laboratório e as informações apresentadas nas páginas da fabricante, foi realizado o processo de escalonamento da cromatografia de afinidade para os 500 L de volume de trabalho, conforme apresentado na Tabela 15. Os principais parâmetros seguidos para realizá-lo foram a capacidade dinâmica da resina obtida experimentalmente e a velocidade superficial recomendada pela fabricante para operação da coluna. O tempo de residência foi mantido o mesmo para o processo em laboratório. Contudo, o aumento expressivo da altura da coluna pode provocar aumentos significativos da pressão interna do sistema, o que pode afetar a integridade da coluna ao longo das corridas. Desta forma, optou-se pela troca da resina após a décima terceira corrida.

Na Tabela 16 foram detalhadas as soluções aplicadas em cada uma das principais etapas da cromatografia e na Tabela 17 foram resumidas as principais informações de operação e consumo para o processo industrial projetado.

**Tabela 15:** Escalonamento do sistema cromatográfico de afinidade com resina Strep-Tactin® XT

<b>Dado</b>	<b>Laboratório</b>	<b>Industrial</b>
Equipamento	Äkta Pilot™	Äkta Process™*
Volume alimentado (L)	2,07	500
Rendimento até esta etapa (mg ptn S / L sobrenadante)	45,8	45,8
Produto obtido (g)	0,95	22,9
Capacidade dinâmica (mg ptn S / mL resina)	4,0	4,0
Volume de resina adotado (L)	0,024	5,80
Coluna empregada	XK 26/20	BPG 200/500
Área da seção transversal (cm <sup>2</sup> )	5,3	314,0
Altura da coluna (cm)	4,5	18,5
Velocidade linear (cm/h)	150	150
Vazão de alimentação (L/h)	0,8	47,1
Tempo de alimentação (h)	2,6	10,6
Tempo de residência (min)	10	10
Volume de eluído (L)	0,072	17,4

\*Selecionado para todas as etapas cromatográficas do processo industrial proposto.

Fonte: Elaborada pelo autor, com base em dados laboratoriais fornecidos por LIMA, T. M (informação pessoal)

Durante os experimentos realizados, a resina Strep-Tactin® XT pôde ser usada por até 100 ciclos de adsorção/eluição/regeneração mantendo a capacidade de adsorção dinâmica. Contudo, com a característica de adaptabilidade da plataforma proposta, de ser desenvolvida uma nova linhagem celular para expressão da proteína S da variante mais prevalente no semestre imediatamente anterior, optou-se pelo uso de uma coluna nova por ano, por mais que, em um ano, sejam realizadas apenas 25 corridas cromatográficas.

**Tabela 16:** Principais soluções por etapa da cromatografia de afinidade (CV = Volume de coluna = 5,8 L)

<b>Etapa</b>	<b>Tampão</b>	<b>Volume (CV)</b>
Equilíbrio	Solução PBS 1X, pH 7,4	5
Lavagem	Solução PBS 1X, pH 7,4	10
Eluição	Solução PBS 1X + Biotina 50 mM, pH7,4	6
Sanitização	Solução NaOH 50 mM	4
Armazenamento	Solução Etanol 20% v/v	2

Fonte: Elaborada pelo autor, com base em dados laboratoriais fornecidos por LIMA, T. M (informação pessoal)

**Tabela 17:** Insumos para cromatografia de afinidade

<b>Insumo</b>	<b>Processo industrial</b>
Resina Strep-Tactin <sup>®</sup> XT (L*)	5,8
Coluna BPG 200/500 (unidade*)	1
PBS 10X (L)	13,9
Biotina (g)	449,5
NaOH 1M (L)	1,2
Etanol 98% (L)	3,1

\*De acordo com os experimentos realizados em laboratório a resina empregada mantém a integridade durante todas as corridas que serão realizadas em um ano de operação

Fonte: Elaborada pelo autor

Com o fim da corrida cromatográfica, outra etapa fundamental é a remoção da cauda Twin-Strep-Tag<sup>®</sup> da proteína S do eluído. Ela é a parte responsável pela ligação entre o produto e o ligante da resina Strep-Tactin. Esta etapa de clivagem enzimática da cauda é realizada através de incubação do eluído junto com a protease HRV 3C (ThermoFisher), de acordo com as instruções da fabricante, durante 24 horas.

A quantidade de HRV 3C empregada depende diretamente da concentração de proteína S no eluído, conforme descrito na Tabela 18. Considerando a premissa de 45,8 mg de proteína S por litro de sobrenadante, estima-se a produção de 22,9 g de proteína por batelada, representando uma concentração de 1,3 g/L no eluído. Neste caso, é recomendado pela fabricante o uso de 20 U (10 µL) de enzima para cada µg de proteína. Com isso, por batelada há a necessidade de 1.145.652 U de HRV 3C, ou 572,8 mL.



**Tabela 18:** Critério de utilização de HRV 3C na clivagem enzimática.

Concentração de proteína S no eluído (mg/mL)	Quantidade de HRV 3C necessária
0 - 0,75	1 U para cada 10 µg de proteína S
0,75 - 1,5	1 U para cada 20 µg de proteína S
Acima de 1,5	1 U para cada 40 µg de proteína S

Fonte: Elaborada pelo autor com base no trabalho de qualificação de LIMA, T. M.

### 5.4.3. Cromatografia in tandem

Após a etapa de cromatografia de afinidade e remoção da *tag* marcadora da proteína S, é obtido o produto de interesse já muito mais concentrado em um volume de trabalho menor. A partir disto, devem ser empregadas técnicas de polimento capazes de remover contaminantes restantes, além da protease utilizada para a clivagem enzimática da cauda de purificação e da cauda livre clivada, até que os critérios de pureza requeridos sejam atingidos.

A primeira estratégia desta etapa envolve o uso de três técnicas cromatográficas diferentes em série, troca aniônica em modo “*bind and elute*”, multimodal e de afinidade, ambas em modo “*flow-through*”. A primeira etapa foi selecionada com base no potencial de purificação ao se explorar a carga superficial da proteína S, com pI abaixo de 6, o emprego de membranas de troca aniônica e uso de tampão PBS em pH 8 se apresenta como uma alternativa viável à etapa de polimento e remoção de contaminantes e proteínas residuais.

Para a cromatografia de troca aniônica, foi selecionada a membrana Sartobind® Q (Sartorius), amplamente empregada na purificação de proteínas recombinantes. Para o processo de purificação do antígeno produzido, após a etapa de clivagem enzimática, deve ser feita a diluição das proteínas a um fator de diluição igual a 2. O processo base para este trabalho teve o volume de alimentação de 144 mL, para o qual foram empregadas 5 membranas do modelo Sartobind® Q Nano de 3 mL. O principal fator para o escalonamento deve ser a manutenção da proporcionalidade entre o volume de alimentado e a área de membrana.

Objetivando-se uma corrida com 34,8 L de volume alimentado, é necessário então um conjunto de membranas com área de, pelo menos, igual a 13,29 m<sup>2</sup>. Foi selecionado conjunto

de dois módulos Sartobind® Q Jumbo 2,5 L, conforme apresentado na Tabela 19 junto com as principais informações do escalonamento desta etapa. Apesar do conjunto apresenta área de membrana maior do que os 13,3 m<sup>2</sup> necessários de acordo com o escalonamento, optou-se pelo conjunto citado de modo não empregar equipamentos diferentes para a mesma etapa ou arcar com os custos potencialmente mais elevados de empregar mais unidades de modelos menores. É apontado pela fabricante que a membrana selecionada pode ser reutilizada de 15 a 20 vezes. Optou-se pela abordagem mais conservadora de 15 reutilizações por conjunto, visando evitar perda das capacidades adsorptivas e prejuízos ao processo.

**Tabela 19:** Escalonamento do sistema de cromatografia de troca aniônica para cromatografia *in tandem*

<b>Dado</b>	<b>Laboratório</b>	<b>Industrial</b>
Membrana	Sartobind® Q Nano 3 mL	Sartobind® Q Jumbo 2,5 L
Altura do leito (mm)	4	4
Número de módulos	5	2
Área de membrana (m <sup>2</sup> )	0,055	18,2
Volume alimentado (L)	0,144	34,8
Volume de eluição (L)	0,060	19,9

Fonte: Elaborada pelo autor, com base em dados laboratoriais fornecidos por LIMA, T. M (informação pessoal)

Em seguida são empregadas duas colunas cromatográficas em modo *flow-through*. A primeira delas utiliza a resina multimodal Capto Core 400 (Cytiva) com capacidade de exclusão por tamanho de moléculas a partir de 400 kDa e paredes internas dos poros múltiplos ligantes capazes de adsorver uma ampla gama de contaminantes. Como a membrana anterior opera em modo *bind and elute*, o volume de amostra propriamente alimentada à cromatografia multimodal é igual ao volume selecionado para a etapa de eluição da cromatografia de troca aniônica.

O processo realizado em laboratório empregou 34 mL da resina Capto Core 400 empacotados na coluna XK 16/40 (Cytiva) adaptada. Para o aumento de escala, foi mantida a proporcionalidade entre o volume alimentado e o volume de leito, mantendo-se a velocidade de fluxo definida à cromatografia *in tandem*. Foi selecionada a coluna BPG 300/500 (Cytiva) por ser a coluna que permite operar com o mesmo tempo de residência da amostra na resina, mantendo-se a velocidade de fluxo do processo em menor escala.

Nessas condições, o volume de resina necessário para esta etapa seria de 11,2 L. De forma a corresponder aos critérios estabelecidos foi definido o volume de resina como igual a 11,6 L. As informações relacionadas ao escalonamento da coluna de cromatografia multimodal encontram-se na Tabela 20. A fabricante indica a possibilidade de reutilização da resina por até 45 ciclos, contudo, dada a atualização da proteína produzida, optou-se pela troca anual da coluna.

**Tabela 20:** Escalonamento do sistema de cromatografia multimodal para cromatografia *in tandem*

<b>Dado</b>	<b>Laboratório</b>	<b>Industrial</b>
Resina	Capto Core 400	Capto Core 400
Volume alimentado (L)	0,060	19,9
Volume de resina (L)	0,034	11,6
Coluna	XK 16/40 com adaptador	BPG 300/500
Área transversal (cm <sup>2</sup> )	2	688
Altura do leito (cm)	16,9	16,9

Fonte: Elaborada pelo autor, com base em dados laboratoriais fornecidos por LIMA, T. M

Por fim, é empregada novamente a resina Strep-Tactin<sup>®</sup> XT para cromatografia de afinidade. Ela também é operada no regime de *flow-through* que permite a remoção de contaminantes como as *tags* residuais da clivagem enzimática e proteínas que não tenham sido clivadas corretamente. No trabalho de doutorado de Tulio M. Lima, cuja tese ainda será defendida, foram empregados 18 mL de resina empacotados na coluna XK 16/20 (Cytiva). O escalonamento da coluna necessária foi feito buscando-se a manutenção do tempo de residência da amostra na coluna e respeitando-se a proporcionalidade entre volume de resina e volume alimentado como volume mínimo. Nessas condições, o volume de resina necessário seria o de 6,0 L. Contudo, visando melhor atender aos requisitos desta etapa, foi selecionado o uso de 6,2 L de Strep-Tactin<sup>®</sup> XT na coluna BPG 300/500, mantendo o tempo de residência experimental, de forma a garantir a captura de impurezas.

As principais informações relacionadas ao aumento de escala da coluna cromatográfica de afinidade em modo *flow-through* encontram-se detalhadas na Tabela 21. Assim como na etapa de purificação, optou-se pela troca anual das resinas de todas as colunas da etapa de

polimento, de modo a garantir a capacidade de purificação para o sistema quando for expressa a proteína S de uma nova variante.

**Tabela 21:** Escalonamento do sistema de cromatografia de afinidade para cromatografia *in tandem*

<b>Dado</b>	<b>Laboratório</b>	<b>Industrial</b>
Resina	Strep-Tactin® XT	Strep-Tactin® XT
Volume alimentado (L)	0,060	19,9
Volume de resina (L)	0,018	6,2
Coluna	XK 16/20	BPG 300/500
Área transversal (cm <sup>2</sup> )	2	688
Altura do leito (cm)	9,0	9,0

Fonte: Elaborada pelo autor, com base em dados laboratoriais fornecidos por LIMA, T. M

Uma questão intrínseca a esta etapa é a definição da vazão de trabalho. Para a etapa de cromatografia de troca aniônica, seguiu-se as orientações da fabricante, assumindo-se a vazão de 10 vezes o volume de leito por minuto de alimentação. Portanto, esta etapa deve ser operada a uma vazão de 1.500 L/h. Para as demais cromatografias do *tandem*, por se tratar da operação de duas colunas com propriedades muito diferentes em série, faz-se necessário o cuidado com a manutenção da integridade de cada uma das resinas. Cada uma delas apresenta um limite de velocidade superficial para operação da coluna de maneira segura. Visando a longevidade do processo ao longo do ano e manutenção das colunas, foi optado pelo emprego da vazão capaz de manter a mais sensível das resinas íntegra, 137,6 L/h. A Tabela 22 agrupa as informações disponibilizadas pelas fabricantes, as quais balizaram estas decisões e as vazões estimadas a partir dos critérios apresentados.

**Tabela 22:** Critérios para definição das vazões operacionais durante a cromatografia *in tandem*

<b>Membrana / Resina</b>	<b>Recomendação da fabricante</b>	<b>Parâmetro selecionado</b>	<b>Vazão industrial estimada (L/h)</b>
Sartobind® Q Capsule 600 mL	10 a 30 volumes de leito / min	10 volumes de leito/min	1.500,0
Capto Core 400	Máximo de 700 cm/h	500 cm/h	344,0

Strep-Tactin® XT	Máximo de 300 cm/h	200 cm/h	137,6
---------------------	--------------------	----------	-------

Fonte: Elaborada pelo autor, com base em informações disponibilizadas pelas fabricantes

O processo descrito nesta seção explora diferentes técnicas para a remoção de contaminantes, são aplicados diferentes modelos operacionais e diferentes propriedades físico químicas são exploradas. O emprego da cromatografia *in tandem*, conforme descrito, está associado a um rendimento de 53,9%. Na Tabela 23 são consolidados os principais dados associados a esta etapa, com resultados de uma batelada.

**Tabela 23:** Principais dados do sistema cromatográfico *in tandem*

<b>Dado</b>	<b>Processo industrial</b>
Equipamento	Äkta Process™
Volume inicial (L)	34,8
Rendimento até esta etapa (mg ptn S / L sobrenadante)	24,69
Produto obtido (g)	12,35
Vazão de alimentação 1 (L/h)	1.500
Vazão de alimentação 2 (L/h)	137,6
Volume de eluído (L)	19,9

Fonte: Elaborada pelo autor

#### 5.4.4. Filtração estéril

Para a produção de imunobiológicos parenterais é fundamental a garantia de ausência de bactérias e outros microrganismos. No caso da vacina proposta, como as doses não podem ser individualmente esterilizadas antes da aplicação, é necessária uma etapa esterilizante antes do IFA ser encaminhado para a formulação, como forma de garantir a segurança dos indivíduos os quais irão receber o imunizante.

A filtração com filtro de grau esterilizante com poros de 0,2  $\mu\text{m}$  é uma das técnicas mais empregadas de esterilização na produção de biofármacos termolábeis. Através dela é possível a remoção microbiana a níveis de acordo com as regulamentações nacionais e internacionais relacionadas à esterilidade de medicamentos injetáveis.

No processo de purificação das em escala laboratorial, foi empregada a filtração dos 60 mL eluídos da cromatografia *in tandem* com membrana estéril Millipak<sup>®</sup> 40 Gamma Gold com poros de 0,22  $\mu\text{m}$  (Merck Millipore). Mantendo-se a relação entre área filtrante e volume perfundido, para os 15 L de eluídos no processo industrial da cromatografia *in tandem* foi selecionada a Opticap<sup>®</sup> Gamma Compatible XLT30 Durapore<sup>®</sup> também com poros de 0,22  $\mu\text{m}$  e estéril (Merck Millipore), conforme descrito na Tabela 24.

**Tabela 24:** Processo industrial de filtração esterilizante

<b>Informação</b>	<b>Processo industrial</b>
Membrana selecionada	Opticap <sup>®</sup> Gamma Compatible XLT30 Durapore <sup>®</sup>
Diâmetro de poros ( $\mu\text{m}$ )	0,22
Área filtrante necessária ( $\text{m}^2$ )	6,9
Área filtrante por módulo ( $\text{m}^2$ )	2,17
Módulos necessários (unid.)	4
Área filtrante total ( $\text{m}^2$ )	8,7
Metodologia de esterilização	Autoclavagem e exposição à radiação gama

Fonte: Elaborada pelo autor

## 5.5. PROCESSAMENTO FINAL

Após a filtração estéril, a proteína S se encontra nas condições necessárias ao preparo do imunizante. O processamento final envolve etapas de formulação, envase, recravação, inspeção dos frascos e embalagem final (TAVARES, 2017). As premissas para produção da vacina são de doses de 0,5 mL serem armazenadas em frascos de 0,8 mL, apresentando a concentração final de 30  $\mu\text{g/mL}$ . Ao IFA são comumente adicionados outros ingredientes para condicionamento e aplicação de vacinas. Aditivos comuns aos imunizantes são conservantes,

estabilizadores, surfatantes, diluentes e adjuvantes. A vacina em questão foi elaborada de modo que a dose a ser aplicada nos pacientes contenha 50% v/v de adjuvante após a formulação final. Dessa forma, cada dose aplicada apresenta 15 µg da proteína S produzida.

Contudo, as etapas subsequentes ao término da purificação não foram consideradas para o processo proposto neste trabalho. Foi considerada a terceirização do trabalho de formulação e envase do imunizante seguindo a premissa de parceria entre investidor e instituição ou empresa que já possua uma área adequada ao processamento final de imunobiológicos. Seguindo esta premissa, foi estimado o valor adicional de USD 0,22 por dose ao custo total de produção a partir do trabalho de TAVARES (2017).

## 5.6. TANQUES DE MISTURA

Ao longo do processo produtivo proposto há a necessidade de preparo de diversas soluções, tampões, meio de cultivo e soluções de nutrientes. Para garantia de manutenção do processo e das condições assepsia e esterilidade requeridos de um imunobiológico o uso de equipamentos que permitam a produção destes itens é fundamental. Podem ser tanques próprios para manuseio de solução e meios de cultivo para biofármacos ou tanques com bolsas descartáveis *single use*. Para a produção da vacina recomenda-se maximizar o uso de equipamentos *single use*, visto que se apresentam como uma solução de menor custo e permitem a manutenção de condições assépticas e estéreis sem a necessidade de constante limpeza esterilização de equipamentos.

## 5.7. CONSOLIDAÇÃO DO PROCESSO EM LARGA ESCALA

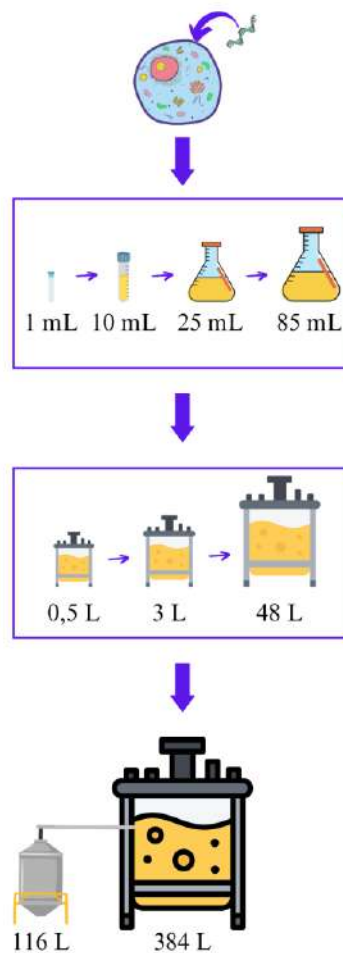
### 5.7.1. *Upstream*

O processo *upstream* de produção da vacina engloba as etapas de propagação do inóculo e cultivo celular para expressão da proteína S. A otimização desta etapa pode levar ao aumento

da produtividade volumétrica do cultivo. Desta forma, é possível reduzir o investimento necessário em equipamentos, o tamanho da planta, e os custos operacionais. Ao desenvolver-se um processo eficiente e otimizado a probabilidade de ser economicamente viável aumenta e, por consequência, a garantia de acesso da população ao medicamento também.

A Figura 14 apresenta, de forma resumida e esquematizada, o processo *upstream*, detalhado neste capítulo. Os principais resultados e estimativas produtivas desenvolvidos são apresentados na Tabela 25.

**Figura 14:** Representação esquemática do processo *upstream*



Fonte: Elaborada pelo autor



**Tabela 25:** Estimativas de parâmetros do processo *upstream*

<b>Dado</b>	<b>Resultado</b>
Tempo para preparo do inóculo (dias)	21
Tempo para cultivo (dias)	12
Volume de sobrenadante no biorreator N (L/batelada)	500
Consumo de HEK-TF (L/batelada)	418,20
Consumo de HEK-FS (L/batelada)	90,00
Consumo de L-alanil-L-glutamina (L/batelada)	27,42

Insumos incluindo todas as etapas de inóculo e cultivo

Fonte: Elaborada pelo autor

### 5.7.2. *Downstream*

O processo *downstream* de produção do IFA engloba as etapas de clarificação, com as duas etapas de filtração, purificação, através da cromatografia de afinidade e clivagem enzimática e polimento, com a combinação de cromatografias *in tandem* e uma etapa de filtração estéril. Através dele, a proteína S produzida durante o processo *upstream* atinge as condições de pureza adequadas à produção do IFA.

Com o protocolo proposto são exploradas diferentes propriedades físico-químicas da proteína S e dos contaminantes, tais como tamanho de partícula, bioafinidade e carga superficial dos compostos em suspensão. A Figura 15 apresenta, de forma resumida, o processo *downstream*, detalhado neste capítulo. A Tabela 26 condensa as principais informações sobre cada uma das etapas detalhadas nas seções anteriores.

**Figura 15:** Representação esquemática do processo *downstream*



Fonte: Elaborada pelo autor

**Tabela 26:** Estimativas dos parâmetros e indicadores do processo *downstream*

<b>Dado</b>	<b>Resultado</b>
Rendimento após purificação (mg ptn S / L sobrenadante)	45,8
Rendimento após polimento (mg ptn S / L sobrenadante)	24,7
Volume de resina Strep-Tactin <sup>®</sup> XT (L/corrída)	17,8
Vida útil da coluna de Strep-Tactin <sup>®</sup> XT na cromatografia de afinidade (corrídas)	13
Vida útil das colunas de Strep-Tactin <sup>®</sup> XT (corrídas)	25
Módulos de Sartobind <sup>®</sup> Q Jumbo 2,5 L (módulos por corrída)	2
Vida útil dos módulos de Sartobind <sup>®</sup> Q Jumbo 2,5 L (corrídas)	15
Volume de resina Capto Core 400 (L/corrída)	11,6
Vida útil das colunas de Capto Core 400 (corrídas)	25

Fonte: Elaborada pelo autor

### 5.7.3. Equipamentos

Na Tabela 27 são apresentados os principais equipamentos necessários para o processo produtivo dimensionado neste capítulo.

**Tabela 27:** Principais equipamentos dimensionados para o processo

<b>Equipamento</b>	<b>Quantidade necessária</b>
ÄKTA Process (Cytiva)	1
Bancada de fluxo laminar	3
Bandeja para bolsas descartáveis ( <i>single use</i> ) de até 20L	4
Bandeja para bolsas descartáveis ( <i>single use</i> ) de até 50 L	2
Base de estante para bolsas <i>single use</i>	1
Biorreator com bolsas descartáveis ( <i>single use</i> ) 50 L	1
Biorreator com bolsas descartáveis ( <i>single use</i> ) 500 L	1
Coluna BPG 200/500 (Cytiva)	1
Coluna BPG 300/500 (Cytiva)	2
Extensão de estante para bolsas <i>single use</i>	1
Misturador com bolsas descartáveis ( <i>single use</i> ) de até 500 L	1
Tanque de armazenamento de 100 L	1
Tanque de armazenamento de 50 L	1
Tanque de armazenamento de 500 L	2
Tanque para misturador de 100L	1
Tanque para misturador de 650L	1

Fonte: Elaborada pelo autor com base em conversas com fornecedores e catálogos de produtos de fabricantes diversas

#### 5.7.4. Consumíveis

Na Tabela 28 são apresentados os principais consumíveis necessários o processo dimensionado e as quantidades estimadas para um ano de operação.

**Tabela 28:** Principais consumíveis necessários do processo dimensionado e quantidades estimadas para um ano de operação

<b>Item</b>	<b>Unidade</b>	<b>Quantidade (unidade/ano)</b>
Biorreator <i>single use</i> 1 L - Dorna	Unid	25,0
Biorreator <i>single use</i> 5 L - Dorna	Unid	25,0
Biotina	kg	11,2
Bolsa de armazenamento descartável ( <i>single use</i> ) 10 L	Unid	25,0
Bolsa de armazenamento descartável ( <i>single use</i> ) 100 L	Unid	50,0
Bolsa descartável ( <i>single use</i> ) 100 L para misturador	Unid	25,0
Bolsa de armazenamento descartável ( <i>single use</i> ) 20 L	Unid	100,0
Bolsa descartável ( <i>single use</i> ) 200 L para misturador	Unid	25,0
Bolsa de armazenamento descartável ( <i>single use</i> ) 50 L	Unid	25,0
Bolsa descartável ( <i>single use</i> ) 50 L para misturador	Unid	50,0
Bolsa de armazenamento descartável ( <i>single use</i> ) 500 L	Unid	50,0
Bolsa descartável ( <i>single use</i> ) 650 L para misturador	Unid	25,0
Bolsa descartável ( <i>single use</i> ) para Biorreator 50 L	Unid	25,0
Bolsa descartável ( <i>single use</i> ) para Biorreator 500 L	Unid	25,0
Etanol	L	78,0
Filtro esterilizante 0,22 $\mu\text{m}$	Unid	100,0
HRV 3C	U	28.641.304,3
Meio de cultura HEK-TF	L	10.454,9
Membrana Sartobind Q Jumbo 2,5 L	Unid	4,0
NaCl para cromatografia	kg	364,9
NaOH para cromatografia	kg	110,2
PBS 10X	L	2.267,0

<b>Item</b>	<b>Unidade</b>	<b>Quantidade (unidade/ano)</b>
Pré filtro 0,45 µm	Unid	175,0
Pré filtro 1,2 µm	Unid	575,0
Resina Capto Core 400	L	11,6
Resina Strep-Tactin XT	L	12,0
Solução de nutrientes HEK-FS	L	2.250,0
Suplemento L-alanil-L-glutamina	L	685,6

Fonte: Elaborada pelo autor com base em conversas com fornecedores e catálogos de produtos de fabricantes diversas

## 5.8. ASPECTOS REGULATÓRIOS

Para a comercialização de um novo produto farmacêutico há uma série de etapas que devem ser seguidas pelo proponente perante aos órgãos reguladores responsáveis na região de interesse. No Brasil, após todo o trabalho de desenvolvimento e otimização do processo produtivo, pesquisas pré-clínicas e clínicas devem ser realizadas perante a Anvisa, organização responsável por regular, analisar e autorizar todas as vacinas e demais medicamentos distribuídos em território nacional.

Após as etapas experimentais de desenvolvimento, otimização e validação do processo produtivo em escalas laboratoriais e de bancada são realizadas as fases e estudos pré-clínicos *in vitro* e *in vivo* para verificação da farmacologia e toxicidade do novo fármaco em organismos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE PROFISSIONAIS EM PESQUISA CLÍNICA (SBPPC), 2023). Caso os resultados sejam positivos, pode ser requisitada à Anvisa a autorização para início dos ensaios clínicos em humanos. Através desse protocolo é avaliada a eficácia e a segurança do novo medicamento proposto. Em média, 12% dos fármacos autorizados a iniciar os estudos clínicos chegam a ser aprovados para comercialização (DIMASI, GRABOWSKI, *et al.*, 2016).

Antes do início da pandemia de COVID-19 o processo de estudos exploratórios e para desenvolvimento do processo, ensaios pré-clínicos e clínicos, revisão e aprovação regulatória para comercialização de novas vacinas podia levar mais de 10 anos. Contudo, com a emergência

do novo coronavírus e a demanda urgente de uma vacina eficaz e segura, o Ministério da Saúde, por meio da Anvisa e outras agências reguladoras ao redor do mundo, como FDA e EMA, estabeleceram caminhos para acelerar o processo de aprovação e disponibilização à população de um imunizante assim que fossem comprovadas a eficácia e a segurança. Contudo, com a situação controlada e decretado o fim da pandemia pela OMS, é esperado que processos de análise e aprovação de novos imunizantes para as doses de reforço não sejam tão ágeis quanto os vistos em 2020 e 2021.

Os ensaios clínicos são divididos em 3 fases necessárias para a aprovação do uso e da comercialização e uma quarta fase de estudos clínicos, a qual pode ou não ser solicitada pela agência reguladora, após o registro do novo, para acompanhamento, com os dados de cada uma das etapas detalhados na Tabela 29. A importância das etapas exploratórias e de desenvolvimento se dá no aumento da probabilidade de seleção de um medicamento e elaboração de metodologia otimizada capaz de entregar um produto com maiores chances de aprovação. As três principais fases dos ensaios clínicos de um novo fármaco são:

Fase I, com o objetivo de avaliar a segurança e capacidade de geração de resposta imune nos indivíduos vacinados. É realizada em grupos pequenos de até 100 pessoas, geralmente saudáveis (SOCIEDADE BRASILEIRA DE PROFISSIONAIS EM PESQUISA CLÍNICA (SBPPC), 2023);

Fase II, com o objetivo de acompanhar a segurança da vacina, resposta imune dos indivíduos, identificar efeitos colaterais a curto prazo e a eficácia preliminar contra infecção e avanço a casos graves da doença em um grupo de algumas centenas de indivíduos, geralmente do mesmo grupo ao qual a vacina será destinada (SOCIEDADE BRASILEIRA DE PROFISSIONAIS EM PESQUISA CLÍNICA (SBPPC), 2023). Na fase II é determinada a dosagem, o número de doses, o intervalo de tempo entre doses e a rota de administração do imunizante (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2020b);

Fase III, com o objetivo de, em um grupo randomizado e diverso de alguns milhares de indivíduos, avaliar a relação entre riscos e benefícios do novo medicamento destinada (SOCIEDADE BRASILEIRA DE PROFISSIONAIS EM PESQUISA CLÍNICA (SBPPC), 2023). Esta etapa permite identificar efeitos colaterais mais raros e a segurança em um grupo maior de pessoas e o valor terapêutico do novo imunizante (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2020b).

**Tabela 29:** Índice de aprovação por fase em ensaios clínicos

<b>Etapa</b>	<b>Índice de aprovação</b>
Fase I	59%
Fase II	35%
Fase III	62%
<b>Global</b>	<b>13%</b>

Fonte: DIMASI, *et al.*, (2016)

Para um projeto de vacina nacional e atualizável contra a COVID-19 para campanhas de vacinação de reforço anuais, foi estimado o planejamento temporal apresentado na Tabela 30. Nela são apresentadas projeções para todo o processo regulatório para a comercialização de um novo imunizante, considerando-se um cenário mais ágil do que o padrão histórico, porém mais demorado do que os processos de regulamentação das vacinas aplicadas até o momento contra a COVID-19.

Tabela 30: Horizonte temporal de etapas de desenvolvimento de uma nova vacina contra a COVID-19

<b>Etapa</b>	<b>Nº de anos</b>
Testes clínicos fase I/II	1
Testes clínicos fase III	1
Processo regulatório	1
<b>Total</b>	<b>3</b>

Fonte: Elaborada pelo autor com base nos trabalhos de LIMA (2016), TAVARES (2017)

Após aprovado, para um novo medicamento ser produzido e comercializado é preciso registrar o, neste caso, novo imunobiológico, através da apresentação do dossiê completo do produto, contendo os certificados de Boas Práticas de Fabricação (BPF), a caracterização completa do produto, descrição detalhada do processo produtivo com metodologia, materiais e equipamentos da planta produtiva e treinamento apropriado dos funcionários envolvidos na produção, além da apresentação dos resultados dos ensaios pré-clínicos e clínicos e pagamento de taxas de fiscalização sanitária para regularização da planta (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

## 5.9. PLANEJAMENTO DA PLANTA INDUSTRIAL

Após todo o processo de aprovação regulatória do novo imunizante, deve ser feita a construção e montagem da planta produtiva. Para atender às requisições sanitárias aplicáveis ao processo produtivo de um imunizante biofarmacêutico é fundamental o planejamento da estrutura de salas limpas. Neste trabalho, considerando o processo proposto, o grau de limpeza de ar requerido, os fluxos de material (MAL) e pessoas (PAL) e entradas e saídas separadas para cultivo e produto final foram seguidos os esquemas propostos por Pato (2015, apud TAVARES, 2017), que desenvolveram o estudo de viabilidade da produção de uma vacina de vírus inativado contra a febre amarela.

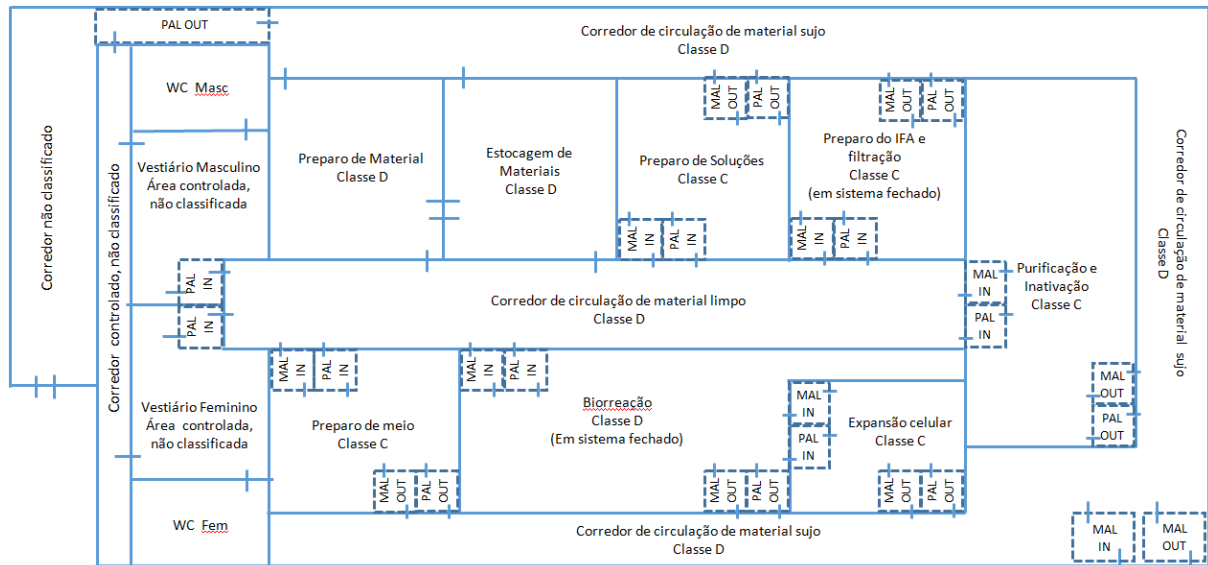
Para este trabalho foi considerado um processo de produção do IFA da vacina proposta, considerando uma parceria com uma empresa ou instituição que já possua as instalações necessárias para realizar o processamento final e envase das doses do imunizante a partir da proteína S produzida através do processo descrito neste trabalho. Neste cenário, seguiu-se o dimensionamento proposto por Tavares e Pato (2017), apresentado na Tabela 31. É apresentado na Figura 16 um *layout* preliminar de uma planta produtiva para o IFA de uma vacina, considerando a disposição das salas propostas para cada uma das etapas da produção, equipamentos considerados e vias para fluxo de materiais e pessoas.

**Tabela 31:** Metragem e classificação das salas para *layout* da planta produtiva proposta

Sala	Área (m <sup>2</sup> )	Classe
Preparo de material	5	D
Estocagem de material	5	D
Expansão celular	15	C
Preparo de meio	5	C
Cultivo (sistema fechado)	10	D
Preparo de soluções	10	C
Filtração e preparo do IFA (sistema fechado)	5	C
Corredor	40	D

Fonte: Pato (2015, apud TAVARES, 2017, p. 60)



**Figura 16:** Layout preliminar da planta produtiva de IFA de vacina

Fonte: (Pato, 2015, apud TAVARES, 2017, p. 61)

A partir dos estudos realizados por Chilima, *et al.* (2020), na Tabela 32 são apresentadas as metragens totais necessárias para a estruturação da planta industrial de produção do IFA da vacina de subunidade proteica contra a COVID-19, proposta, de acordo com todas as BPF. Também são apresentados custos de referência para cada uma das classificações. Por fim, é estimado o tempo de 2 anos para a construção de toda a estrutura descrita nesta seção, baseado nos estudos de TAVARES (2017).

**Tabela 32:** Metragem total e referências de custos para construção de salas limpas

Classificação	Área (m <sup>2</sup> )	USD/m <sup>2</sup>
A/B – Classe 1.000	0	10.052
C – Classe 10.000	35	7.377
D – Classe 100.000	60	6.140
<b>Total</b>	<b>95</b>	-

Fonte: Adaptada de TAVARES (2017) e CHILIMA, MONCAUBEIG, *et al.* (2020)

## 6. CONCLUSÕES

A COVID-19 rapidamente tornou-se a maior tragédia de saúde pública vivida por muitas gerações. Em três anos de pandemia, em todo o mundo, quase sete milhões de vidas foram perdidas e, no Brasil, dos mais de 37 milhões de casos, mais de 700 mil pessoas faleceram. Apesar de declarado o fim da pandemia pela OMS, novos desafios surgem, como a iminência de novas variantes de preocupação e a possibilidade de novos surtos como aqueles vividos nos anos anteriores.

Em resposta a essas preocupações, campanhas de vacinação de reforço contra a COVID-19 vêm sendo realizadas em todo o mundo e devem continuar por longos anos. Alternativas capazes de serem adaptadas às novas variantes visando, também, a redução da disseminação são fundamentais. No Brasil, a atividade conjunta do PNI e do SUS em fornecer e distribuir todos os imunizantes do cronograma vacinal primário da pessoa cidadã foi fator crucial na história do país para a erradicação e controle de doenças virais, e, para a COVID-19 não pode ser diferente. Contudo, dados recentes apontam que, além da disponibilização de vacinas, políticas públicas devem ser desenvolvidas para aumento da adesão da população às campanhas de reforço para o controle do cenário epidemiológico.

No mundo todo, pessoas acima dos 60 anos de idade continuam sendo o grupo mais vulnerável contra a COVID-19 e, portanto, o cuidado dele deve ser alvo de atenção redobrada dos órgãos de saúde. Além deste, crianças abaixo dos 11 anos são um dos grupos mais vulneráveis em termos de contágio e um dos principais vetores para disseminação de doenças virais, mas, em contrapartida, formam o grupo que menos recebeu doses de imunizantes até o momento. É neste cenário que este estudo se propõe a desenvolver o arcabouço técnico de um projeto produtivo industrial de IFA, baseado na proteína S de SARS-CoV-2, para produção de uma vacina nacional e atualizável contra a COVID-19 desenvolvida pelo LECC, COPPE/UFRJ, voltada a atender às demandas destes grupos da sociedade.

As etapas de projeção de demanda e análise de mercado são cruciais para a elaboração de qualquer projeto industrial. Para a vacina proposta, foram analisadas as performances das campanhas de vacinação contra *influenza*, dos anos de 2021 e 2022, e do cronograma vacinal primário contra a COVID-19. Os resultados destas campanhas, quando comparados com as projeções da população brasileira divulgadas pelo IBGE apontam a cobertura vacinal de 47%

das crianças e 77% dos idosos. Atualmente, as campanhas de reforço vacinal anual contra a COVID-19 não estão previstas pelo Ministério da Saúde da mesma forma como para os idosos. Contudo, como há a possibilidade do surgimento de novas variantes de preocupação, faz-se necessário o controle constante do número de casos. Além disso, já é reportado na literatura a COVID-19 pode provocar sequelas no médio e longo prazo, mesmo para aqueles que se recuperam da infecção. Por isso, a adição de vacinas anuais atualizadas contra a COVID-19 ao cronograma vacinal regular do Programa Nacional de Imunizações é esperada para um futuro próximo.

A partir destes dados em conjunto do planejamento temporal para validação de processos laboratoriais, três anos de ensaios clínicos e assuntos regulatórios, mais dois anos para a construção da planta produtiva do IFA e dez anos de operação, foram utilizados os dados populacionais de 2039 para a estimar a demanda por 10,9 milhões de doses anuais. Desta forma, o processo produtivo proposto se torna capaz de atender à 20% da demanda brasileira de imunizantes contra a COVID-19 para crianças e idosos. Além disso, com a incorporação da vacina proposta neste trabalho ao cronograma vacinal anual do Ministério da Saúde, há a possibilidade de que ela seja a escolha prioritária para a vacinação primária de recém nascidos, dados os benefícios da tecnologia de imunizantes baseados em subunidades proteicas. Contudo, esta não foi uma estimativa adotada para a elaboração deste trabalho.

Para atender às 10,9 milhões de doses, um projeto industrial composto por 25 bateladas alimentadas em biorreator de 500 L e operado com bolsas descartáveis foi dimensionado, de modo a produzir, anualmente, os 263,11 g de proteína S necessários. A proteína pode ser expressa por células animais recombinantes capazes de secretá-la e adaptadas ao crescimento em suspensão. Após 21 dias de propagação do inóculo para o biorreator inicial, mais doze dias de cultivo em batelada alimentada, o sobrenadante produzido é destinado às etapas de purificação. Com o tempo de preparo do inóculo do primeiro reator somado ao tempo das 25 bateladas, têm-se uma operação de 321 dias por ano. O processo de obtenção do IFA a partir do produto do cultivo começa com a filtração de 1,2  $\mu\text{m}$  e 0,45  $\mu\text{m}$ , segue para etapas cromatográficas, de afinidade, de troca iônica, multimodal e de afinidade, novamente, e termina com uma filtração esterilizante em filtro de 0,22  $\mu\text{m}$ . Ao final de todo o processo produtivo, é estimado que uma batelada seja capaz de gerar até 22,9 g de proteína S.

A partir do dimensionamento do processo e dos equipamentos necessários, próximas etapas de estudo podem envolver a análise econômica do projeto proposto, de modo a avaliar a viabilidade dele. Para tal, será necessário o entendimento das principais soluções ofertadas por

fornecedores em relação aos principais equipamentos e consumíveis necessários e a elaboração dos estudos financeiros a partir de cotações obtidas. Desta forma, a viabilidade do projeto pode ser apresentada a investidores e, eventualmente, a planta produtiva dimensionada neste trabalho pode ser construída. Com isso, uma vacina completamente nacional capaz de enfrentar os principais desafios estabelecidos pela COVID-19 pode ser disponibilizada à população brasileira.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVIM, R. G. F., LIMA, T. M., RODRIGUES, D. A. S., *et al.* "From a recombinant key antigen to an accurate, affordable serological test: Lessons learnt from COVID-19 for future pandemics", **Biochemical Engineering Journal**, v. 186, 1 ago. 2022. DOI: 10.1016/j.bej.2022.108537. .

AMABLE, P., BUTLER, M., "Cell metabolism and its control in culture". In: CASTILHO, L. R., MORAES, Â. M., AUGUSTO, E. F. P., *et al.* (Org.), **Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy**, [S.l.], Taylor & Francis, 2008. .

ANDRADE, S. A. de, DE SOUZA, D. A., TORRES, A. L., *et al.* **Pathophysiology of COVID-19: Critical Role of Hemostasis. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. [S.l.], Frontiers Media S.A. , 3 jun. 2022

ARRUDA, H. R. S., LIMA, T. M., ALVIM, R. G. F., *et al.* "Conformational stability of SARS-CoV-2 glycoprotein spike variants", **iScience**, v. 26, n. 1, 20 jan. 2023. DOI: 10.1016/j.isci.2022.105696. .

BUTLER, M., "Post-translational modification of recombinant proteins". In: CASTILHO, L. R., MORAES, Â. M., AUGUSTO, E. F. P., *et al.* (Org.), **Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy**, [S.l.], Taylor & Francis, 2008. .

CHILIMA, T. D. P., MONCAUBEIG, F., FARID, S. S. "Estimating capital investment and facility footprint in cell therapy facilities", **Biochemical Engineering Journal**, v. 155, 15 mar. 2020. DOI: 10.1016/j.bej.2019.107439. .

CHRISTIAN, H. **Começa a campanha para a vacinação de grupos prioritários com novo imunizante bivalente**. 27 fev. 2023. Rádio Senado. Disponível em: <https://www12.senado.leg.br/radio/1/noticia/2023/02/27/comeca-a-campanha-para-a-vacinacao-de-grupos-prioritarios-com-novo-imunizante-bivalente>. Acesso em: 12 jul. 2023.

DEPARTAMENTO DE MONITORAMENTO, A. e D. de I. E. em S. (DEMAS). **Painel de Distribuição de Vacinas**. . [S.l: s.n.], 2023. Disponível em: [https://infoms.saude.gov.br/extensions/DEMAs\\_C19VAC\\_Distr/DEMAs\\_C19VAC\\_Distr.html](https://infoms.saude.gov.br/extensions/DEMAs_C19VAC_Distr/DEMAs_C19VAC_Distr.html). Acesso em: 19 jun. 2023.

DIMASI, J. A., GRABOWSKI, H. G., HANSEN, R. W. "Innovation in the pharmaceutical industry: New estimates of R&D costs", **Journal of Health Economics**, v. 47, p. 20–33, 1 maio 2016. DOI: 10.1016/j.jhealeco.2016.01.012. .

ESPÍNDOLA, O. M., FULLER, T. L., DE ARAÚJO, M. F., *et al.* "Reduced ability to neutralize the Omicron variant among adults after infection and complete vaccination with BNT162b2, ChAdOx1, or CoronaVac and heterologous boosting.", **Scientific reports**, v. 13, n. 1, p. 7437, 8 maio 2023. DOI: 10.1038/s41598-023-34035-9. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/37156846>.

G1 SP. "SP registra a primeira morte pelo novo coronavírus no Brasil". São Paulo, 17 mar. 2020. Disponível em: <https://g1.globo.com/sp/sao-paulo/noticia/2020/03/17/estado-de-sp-tem-o-primeiro-caso-de-morte-provocada-pelo-coronavirus.ghtml>. Acesso em: 12 jun. 2023.

GIURLA MARTINS. **PNI: entenda como funciona um dos maiores programas de vacinação do mundo**. 3 nov. 2022. Ministério da Saúde. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2022/agosto/pni-entenda-como-funciona-um-dos-maiores-programas-de-vacinacao-do-mundo>. Acesso em: 14 jun. 2023.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Projeções da população por sexo e idades. Projeções da População do Brasil e Unidades da Federação por sexo e idade: 2010-2060**. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/sociais/populacao/9109-projecao-da-populacao.html>. Acesso em: 28 jun. 2023. , 2018

INSTITUTO BUTANTAN. **Influenza**. 2023. Disponível em: <https://butantan.gov.br/influenza>. Acesso em: 12 jun. 2023.

KALINKE, U., BAROUCH, D. H., RIZZI, R., *et al.* **Clinical development and approval of COVID-19 vaccines. Expert Review of Vaccines**. [S.l.], Taylor and Francis Ltd. , 2022

KORBER, B., FISCHER, W. M., GNANAKARAN, S., *et al.* "Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence that D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus", **Cell**, v. 182, n. 4, p. 812- 827.e19, 20 ago. 2020. DOI: 10.1016/j.cell.2020.06.043. .

KUDLAY, D., SVISTUNOV, A. **COVID-19 Vaccines: An Overview of Different Platforms**. **Bioengineering**. [S.l.], MDPI. , 1 fev. 2022

KUZEL, T. G., FU, J., ANDERSON, M., *et al.* "Effects of a booster dose of BNT162b2 on spike-binding antibodies to SARS-CoV-2 Omicron BA.2, BA.3, BA.4 and BA.5 subvariants in infection-naïve and previously-infected individuals", **Vaccine**, v. 41, n. 4, p. 879–882, 23 jan. 2023. DOI: 10.1016/j.vaccine.2022.12.049. .

LIMA, T. M. **Avaliação Técnico-econômica da Produção de um anticorpo monoclonal Biossimilar ao Evolocumabe no Brasil**. 2016. Projeto de Graduação – Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, 2016.

MACHADO, L., JUNIOR, A. F., PAULO, P. P., *et al.* **Logo após aprovação da Anvisa, governo de SP aplica em enfermeira a 1ª dose de vacina contra Covid-19 no Brasil**. 17 jan. 2021. G1 SP. Disponível em: <https://g1.globo.com/sp/sao-paulo/noticia/2021/01/17/apos-aprovacao-da-anvisa-governo-de-sp-aplica-1a-dose-da-coronavac-antes-do-inicio-do-plano-nacional-de-vacinacao.ghtml>. Acesso em: 12 jun. 2023.

MARIA MORAES, Â., LEDA DOS REIS CASTILHO, BUENO, S. M. A., "Product purification processes". **Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy**, [S.l.], Taylor & Francis, 2008. .

MARIANA GARCIA, LARA PINHEIRO. **Veja como está sendo a vacinação de crianças contra a Covid-19 no Brasil**. 5 jan. 2022. G1. Disponível em: <https://g1.globo.com/saude/coronavirus/vacinas/noticia/2022/01/05/veja-como-vai-funcionar-a-vacinacao-de-criancas-contra-covid-19.ghtml>. Acesso em: 12 jun. 2023.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Brasil confirma primeiro caso do novo coronavírus**. fev. 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/pt-br/noticias/saude-e-vigilancia-sanitaria/2020/02/brasil-confirma-primeiro-caso-do-novo-coronavirus>. Acesso em: 12 jun. 2023.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Brasil terá primeira vacina contra a Covid-19 com todas as etapas produzidas no país**. 31 out. 2022a. Disponível em: <https://www.gov.br/pt-br/noticias/saude-e-vigilancia-sanitaria/2022/01/brasil-tera-primeira-vacina-contra-a-covid-19-com-todas-as-etapas-produzidas-no-pais#:~:text=A%20previs%C3%A3o%20da%20Fio-cruz%20C3%A9,todos%20que%20desejarem%20se%20vacinar>. Acesso em: 12 jun. 2023.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Campanha Nacional de Vacinação Contra a Influenza 2022**. . [S.l.: s.n.], 2022b. Disponível em: [https://infoms.saude.gov.br/extensions/Influenza\\_2021/Influenza\\_2021.html#](https://infoms.saude.gov.br/extensions/Influenza_2021/Influenza_2021.html#). Acesso em: 18 jun. 2023.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Ministério da Saúde incorpora vacina Covid-19 para crianças de 6 meses a menores de 5 anos no SUS.** 29 dez. 2022c. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2022/dezembro/ministerio-da-saude-incorpora-vacina-covid-19-para-criancas-de-6-meses-a-menores-de-5-anos-no-sus>. Acesso em: 22 jul. 2023.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **O que é a Covid-19?** 2021a. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/coronavirus/o-que-e-o-coronavirus>. Acesso em: 14 jun. 2023.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Programa Nacional de Imunizações - PNI.** 2023a. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/coronavirus/vacinas/pni>. Acesso em: 14 maio 2023.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Resolução - RDC Nº 55, de 16 de Dezembro de 2010.** . [S.l.], Ministério da Saúde. , 2010

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Sintomas.** 2021b. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/coronavirus/sintomas>. Acesso em: 15 jun. 2023.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Vacinômetro COVID-19.** . [S.l: s.n.], 19 jun. 2023b. Disponível em: [https://infoms.saude.gov.br/extensions/SEIDIGI\\_DEMAS\\_Vacina\\_C19/SEIDIGI\\_DEMAS\\_Vacina\\_C19.html#](https://infoms.saude.gov.br/extensions/SEIDIGI_DEMAS_Vacina_C19/SEIDIGI_DEMAS_Vacina_C19.html#). Acesso em: 18 jun. 2023.

MITTAL, A., MANJUNATH, K., RANJAN, R. K., *et al.* **COVID-19 pandemic: Insights into structure, function, and hACE2 receptor recognition by SARS-CoV-2. PLoS pathogens.** [S.l.], NLM (Medline). , 1 ago. 2020

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). **OMS afirma que COVID-19 é agora caracterizada como pandemia.** mar. 2020. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/news/11-3-2020-who-characterizes-covid-19-pandemic>. Acesso em: 15 jun. 2023.

R&D BLUE PRINT. **COVID-19 - Landscape of novel coronavirus candidate vaccine development worldwide.** . [S.l: s.n.], 30 mar. 2023.

REDE GENÔMICA FIOCRUZ. **O que são linhagem e mutação.** 21 nov. 2022. Disponível em: <https://www.genomahcov.fiocruz.br/linhagens/>. Acesso em: 15 jun. 2023.



REDE GENÔMICA FIOCRUZ. **Vigilância genômica do SARS-CoV-2 no Brasil**. 2023. Disponível em: <https://www.genomahcov.fiocruz.br/dashboard-pt/>. Acesso em: 15 jun. 2023.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE E AMBIENTE. **Boletim mensal | Vigilância da COVID-19 no Brasil • Maio 2023**. . [S.l: s.n.], abr. 2023.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PROFISSIONAIS EM PESQUISA CLÍNICA (SBPPC). **Quais as fases de uma pesquisa clínica?** 2023. Disponível em: <https://www.sbppc.org.br/fases-de-uma-pesquisa-clinica>. Acesso em: 21 jun. 2023.

TAVARES, R. C. **Dimensionamento e avaliação técnico econômica de uma planta de vacina inativada de febre amarela**. 2017. Projeto Final de Curso – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

TURK, C., TURK, S. **Three critical clinicobiological phases of the human SARS-associated coronavirus infections**. . [S.l: s.n.], 2020.

UNICEF. **COVID-19 Market Dashboard**. . [S.l: s.n.], 2023. Disponível em: <https://www.unicef.org/supply/covid-19-market-dashboard>. Acesso em: 22 jun. 2023.

VÉLIZ, E. C., RODRÍGUEZ, G., CARDERO, A. F., "Bioreactors for animal cells". In: CASTILHO, L. R., MORAES, Â. M., AUGUSTO, E. F. P., *et al.* (Org.), **Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy**, [S.l: s.n.], 2008. .

VOLZ, E., HILL, V., MCCRONE, J. T., *et al.* "Evaluating the Effects of SARS-CoV-2 Spike Mutation D614G on Transmissibility and Pathogenicity", **Cell**, v. 184, n. 1, p. 64- 75.e11, 7 jan. 2021. DOI: 10.1016/j.cell.2020.11.020. .

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **A CLINICAL CASE DEFINITION FOR POST COVID-19 CONDITION IN CHILDREN AND ADOLESCENTS BY EXPERT CONSENSUS**. . [S.l: s.n.], 2023a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Coronavirus disease (COVID-19)**. 2020a. Disponível em: [https://www.who.int/health-topics/coronavirus#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/coronavirus#tab=tab_1). Acesso em: 14 jun. 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Coronavirus disease (COVID-19): Post COVID-19 condition**. 28 mar. 2023b. Disponível em: <https://www.who.int/news->

