



Avaliação preliminar da produção de proteína *spike* recombinante de SARS- COV-2 em batelada alimentada

Lucas Amorim Arnoldi

Projeto de Final de Curso

Orientadores

**Leda dos Reis Castilho, Dr.-Ing.
Priscilla Filomena Fonseca Amaral, D.Sc.
Renata Guimarães Ferreira Alvim, M.Sc.**

Julho de 2023

**Avaliação preliminar da produção de proteína *spike*
recombinante de SARS-COV-2 em batelada
alimentada**

Lucas Amorim Arnoldi

Projeto de Final de Curso submetido ao Corpo Docente da Escola de Química, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Engenheiro Químico.

Aprovado por:

Prof. Ricardo de Andrade Medronho,
D.Sc. - EQ / EPQB / UFRJ

Eng. Alvio Figueredo Cardero, D.Sc.
Bio-Manguinhos / Fiocruz

Orientado por:

Prof^ª. Leda dos Reis Castilho,
Dr.-Ing. - PEQ / COPPE / UFRJ

Prof^ª. Priscilla Filomena Fonseca do
Amaral, D.Sc.- EQ / EPQB / UFRJ

Renata Guimarães Ferreira Alvim,
M.Sc.- PEQ / COPPE / UFRJ

Rio de Janeiro, RJ - Brasil

Julho de 2023

Arnoldi, Lucas Amorim.

Avaliação preliminar da produção de proteína *spike* recombinante de SARS-COV-2 em batelada alimentada / Lucas Amorim Arnoldi. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2023.

xiv, 130 p.; il.

Projeto Final – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2023.

Orientadores: Leda dos Reis Castilho, Priscilla Filomena Fonseca Amaral e Renata Guimarães Ferreira Alvim.

1. Desenvolvimento de processos. 2. Estudo tecnológico. 3. Trabalho experimental. 4. Projeto Final. (Graduação –UFRJ/EQ). 5. Leda dos Reis Castilho, Dr.-Ing., Priscilla Filomena Fonseca Amaral, D.Sc. e Renata Guimarães Ferreira Alvim, M.Sc.

Para meus pais e Ivone.

“Our freedom to doubt was born out of a struggle against authority in the early days of science. It was a very deep and strong struggle: permit us to question — to doubt — to not be sure. I think that it is important that we do not forget this struggle and thus perhaps lose what we have gained.”

Richard P. Feynman

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus pais, que, apesar da origem humilde, sempre me mostraram o valor da educação e me incentivaram durante todos estes anos, realizando diversos sacrifícios em virtude de minha formação e sendo meu porto seguro durante todas os momentos de dificuldades. Este trabalho de conclusão de curso marca o final de uma longa jornada (e o início de novos ciclos), cheia de aprendizados, que irei levar para a vida toda e tenho total certeza que sem o apoio e trabalho árduo deles para me proporcionar a educação de melhor qualidade ao seu alcance, eu não teria chegado até aqui. Agradeço também aos meus avós, que, junto aos meus pais, formaram a pessoa que sou hoje.

Agradeço também aos grandes mestres que tive durante minha trajetória acadêmica, desde o ensino fundamental, até a graduação. Agradeço à professora Leda, que abriu as portas da Biotecnologia Farmacêutica para mim, após longas conversas ao final de suas aulas e que fizeram meus olhos brilharem pelo mundo dos biológicos. Agradeço também à professora Priscilla pelo companheirismo e paciência ao longo do desenvolvimento deste trabalho. Além disso, agradeço aos diversos outros professores com quem passei incontáveis horas conversando não apenas sobre o conteúdo de suas disciplinas.

Gostaria de agradecer também aos meus companheiros de graduação na UFRJ e também de laboratório, com quem, durante as longas horas de estudo e de experimentos, compartilhei momentos felizes e também situações difíceis e que, sem dúvida, foram fundamentais durante este processo. Deixo também um agradecimento especial à Renata, pela paciência, orientação e dedicação durante as diversas atividades experimentais envolvidas neste trabalho.

Agradeço também aos meus companheiros de GSK que sempre me incentivam e apoiam a dar continuidade aos meus estudos. Por último, gostaria agradecer a todos que fizeram parte de minha trajetória e que são muito queridos por ter feito a diferença em minha vida, me considero muito sortudo de ter encontrado diversos amigos incríveis com quem posso compartilhar esta jornada.

Resumo do Projeto de Final de Curso apresentado à Escola de Química como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Engenheiro Químico.

AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA PRODUÇÃO DE PROTEÍNA *SPIKE* DE SARS-COV-2 RECOMBINANTE EM BATELADA ALIMENTADA

Lucas Amorim Arnoldi

Julho, 2023

Orientadores: Prof^ª. Leda dos Reis Castilho, Dr.-Ing.
Prof^ª. Priscilla Filomena Fonseca Amaral, D.Sc
Renata Guimarães Ferreira Alvim, M.Sc.

A COVID-19 é uma doença viral altamente contagiosa e potencialmente letal em indivíduos idosos ou com comorbidades, tendo sido responsável pela pandemia de 2020-2023, que teve impactos socioeconômicos devastadores. Apesar do esforço científico global para o rápido desenvolvimento de vacinas capazes de produzir uma resposta imune robusta, uma grande discrepância ainda se faz presente quanto à disponibilidade destes produtos biológicos em países de menor poder econômico. Adicionalmente, frente à gama de variantes do vírus SARS-CoV-2 em circulação, plataformas vacinais prontamente atualizáveis são necessárias para conter o risco de novos eventos epidêmicos globais. Quanto ao desenvolvimento de vacinas para este patógeno, destaca-se a plataforma de imunizantes baseados em subunidades devido à sua relativamente fácil escalonabilidade e por não necessitar de produção carreada em instalações com níveis de biossegurança elevados, especialmente em países em desenvolvimento. Neste contexto, o principal alvo para o desenvolvimento desta classe de imunizantes é a proteína da espícula deste coronavírus (também conhecida como proteína *spike* ou proteína S), um antígeno capaz de estimular uma resposta potente do sistema imune e que vem sendo estudada de forma extensiva desde os surtos de SARS, em 2002-2003, e MERS, em 2012. O presente trabalho apresenta o estudo experimental e fenomenológico do desenvolvimento de um processo preliminar de batelada alimentada, que visa otimizar a produção de proteína *spike* de forma recombinante por células de mamíferos. Desta maneira, foram conduzidos cultivos em batelada e batelada alimentada em frascos agitados com linhagens recombinantes produtoras de diferentes variantes da proteína S de SARS-CoV-2, além da investigação de diferentes estratégias de alimentação e seus efeitos no comportamento celular e na produção da proteína de recombinante. Realizou-se também o estudo da modelagem fenomenológica macroscópica do processo de batelada alimentada, utilizando-se como base o modelo de Monod modificado, comparando-se os resultados obtidos com a literatura disponível. Desta maneira, foi possível realizar avaliações preliminares para o desenvolvimento do processo de produção de proteína *spike* em batelada alimentada, passível de ser aplicado no desenvolvimento de uma nova vacina subunidade recombinante, além da realização de ponderações sobre aspectos críticos a serem considerados em futuros desenvolvimentos. Ao decorrer do presente trabalho, foram gerados com sucesso *pools* de células HEK293-3F6 recombinantes capazes de expressar de maneira estável a proteína *spike* da variante ômicron de SARS-CoV-2. Adicionalmente, foi possível avaliar o perfil comportamental dos parâmetros de processo em batelada alimentada, conjuntamente com a produção de proteína S obtida para os clones gerados previamente no LECC/COPPE/UFRJ, capazes de produzir a proteína da espícula das variantes delta, D614G e gama de SARS-CoV-2, além de um *pool* de células produtoras da variante ômicron BA.2. Observou-se também que o cultivo de pior desempenho em termos de viabilidade celular e VCD foi o de menor habilidade de detoxificação de lactato extracelular. Quanto às estratégias de alimentação estudadas, foi observado que para

aquelas em que a alimentação era introduzida apenas após o 5º dia de cultivo, houve um decréscimo mais acentuado da viabilidade celular e densidade de células viáveis. Além disso, foi verificada uma influência significativa da razão entre o volume de trabalho aplicado e o volume total do frasco nos parâmetros relacionados ao crescimento celular e longevidade do cultivo. Também foi evidenciada durante os experimentos realizados a capacidade inibitória de elevadas concentrações de substrato (glicose) em relação à conversão de substrato em massa celular e formação do produto de interesse. Ademais, foi verificado que, para a produção de proteína *spike* recombinante, a estratégia de alimentação mais adequada foi a do ajuste de glicose para 3,5 g/L a partir do 4º dia de cultivo, tal qual havia sido determinado empiricamente em experimentos anteriores no laboratório. Quanto à modelagem fenomenológica macroscópica do processo de batelada alimentada, os parâmetros empíricos obtidos foram compatíveis com dados reportados na literatura para HEK293 e para outras células animais utilizadas na área de Biotecnologia Farmacêutica. Adicionalmente, o modelo utilizado, prevendo estratégia exponencial de alimentação, apresentou um ajuste capaz de descrever satisfatoriamente os resultados obtidos experimentalmente em batelada alimentada por pulsos, de maneira que, apesar da simplicidade da metodologia experimental dos modelos adotados, os pulsos de alimentação definidos em função dos dados de glicose no cultivo celular parecem ter permitido obter resultados que seriam alcançados com uma estratégia mais sofisticada de alimentação.

Abstract of Final Graduation Project presented to Escola de Química as part of the requirements for obtaining the Chemical Engineer degree.

PRELIMINARY ASSESSMENT OF THE PRODUCTION OF RECOMBINANT SPIKE PROTEIN OF SARS-COV-2 IN FED-BATCH

Lucas Amorim Arnoldi

July, 2023

Supervisors: Prof. Leda dos Reis Castilho, Dr.-Ing.
Prof. Priscilla Filomena Fonseca Amaral, D.Sc
Renata Guimarães Ferreira Alvim, M.Sc.

COVID-19 is a highly contagious and potentially lethal viral disease in elderly individuals or those with comorbidities, having been responsible for the 2020-2023 pandemic, which had devastating socioeconomic impacts. Despite the global scientific effort for the rapid development of vaccines capable of producing a robust immune response, a large discrepancy is still present regarding the availability of these biological products in countries of lower economic power. Additionally, given the range of the circulating SARS-CoV-2 variants, readily upgradable vaccine platforms are needed to contain the risk of new global epidemic events. As for the development of vaccines for this pathogen, the platform of immunizers based on subunits stands out due to its relatively easy scalability and for not requiring production carried in facilities with high biosafety levels, especially in developing countries. In this context, the main target for the development of this class of immunizers is the spike protein of this coronavirus (also known as S protein), an antigen capable of stimulating a potent response of the immune system and which has been studied extensively since the outbreaks of SARS in 2002-2003 and MERS in 2012. The present work presents the experimental and phenomenological study of the development of a preliminary process of fed batch, which aims to optimize the production of spike protein in a recombinant way by mammalian cells. Thus, batch and fed-batch cultures were conducted in ventilated shaken flasks with recombinant strains producing different variants of SARS-CoV-2 spike protein, in addition to the investigation of different feeding strategies and their effects on cellular behavior and production of recombinant protein. The study of the macroscopic phenomenological modeling of the fed-batch process was also carried out, using the modified Monod model as a basis, comparing the results obtained with the available literature. In this way, it was possible to carry out preliminary evaluations for the development of fed-batch manufacturing process of spike protein, which can be applied in the development of a new recombinant subunit vaccine, in addition to carrying out considerations on critical aspects to be considered in future developments. During the course of the present work, pools of recombinant HEK293-3F6 cells capable of stably expressing the spike protein of the omicron variant of SARS-CoV-2 were successfully generated. Additionally, it was possible to evaluate the behavioral profile of the fed-batch process parameters, together with the production of spike protein obtained for the clones previously generated at LECC/COPPE/UFRJ, capable of producing the spike protein of the delta, D614G and gamma variants of SARS-CoV-2, in addition to a pool of cells producing the omicron variant BA.2. It was also observed that the culture with the worst performance in terms of cell viability and VCD was the one with the lowest ability to detoxify extracellular lactate. Regarding the feeding strategies studied, it was observed that for those in which feeding was introduced only after the 5th day of culture, there was a more pronounced decrease in cell viability and density of viable cells. In addition, a significant influence of the ratio between the applied working volume and the total volume of the vial on the parameters related to cell growth and culture longevity was

verified. It was also evidenced during the experiments carried out the inhibitory capacity of high concentrations of substrate (glucose) in relation to the conversion of substrate into cell mass and formation of the product of interest. In addition, it was verified that, for the production of recombinant spike protein, the most appropriate feeding strategy was the adjustment of glucose to 3.5 g/L from the 4th day of culture, as had been empirically determined in previous experiments in the laboratory. Regarding the macroscopic phenomenological modeling of the fed-batch process, the empirical parameters obtained were compatible with data reported in the literature for HEK293 and for other animal cells used in Pharmaceutical Biotechnology. In addition, the model used, predicting an exponential feeding strategy, presented an adjustment that capable of satisfactorily describing the results obtained experimentally in a pulse-fed batch, so that, despite the simplicity of the experimental methodology of the adopted models, the feeding pulses defined as a function of glucose data in cell culture seem to have allowed obtaining results that would be achieved with a more sophisticated strategy of feeding.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 A COVID-19.....	3
2.1.1 Visão geral	3
2.1.2 Transmissão e aspectos clínicos.....	4
2.1.3 O SARS-CoV-2.....	6
2.1.4 A proteína da espícula (<i>spike</i>).....	10
2.2 Vacinas contra a COVID-19	11
2.2.1 Histórico de desenvolvimento.....	11
2.2.2 Principais plataformas e processos produtivos.....	12
2.2.3 Demanda global e nacional	16
2.2.4 Análise de mercado.....	20
2.3 Produção de antígenos recombinantes em células animais.....	23
2.3.1 Vacinas baseadas em subunidades de proteínas virais.....	23
2.3.2 Expressão da proteína S recombinante em células animais	25
2.3.3.1 Cultivo de células animais em batelada alimentada.....	26
2.3.3.2 Cultivo de células animais em batelada alimentada: ambiente físico	28
2.3.3.3 Cultivo de células animais em batelada alimentada: ambiente químico.....	29
2.4 Purificação	33
2.5 Desenvolvimento de novos biológicos.....	35
3. MATERIAIS E METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	40
3.1 Transfecção e geração de linhagens celulares recombinantes estáveis.....	40
3.2 Cultivo celular.....	40
3.3 Batelada alimentada e estratégias de alimentação.....	41
3.4 Detecção semi-quantitativa da produção de proteína <i>spike</i> recombinante por imunoenensaio do tipo <i>spot blot</i>	44
4. MODELAGEM FENOMENOLÓGICA DE BIOPROCESSOS	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1 Transfecção por lipofecção	51
5.2 Avaliação cinética do cultivo em batelada alimentada	54
5.3 Avaliação das estratégias de alimentação em batelada alimentada.....	59
5.4 Emprego de modelagem fenomenológica de bioprocessos para avaliar os dados experimentais..	65
6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	73
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
8. APÊNDICE.....	89
8.1 Anexo 1 – Visão geral de doses de vacina para COVID-19 entregues por fornecedor	89
8.2 Anexo 2 – Visão geral das vacinas candidatas/produzidas para COVID-19 por plataforma, estágio clínico, desenvolvedor e país	95
8.3 Anexo 3 – Preço reportado por dose de vacina para COVID-19	126

8.4 Anexo 4 – Capacidade mundial de produção de vacinas para COVID-19 por plataforma.....	129
8.5 Anexo 5 – Capacidade mundial de produção de vacinas para COVID-19 por estágio de desenvolvimento clínico.....	130

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura e características genômicas do vírus SARS-CoV-2. (a) Representação gráfica do vírus e suas respectivas proteínas estruturais. (b) Organização genômica e sequências codificantes do RNA viral. (c) Representação esquemática da glicoproteína spike. (d). Estrutura cristalográfica da proteína S (PDB ID:6VXX)	8
Figura 2: Etapas da interação vírus-hospedeiro iniciadas por reconhecimento da proteína S e ligação ao receptor ACE-2. (A) Estrutura e domínios da proteína S trimérica. (B) Etapas da interação S/SARS-CoV-2-ACE-2. (1) Estado pré-fusão. (2) Clivagem da proteína S. (3) Liberação do subdomínio S1 e interação S1/RBD-ACE-2/PD. (4) Fusão das membranas intermediada pelo subdomínio S2.....	10
Figura 3: Principais plataformas vacinais para COVID-19.....	12
Figura 4: Distribuição total acumulada de vacinas por plataforma e estado de desenvolvimento clínico.....	14
Figura 5: Doses de vacina para COVID-19 administradas a cada 100 habitantes agrupados por renda (todas as doses, incluindo doses de reforço, consideradas individualmente).....	16
Figura 6: Comparação de volume das vacinas para COVID-19 e outros imunizantes aplicados em 2021.....	17
Figura 7: Número total de pessoas de todas as idades que não receberam nenhuma dose de vacina para COVID-19 até janeiro de 2023.	18
Figura 8: Porcentagem da população completamente vacinada por país, versus custo da vacinação de 40% da população como percentual dos gastos atuais com saúde por país.....	18
Figura 9: Capacidade reportada de produção de doses de imunizantes para COVID-19.....	23
Figura 10: Comparação de diferentes condições de processo para batelada alimentada de células CHO recombinantes produtoras de proteína spike de SARS-CoV-2. A. VCD frente às diferentes temperaturas de cultivo. B. Integral da densidade de células viáveis (IVCD), produtividade específica celular (q_p) e título de produção de proteína, respectivamente, frente às diferentes condições de cultivo.....	28
Figura 11: Fluxograma do processo alternativo de purificação da proteína spike estabilizada..	34
Figura 12: Distribuição das fases dos estudos clínicos de vacinas candidatas para COVID-19 durante o cenário pandêmico..	39
Figura 13: Contador automático de células Vi-Cell XR utilizado na obtenção de dados primários.....	40
Figura 14: Disposição dos frascos Erlenmeyers ventilados no agitador orbital (à esquerda). Ilustração do cultivo em frascos agitados do tipo TubeSpin® e Erlenmeyer, respectivamente.	43
Figura 15: Análise semi-quantitativa de densitometria do spot blot para proteína S realizada pelo software gratuito ImageJ. O programa correlaciona a intensidade de pixels presentes na imagem (proporcional a concentração de proteína S) gerada através da revelação do imunoblot à área abaixo da curva, possibilitando seu equacionamento matemático.	46
Figura 16: Viabilidade celular (a) e concentração de células viáveis (b) em função do tempo de cultivo para as células transfectadas e mock, na presença de G418 sulfato, e para células parentais não transfectadas, na ausência de G418 sulfato. Início da adição de G418 sulfato marcado pela linha tracejada vertical.	52
Figura 17: Imunoblot das frações coletadas do sobrenadante de cultivo durante o tempo (em dias) de aplicação de pressão seletiva por G418 sulfato nas células recém-transfectadas (à direita) e nas células que não receberam o plasmídeo (controle negativo, mock, à esquerda).....	53
Figura 18: Viabilidade (a) e concentração de células viáveis (b) versus tempo de cultivo das células transfectadas para as condições de presença ou ausência de G418 sulfato.....	53
Figura 19: Concentração de células viáveis, glicose e lactato e viabilidade celular versus tempo de batelada alimentada para as 4 linhagens celulares avaliadas: (a) pool de células-ômicon BA.2 (HEK293-S-BA2pcDNA3.1), (b) gama-clone C9 (HEK293-UFRJvac-P1-C9), (c) delta-clone B4 (HEK293-UFRJvac-617-B4) e (d) D614G-clone F9 (HEK293-F9). As barras de erro representam o desvio padrão de duplicatas experimentais).....	56
Figura 20: Imunoblot em duplicata para estimativa da concentração de proteína S. Amostras recolhidas a partir do sobrenadante de cultivo em batelada para os clones B4/delta (HEK293-617-B4) e F9/D614G (HEK293-D614G-F9), durante o total de 10 dias de cultivo. Controle positivo de concentração conhecida à esquerda e experimentos em duplicata para cada clone à direita.	57

Figura 21: Diferentes estratégias de alimentação para cultivos de células HEK293 recombinantes produtoras da variante ômicron da proteína espícula de SARS-CoV-2. (a): considerando-se q_s e μ constantes durante o cultivo; (b): ajuste para 3,5 g/L de substrato a partir do dia 4 de cultivo; (c): ajuste para 2,5 g/L de substrato a partir do dia 6 de cultivo; (d) ajuste para 3,5 g/L de substrato a partir do dia 5 de cultivo. As barras de erro representam o desvio padrão de duplicatas experimentais. A linha tracejada vertical indica o início da alimentação.	60
Figura 22: Comparação de comportamento entre as diferentes estratégias de alimentação para cultivos de células HEK293 recombinantes produtoras da variante ômicron da proteína espícula de SARS-CoV-2. Variáveis avaliadas: (a) concentração de células viáveis (milhão/mL); (b) viabilidade celular (%); (c) glicose (g/L); (d) lactato (g/L). Estratégias: losango: considerando-se q_s e μ constantes durante o cultivo; triângulo: ajuste para 3,5 g/L de substrato a partir do dia 4 de cultivo; quadrado: ajuste para 2,5 g/L de substrato a partir do dia 5 de cultivo; cruz: ajuste para 3,5 g/L de substrato a partir do dia 5. As barras de erro representam o desvio padrão de duplicatas experimentais.	61
Figura 23: Immunoblot das frações coletadas do sobrenadante no 14º dia de cultivo. Duplicatas da esquerda para a direita: a – q_s e m considerados constantes durante todo o cultivo; b – ajuste para 3,5 g/L de substrato no 4º dia de cultivo; c – ajuste para 2,5 g/L de substrato no 5º dia de cultivo; d – ajuste para 3,5 g/L de substrato no 5º dia de cultivo.	64
Figura 24: Comparação entre os resultados obtidos experimentalmente para batelada alimentada em pulsos para células HEK293 recombinantes produtoras da variante ômicron da proteína espícula de SARS-CoV-2 por Renata G. F. Alvim, em 2022, e os obtidos através da modelagem matemática de bioprocessos previamente explicitada. À esquerda, apresenta-se a estratégia de alimentação exponencial, enquanto que à direita, a estratégia de alimentação constante. A linha pontilhada vertical representa o início da política de alimentação e da vigência do modelo adotado.	69
Figura 25: Sensibilidade da resposta de concentração celular do modelo fenomenológico macroscópico adotado frente à variação nas diferentes constantes adotadas. Variação de +25%, em verde, à esquerda. Variação de -25%, em vermelho, à direita. Efeitos estimados normalizados pela soma do quadrado da diferença entre o valor de concentração celular previsto pelo modelo e os valores de concentração celular encontrados experimentalmente para batelada alimentada em pulsos.	71

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Principais sintomas e complicações causados pela COVID-19 e suas frequências e severidades.	5
Tabela 2: Variantes de preocupação, data local de detecção, principais mutações e características. 9	
Tabela 3: Principais plataformas vacinais para COVID-19: Benefícios e desvantagens.	15
Tabela 4: Vacinas aprovadas para uso clínico no Brasil.	21
Tabela 5: Diferentes estratégias de alimentação para batelada alimentada de células CHO voltada para produção de proteínas recombinantes.	30
Tabela 6: Etapas do Desenvolvimento de Vacinas no Brasil.	36
Tabela 7: Metodologias utilizadas em estudos clínicos durante o cenário pandêmico.	37
Tabela 8: Perguntas a serem respondidas no projeto de um ensaio clínico.	37
Tabela 9: Número de participantes (estimado), duração do estudo (estimada), propósito do estudo e taxa de sucesso por fase de estudo clínico.	38
Tabela 10: Comparação entre concentração de proteína spike ou domínio RBD recombinante de SARS-CoV-2 recuperada do sobrenadante de cultivo celular e suas linhagens parentais, processo utilizado e tempo de cultivo, respectivamente.	58
Tabela 11: Valores de referência encontrados na literatura para a constante de saturação K_{glc} e de inibição K_{lac}	67
Tabela 12: Parâmetros cinéticos de Monod obtidos neste trabalho, com base em dados experimentais obtidos por Renata G. F. Alvim para a linhagem de células HEK293 produtora da proteína S da variante ômicron BA.2.	70
Tabela 13: Simulação de processo de produção de proteína spike recombinante em batelada alimentada para escala de bancada (3L) e escala piloto (15L). Simulações realizadas para processos de 7, 10 e 15 dias de duração. Os volumes (vol.) apresentados são o volume total de alimentação necessário para suprir a demanda do processo completo em mL. O custo estimado foi realizado através da cotação de 1L de solução concentrada de nutrientes HEK FS, valores atualizados em maio/2023, preço especial para projetos em combate a COVID-19.	72

1. INTRODUÇÃO

A produção de antígenos virais recombinantes, no contexto da manufatura e desenvolvimento de vacinas, é realizada em biorreatores sob condições controladas, sendo uma alternativa biotecnológica mais robusta quando comparada à produção tradicional destes imunizantes, tal como as vacinas para gripe (PONTE; PIMENTEL, 2017) e febre amarela (INSTITUTO BUTANTAN, 2021), que envolvem a inoculação viral em embriões de galinha contidos no interior de ovos livres de patógenos específicos.

A disponibilidade destes ovos especiais é o principal fator limitante na escala de produção destas vacinas, o que pode se traduzir em um cenário de escassez durante surtos epidêmicos. Isto foi, de fato, constatado em surtos recentes na África (Angola e Congo), em 2016, e no Brasil, em 2017–2018, quando houve um desabastecimento do estoque da vacina para febre amarela e tornou-se necessária a utilização de uma dose fracionada de $\frac{1}{3}$ da dose habitual (SHEARER et al., 2017; NNAJI et al., 2020).

O interesse em vacinas de subunidade recombinante é justificado, pois os antígenos, que consistem de proteínas estruturais recombinantes do vírus de interesse, podem ser produzidos sem necessidade de propagação deste agente biológico. Estas proteínas são, então, capazes de gerar resposta imunológica *in vivo*, porém, não contêm material genético viral, sendo incapazes de infectar células ou se replicar, minimizando possíveis efeitos colaterais e reações adversas de vacinas tradicionais atenuadas ou inativadas (MELLO et al., 2008).

Esta estratégia é ainda mais relevante quando considerada a realidade de países em desenvolvimento, que, muitas vezes, não dispõem de instalações de nível de biossegurança elevado prontamente disponíveis e com os recursos necessários para a manipulação de agentes virais altamente patogênicos ou infecciosos, devido aos seus elevados custos de construção e, principalmente, de operação. Ademais, em cenários epidêmicos, como a pandemia de COVID-19, há a possibilidade de escassez de imunizantes baseados em plataformas vacinais clássicas, como as citadas anteriormente, devido à crescente demanda em um curto espaço de tempo. Ressalta-se também que plataformas vacinais de desenvolvimento mais recente, como mRNA e vetores virais, ainda não se encontram consolidadas em países em desenvolvimento, ao passo que vacinas de subunidade recombinante se encontram estabelecidas em vários países de renda média e baixa, com destaque para a vacina de hepatite B.

Nota-se, portanto, a necessidade de buscar-se alternativas às vacinas tradicionais para evitar futuros cenários de escassez e conter surtos. O presente trabalho de conclusão de graduação, desenvolvido no Laboratório de Engenharia de Cultivos Celulares – LECC/COPPE/UFRJ, teve foco no estudo do modo de operação que foi previamente selecionado para a produção dos IFAs¹ de uma futura nova vacina em desenvolvimento na UFRJ baseada em proteína *spike* (proteína S). Este trabalho tem como objetivo principal a avaliação preliminar da produção de antígenos² virais recombinantes de SARS-CoV-2³ em cultivos de células HEK293⁴ em batelada alimentada, por meio de estudos de caráter experimental e teórico e através de modelagem de bioprocessos, de forma a sugerir uma

¹ IFA: ingrediente farmacêutico ativo

² Antígeno: molécula, usualmente de natureza proteica, que, quando inoculada em um organismo, provoca a produção de anticorpos específicos (MICHAELIS, 2016).

³ SARS-CoV-2: agente viral responsável pela doença COVID-19.

⁴ Células HEK293: células de rim embrionário humano.

estratégia adequada de alimentação para cultivos de células de mamíferos e auxiliar a obtenção da proteína *spike* recombinante com o menor custo possível.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este capítulo é focado em realizar uma revisão bibliográfica dos temas multidisciplinares tangentes ao escopo do projeto. À vista disso, será realizada uma breve apresentação dos temas e aspectos gerais da COVID-19 e do vírus SARS-CoV-2, da estrutura do vírion⁵ e da proteína da espícula (S), uma visão geral do panorama atual de vacinas para COVID-19 e seus desafios, além da produção de proteínas recombinantes em cultivos de células HEK293 e das etapas do desenvolvimento de biológicos.

2.1 A COVID-19

2.1.1 Visão geral

A COVID-19 é uma doença viral altamente contagiosa causada pelo patógeno SARS-CoV-2, que é um vírus de ácido ribonucleico (RNA) de cadeia simples positiva da família *Coronaviridae* e com diâmetro médio de 60 a 140 nm (ZHU *et al.*, 2020). Os coronavírus (CoVs) são divididos em quatro subfamílias: alfa, beta, gama e delta, sendo os beta-coronavírus, família à qual pertence o SARS-CoV-2, majoritariamente mantidos na natureza por morcegos hospedeiros. Estes morcegos servem de reservatório viral para, dentre outros vírus, os coronavírus (ESAKANDARI *et al.*, 2020). É relevante também que os coronavírus representam, aproximadamente, 35% dos vírus portados por estes animais silvestres (HUANG *et al.*, 2020). Acredita-se que o SARS-CoV-2 tenha sido originado em morcegos da espécie *Rhinolophus affinis*, devido à correspondência de 96,2% de sua identidade genômica com o vírus BatCoV RaTG13, natural destes mamíferos presentes na província Iunã, na China (ZHOU *et al.*, 2020).

É importante ressaltar também que as zoonoses⁶ causadas por CoVs são tradicionalmente transmitidas por animais intermediários aos seres humanos (CUI; LI; SHI, 2019), o que sugere a possibilidade de que a transmissão do SARS-CoV-2 ao homem tenha sido mediada através do envolvimento de outros animais. Posto isto, destacam-se os CoVs encontrados em pangolins. A partir do material isolado do tecido pulmonar destes animais, verificou-se que os CoVs ali detectados apresentavam cerca de 91% de seu genoma homólogo ao do SARS-CoV-2, estando apenas atrás do BatCoV RaTG13 (que aflige morcegos) em semelhança genética. Realça-se, ainda, que os CoVs presentes em pangolins são os que possuem maior homologia da subunidade S1 da proteína *spike* em relação à do patógeno causador da COVID-19, quando comparado a subunidade S1 da proteína presente na estrutura do CoV RaTG13 (ZHANG; WU; ZHANG, 2020), por exemplo.

Estima-se que o surto de COVID-19, inicialmente reportado em Wuhan, na China, em dezembro de 2019 e, posteriormente, declarado pandemia global pela Organização Mundial da Saúde (OMS), em março de 2020, possa ter causado um impacto real de mais de 17,2 milhões de mortes mundialmente (estimativas médias de SACHS *et al.*, 2022 adaptadas de dados do *Institute for Health Metrics and Evaluation*, 2022), com um total de 6,95 milhões de mortes oficialmente confirmadas até julho de 2023 (OMS, 2023a). Os impactos da pandemia de COVID-19 foram especialmente devastadores no Brasil, país que foi acometido pelo maior número proporcional de mortes por 1000 habitantes na América Latina. Esse excessivo número de fatalidades pode ser justificado, parcialmente, devido a

⁵ Vírion: partícula viral madura em sua forma integral infecciosa.

⁶ Zoonose: doença que pode ser transmitida aos seres humanos por animais, como a raiva, por exemplo (MICHAELIS, 2016).

fatores como a grande desigualdade social, dificuldade de acesso a insumos de higiene pessoal e água encanada, políticas socioeconômicas e sanitárias ineficazes em vigor (LANCET, 2020).

É importante ressaltar também que os severos impactos globais causados pela rápida propagação do SARS-CoV-2 devem-se a uma multiplicidade de fatores complexos, como dificuldade de cooperação internacional, ausência de uma rede de notificações de casos capaz de reagir a tempo ao surto, lentidão na implementação global de medidas para desacelerar as vias de exposição ao vírus, falha de governos em adotar práticas recomendadas para o controle do evento pandêmico, dificuldades logísticas e ausência de testes prontamente disponíveis, desinformação (SACHS *et al.*, 2022), dentre outros. Este conjunto de fatores, portanto, levou este surto epidêmico a ser considerado como a emergência de saúde global de maiores consequências desde a pandemia de influenza de 1918 (CASCELLA *et al.*, 2022).

Diante do contexto exposto, reitera-se a importância do desenvolvimento e ampla disponibilização de vacinas, que são consideradas a maior ferramenta de saúde pública já desenvolvida pela humanidade e foi a principal ferramenta tecnológica responsável pelo controle eficaz de nove das maiores doenças que afetam a humanidade: varíola, difteria, coqueluche, tétano, febre amarela, poliomielite, sarampo, caxumba e rubéola (HANSSON; NYGREN; STÅHL, 2000). É inegável que o surgimento das primeiras vacinas para COVID-19 foi essencial para a mudança de cenário da pandemia, com significativa redução no número de hospitalizações em decorrência de complicações da doença globalmente, além de queda no registro de novos casos e mortes confirmadas, mesmo frente ao surgimento de novas variantes e declínio da resposta imune induzida ao longo do tempo (ROSENBERG *et al.*, 2022). O panorama do desenvolvimento de novas vacinas para a COVID-19 será abordado mais adiante neste capítulo.

2.1.2 Transmissão e aspectos clínicos

As principais vias de transmissão do SARS-CoV-2 entre humanos incluem contato direto com gotículas contaminadas por via oral, nasal e, também, através da mucosa dos olhos, além da inalação direta de partículas virais presentes em gotículas suspensas no ar após tosse ou espirro de pessoas infectadas (RIOU; ALTHAUS, 2020). O uso de máscaras e outras formas de isolamento físico são de extrema importância, devido à capacidade destas gotículas contaminadas, de diâmetro médio menor que 5 micrometros, permanecerem no ar por longos períodos de tempo, possuindo, ainda, facilidade de dispersão por distâncias maiores que 1 metro (DANCER *et al.*, 2020).

Quanto aos aspectos clínicos, a COVID-19 apresenta-se em quadros variados, podendo manifestar-se na forma de sintomas leves a severos, ou, até mesmo, ocorrer de maneira assintomática. A proporção dos casos assintomáticos é relevante para determinação de ações de saúde pública e para estimar o verdadeiro impacto da doença. Recentes meta-análises de estudos publicados e bases de dados disponíveis na literatura estimam uma ocorrência assintomática de, aproximadamente, 1 em cada 6 casos, porém, ressalta-se a significativa heterogeneidade nos dados (BYAMBASUREN *et al.*, 2020; HE *et al.*, 2020).

O período de incubação desta doença é, comumente, de 1 a 14 dias e, para os casos sintomáticos, inicia-se com irritações respiratórias leves, acrescido ou não de febre e/ou tosse (HUANG *et al.*, 2020). Além dos sintomas clássicos de enfermidades respiratórias, a COVID-19 pode evoluir para quadros mais agressivos, onde podem ocorrer complicações associadas à pneumonia, sepse e falência dos pulmões, podendo afetar também outros

órgãos do corpo (ESAKANDARI *et al.*, 2020). Os principais sintomas e complicações causados pelo SARS-CoV-2 são sumarizados na Tabela 1 abaixo.

Tabela 1: Principais sintomas e complicações causados pela COVID-19 e suas frequências e severidades.

Frequência	Sintomas	Severidade
Comum	Tosse; febre; fadiga; dores no corpo e/ou na garganta; falta de ar; irritações na pele.	Baixa
Incomum	Dores de cabeça; congestão nasal; perda de olfato e/ou paladar; expectoração; dores nas juntas e/ou musculares; calafrios.	Baixa
Incomum	Dificuldade para respirar; náusea e/ou vomito; diarreia	Moderada
Raro	Pneumonia; tosse acompanhada de sangue; leucopenia ⁷ ; trombocitopenia ⁸ ; sangue ou proteína na urina; dano ou inflamação do miocárdio; insuficiência ou lesões de órgãos.	Alta

Fonte: Adaptado de ESAKANDARI et al., 2020 & CASCELLA et al., 2022.

A pneumonia resultante da infecção por SARS-CoV-2 é dividida em 2 estágios principais. A primeira fase, que é caracterizada pela replicação viral, resulta em dano ao tecido pulmonar diretamente, causado pela ação do vírus. Já a segunda fase, ocorre quando as células hospedeiras infectadas desencadeiam uma resposta imune descontrolada, frequentemente também referida como “tempestade de citocinas⁹”, causando inflamação local e sistêmica ao realizar o recrutamento de células como linfócitos T¹⁰, monócitos¹¹ e neutrófilos¹², que liberam diversas citocinas de ação pró-inflamatória, dentre elas o fator de necrose tumoral alfa, interleucinas e o interferon-gama (CASCELLA *et al.*, 2022).

A COVID-19 representa o maior risco para pacientes idosos e imunossuprimidos, que correntemente apresentam uma resposta imunológica enfraquecida, além de indivíduos com comorbidades, como enfermidades patológicas pulmonares e/ou cardíacas, obesidade, hipertensão ou diabetes. Este grupo de risco pode apresentar versões mais graves da doença, com sintomas respiratórios de maior severidade. Durante a pandemia de COVID-19, o controle clínico de quadros da doença foi baseado, principalmente, no alívio dos sintomas e, em casos severos, suporte de oxigênio e ventilação mecânica, sem tratamento

⁷ Leucopenia: redução anormal do número de leucócitos no sangue (MICHAELIS, 2016).

⁸ Trombocitopenia: redução persistente do número de plaquetas no sangue (MICHAELIS, 2016).

⁹ Citocinas: sinalizadores químicos que estimulam células, como neutrófilos e monócitos, aumentam a permeabilidade de capilares sanguíneos e estimulam leucócitos moverem-se ao local da resposta imune (LOPES; AMARAL, 2011).

¹⁰ Linfócitos T: células do sistema imune ativadas por células apresentadoras de antígenos específicos. Com esta ativação, os linfócitos começam a se replicar, produzindo clones capazes de auxiliar na remoção do antígeno (LOPES; AMARAL, 2011).

¹¹ Monócitos: células que circulam no interior dos vasos sanguíneos e, ao passarem para os tecidos, se diferenciam em macrófagos (LOPES; AMARAL, 2011).

¹² Neutrófilos: tal como os macrófagos, quando encontram um antígeno, se ligam por meio de receptores, englobando o antígeno e/ou microorganismo através de fagocitose (LOPES; AMARAL, 2011).

antiviral específico para o SARS-CoV-2 (ESAKANDARI *et al.*, 2020).

2.1.3 O SARS-CoV-2

O vírus SARS-CoV-2, assim como outros patógenos da família *Coronaviridae*, apresenta sua morfologia esférica, semelhante a uma coroa solar, quando visto sob microscópio eletrônico. A partir desta observação, que se estende aos outros membros desta família, conseqüentemente, originou-se o nome coronavírus. Este aspecto estrutural do SARS-CoV-2 é decorrente da presença da proteína estrutural da espícula (do inglês, *spike*), que é uma glicoproteína altamente glicosilada e distribuída de forma protuberante por toda a superfície do vírion. A proteína S e a proteína M¹³ representam as principais proteínas ancoradas na superfície viral (ESAKANDARI *et al.*, 2020).

A estrutura genômica deste coronavírus é de aproximadamente 29,9 kb, sendo de ordem de grandeza similar à de outros CoVs causadores de síndromes respiratórias agudas graves (SARS). Seu genoma é composto de uma fita simples de RNA positiva e de sequência de tradução 5'-líder-UTRs-replicase-S-E-M-N-3'UTR-poli-A, além da presença de fases de leitura abertas (do inglês, *open reading frames*, ou ORFs), que codificam proteínas não estruturais do vírus. Estas ORFs são seguidas, em ordem de tradução, das sequências codificantes das proteínas S, E¹⁴, M e N¹⁵ do vírion, respectivamente (HASSINE, 2021), conforme demonstrado esquematicamente na Figura 1. Não obstante, estas proteínas não estruturais, apesar de não constituírem a estrutura do vírion, desempenham importante papel na replicação e amadurecimento das partículas virais (PALMEIRA, 2021).

Assim como outros vírus de RNA, o patógeno responsável pela COVID-19 é propenso à evolução genômica decorrente do acúmulo de mutações em seu material genético ao longo do tempo. Este fato fomenta o surgimento de novas variantes, conforme a propagação da doença ocorre na população, as quais apresentam características que podem diferir da cepa ancestral (CASCELLA *et al.*, 2022). Não obstante, grande parte das mutações virais é evolutivamente prejudicial ao vírus, sendo rapidamente eliminada, ou, neutra, não apresentando impactos no fenótipo viral. Apenas uma pequena parcela destas mutações resulta em efeitos cumulativos que impactam características biológicas do vírus, de forma a torná-lo mais transmissível e/ou com patogenicidade mais acentuada, infectividade e antigenicidade (ARRUDA *et al.*, 2023).

Um número significativo de variantes da cepa de SARS-CoV-2 parental surgiu ao longo da pandemia iniciada em Wuhan, mas apenas parte delas representam uma maior ameaça para a saúde pública global, sendo estas classificadas como variantes de preocupação (do inglês, *variants of concern*, ou VOC) pela OMS (Organização Mundial de Saúde). Esta divisão se deve por estas variantes possuírem características como elevada transmissibilidade, virulência, maior resistência às medidas de saúde coletiva ou às vacinas e terapias atualmente disponíveis (OMS, 2022a). No que concerne as VOCs, cinco principais variantes foram identificadas, até o momento: alfa (B.1.1.7), beta (B.1.351), gama (P.1), delta (B.1.617.2) e ômicron (B.1.1.529), que se sobressaem devido à ocorrência de diversas mutações que potencializam uma ou mais das características patogênicas do vírus (Tabela 1 e Tabela 2). O advento destas VOCs é esperado durante decorrer de um surto pandêmico, pois fatores, como o aprimoramento de imunidade entre os hospedeiros por

¹³ Proteína M: glicoproteína de membrana viral.

¹⁴ Proteína E: glicoproteína do envelope viral.

¹⁵ Proteína N: glicoproteína do nucleocapsídeo viral.

resultado de infecção com o patógeno ou vacinação e medidas de intervenção pública (como o distanciamento social), dentre outros, geram uma pressão adaptativa que cria um ambiente propício para mudanças fenotípicas no vírus (ARRUDA *et al.*, 2023).

As primeiras vacinas produzidas a partir da cepa original do SARS-CoV-2 se mostraram altamente eficazes contra a condição severa da doença e fatalidades, fato observado tanto para a cepa original quanto para as variantes. Com o surgimento das VOCs beta, delta e ômicron, reduções na proteção contra infecção viral foram observadas, ainda que tenha sido mantida a elevada efetividade contra desenvolvimentos severos da enfermidade. Contudo, a cada nova variante, foi observada uma maior capacidade do vírus de evadir a proteção induzida anteriormente por imunização, o que, conseqüentemente, mantém o vírus em circulação, facilitando o possível surgimento de novas variantes.

No caso da variante ômicron, que possui um número significativo de mutações nos genes codificantes do domínio RBD¹⁶ da proteína S (vide Tabela 2), observa-se maior transmissibilidade e uma elevada taxa de quadros de reinfecção de indivíduos que haviam sido acometidos pela doença anteriormente ao surgimento desta variante (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2021). Este fato ressalta a importância da pesquisa e desenvolvimento de vacinas multivalentes que utilizam plataformas adaptáveis, as quais podem ser prontamente atualizadas conforme a detecção de novas variantes capazes de evadir a ação neutralizante dos anticorpos induzidos por imunização/infecção.

¹⁶ RBD (*receptor-binding domain*): Região da proteína S onde ocorre a identificação e ligação com o receptor celular humano ACE-2 (TAI *et al.*, 2020).

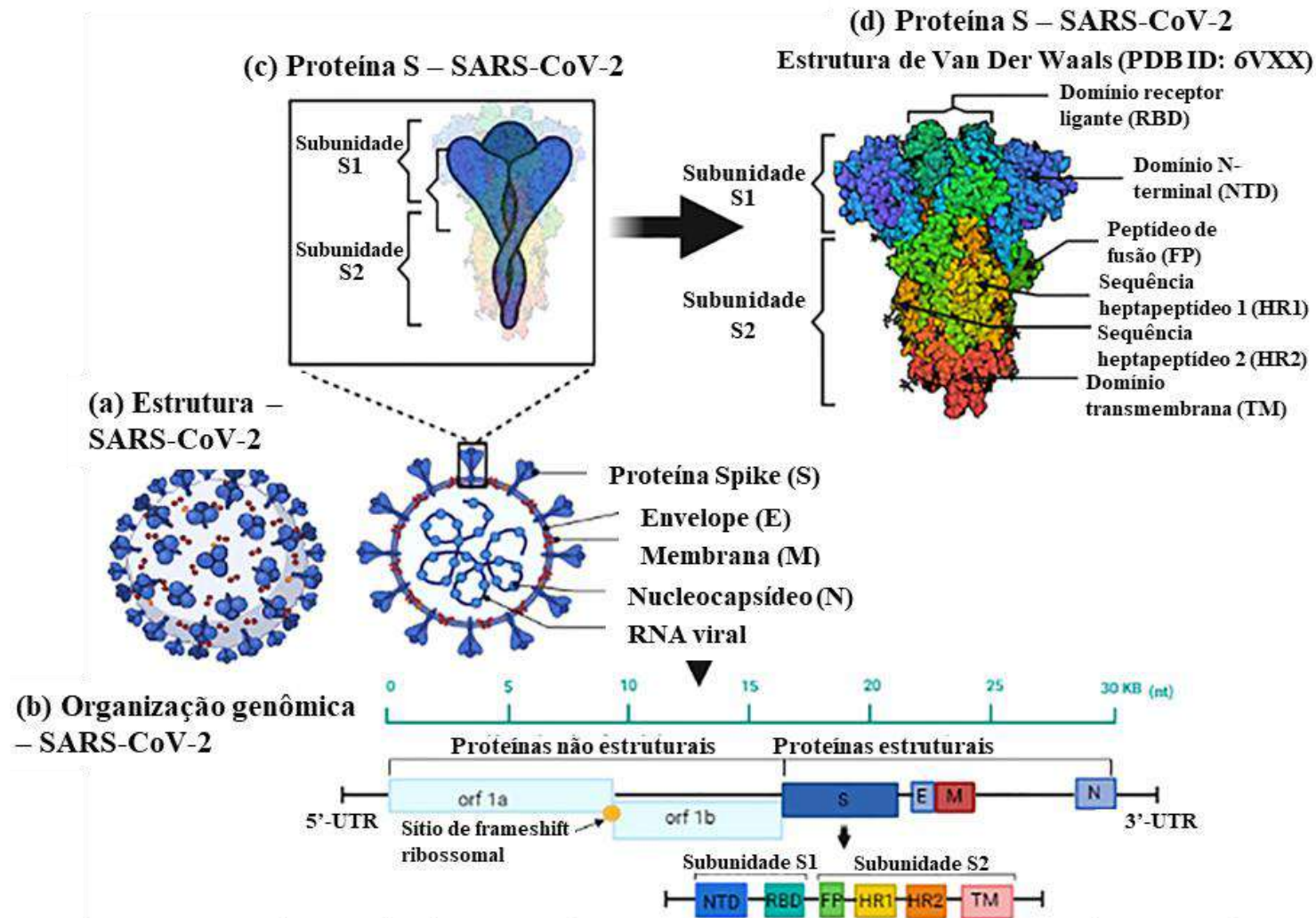


Figura 1: Estrutura e características genômicas do vírus SARS-CoV-2. (a) Representação gráfica do vírus e suas respectivas proteínas estruturais. (b) Organização genômica e sequências codificantes do RNA viral. (c) Representação esquemática da glicoproteína spike. (d). Estrutura cristalográfica da proteína S (PDB ID:6VXX). Fonte: Adaptado de HASSINE, 2021.

Tabela 2: Variantes de preocupação, data local de detecção, principais mutações e características.

Variante de Preocupação	Inicialmente reportado	Mutações	Efeitos observados
Alpha (B.1.1.7)	Reino Unido, dezembro de 2020	17 mutações, 08 atreladas a proteína S (deleção Δ 69-70, deleção Δ 144, N501Y, A570D, P681H, T716I, S982A e D1118H)	Maior afinidade aos receptores ACE-2 ¹⁷ ; aprimoramento da capacidade de anexação do vírus e entrada nas células hospedeiras; transmissibilidade elevada em até 82%; severidade da doença aumentada
Beta (B.1.351)	África do Sul, dezembro de 2020	09 mutações na proteína S (L18F, D80A, D215G, R246I, K417N, E484K, N501Y, D614G e A701V), das quais 03 localizam-se no domínio RBD (K417N, E484K e N501Y)	Resultou na segunda onda de infecções em diversos países; maior afinidade aos receptores ACE-2; maior transmissibilidade; maior resistência a neutralização por anticorpos correspondentes a cepa original
Gamma (P.1)	Brasil, janeiro de 2021	10 mutações na proteína S (L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, H655Y, T1027I V1176, K417T, E484K e N501Y), das quais 03 localizam-se no domínio RBD (L18F, K417N e E484K)	Variante com redução notável na neutralização por anticorpos correspondentes a cepa original. Responsável pela segunda e pior onda letal de infecções no Brasil.
Delta (B.1.617.2)	Índia, dezembro de 2020	10 mutações na proteína S (T19R, (G142D*), 156del, 157del, R158G, L452R, T478K, D614G, P681R e D950N)	Responsável pela segunda onda letal de infecções na Índia; maior mortalidade; alta transmissibilidade.
Ômicron (B.1.1.529)	África do Sul, novembro de 2021	Mais de 30 mutações na proteína S (destacando-se 09 no domínio N-terminal e 15 no domínio RBD), além de 01 mutação na proteína E, 06 na proteína N, 03 na proteína M	Rápida disseminação; aumento de 13x na transmissibilidade em relação à cepa original (2,8x em relação à variante delta); redução notável na neutralização por anticorpos correspondentes a cepa original; variante predominante no cenário atual

Fonte: Adaptado de CASCELLA et al., 2022.

¹⁷ ACE-2 (angiotensin-converting enzyme 2): enzima conversora de angiotensina 2.

2.1.4 A proteína da espícula (*spike*)

Presente na dupla camada fosfolipídica viral, a proteína S é uma glicoproteína solúvel que compõe todos os coronavírus e é a responsável por mediar a fusão do vírus com a célula hospedeira (WALLS *et al.*, 2021). Esta proteína, que é a principal glicoproteína do envelope viral (ARRUDA *et al.*, 2023), é composta por duas subunidades: S1, que contém o domínio N-terminal (NTD) e o domínio RBD de ligação ao receptor ACE2, e a subunidade S2, que consiste principalmente de um peptídeo interno de fusão de membrana (FP), duas sequências de heptapeptídeos (HR1 e HR2) e domínio transmembrana (TM) (HASSINE, 2021), conforme elucidado anteriormente na Figura 1. Assim como o SARS-CoV (CUI; LI; SHI, 2018), é através da proteína *spike* que o patógeno causador da COVID-19 realiza o reconhecimento da superfície celular por meio do receptor celular ACE-2, que está presente nas superfícies de diversos órgãos, como pulmão, coração, rins e intestinos em humanos (YAN *et al.*, 2020).

Quando ocorre a infecção viral, a proteína da espícula, presente na superfície do SARS-CoV-2 é clivada nas suas subunidades S1 e S2, previamente explicitadas. Como consequência desta separação, a subunidade S1, que contém o domínio RBD, sofre um rearranjo para a conformação de fusão da glicoproteína. A partir desta liberação do domínio RBD, possibilita-se o reconhecimento e ligação da subunidade S1 ao domínio peptidase (PD) do receptor ACE2, enquanto que a subunidade S2 realiza a fusão com a membrana da célula humana. Este processo sequencial e complexo, requer a interação com o receptor ACE2 e posterior processamento proteolítico da proteína S para promover a fusão intermembrana (WALLS *et al.*, 2021), é elucidado visualmente na Figura 2 abaixo. Ressalta-se que os anticorpos de capacidade neutralizante são voltados para a proteína *spike* trimérica na conformação pré-fusão.

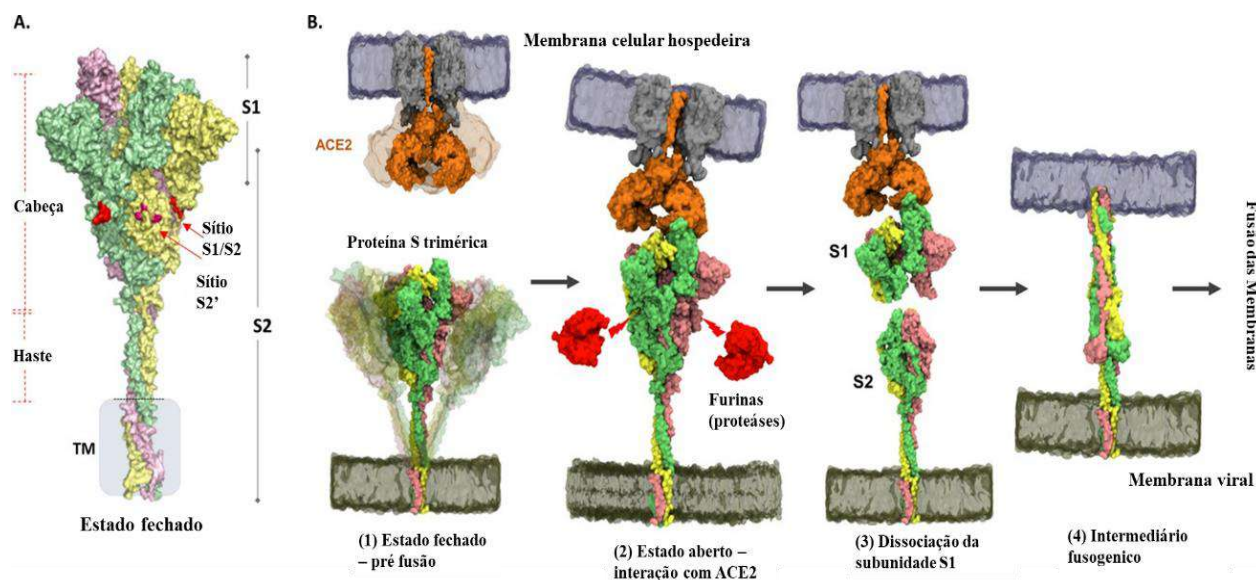


Figura 2: Etapas da interação vírus-hospedeiro iniciadas por reconhecimento da proteína S e ligação ao receptor ACE-2. (A) Estrutura e domínios da proteína S trimérica. (B) Etapas da interação S/SARS-CoV-2-ACE-2. (1) Estado pré-fusão. (2) Clivagem da proteína S. (3) Liberação do subdomínio S1 e interação S1/RBD-ACE-2/PD. (4) Fusão das membranas intermediada pelo subdomínio S2. Fonte: Adaptado de RAGHUVAMSI *et al.*, 2021.

Posto isto, é notável que a proteína *spike* do SARS-CoV-2 é um alvo particularmente interessante e promissor para o desenvolvimento de terapias e vacinas para COVID-19 e para a geração de anticorpos neutralizantes, devido ao seu papel expressivo no reconhecimento celular, fusão e entrada na célula hospedeira. Isto é sustentado pelo fato de a imunização de animais com antígenos baseados no subdomínio S1 recombinante ser capaz de elicitar uma forte resposta neutralizante, provavelmente, devido à formação dos anticorpos anti-RBD e outros anticorpos direcionados aos epítomos¹⁸ da proteína S, como o domínio N-terminal (LEÓN *et al.*, 2021), o que a torna de significativa relevância para o desenvolvimento de imunizantes baseados em subunidades virais, conforme apresentado.

2.2 Vacinas contra a COVID-19

2.2.1 Histórico de desenvolvimento

Apesar de existirem relatos de que os vírus pertencentes à família *Coronaviridae* já infectam seres humanos há algum tempo, tendo sido detectados quatro CoVs de origem zoonótica, os sintomas se limitavam a resfriados comuns (KRAMMER, 2020) e, por isso, estes agentes virais não eram considerados como altamente patogênicos até a ocorrência dos surtos de SARS¹⁹, em 2002 e 2003, na província Guangdong, na China e, posteriormente, dos surtos de MERS²⁰, causados pelo MERS-CoV no Oriente Médio (CUI; LI; SHI, 2018). Não obstante, alguns autores cogitam que o beta-coronavírus OC43 poderia ter sido o real agente causador da pandemia de “gripe Russa” de 1889-1890 (KRAMMER, 2020), podendo este ser o primeiro evento de surto causado por um coronavírus (BERCHE, 2022).

Anteriormente, nenhuma vacina ou tratamento antiviral para uso em humanos havia sido licenciado para viroses causadas por CoVs, pois estas eram consideradas de baixa prioridade, dado que os coronavírus que circulavam entre humanos causavam apenas sintomas relativamente leves em adultos saudáveis (GRAHAM; DONALDSON; BARIC, 2013 e KRAMMER, 2020). O interesse no desenvolvimento de imunizantes contra estes agentes patogênicos cresceu durante o surto de SARS-CoV em 2002-2003, causador de 10-50% de mortalidade entre indivíduos infectados, dependendo de fatores como idade e comorbidades pré-existentes (GRAHAM; DONALDSON; BARIC, 2013). Posto isto, duas vacinas candidatas para SARS-CoV alcançaram a fase 1 de testes clínicos, porém, seu desenvolvimento foi interrompido devido à aparente erradicação do vírus dentre a população humana (KRAMMER, 2020).

Adicionalmente, com os surtos inicialmente identificados na Arábia Saudita, em 2012, causados pelo MERS-CoV, que possui taxa de mortalidade de cerca de 50% entre os pacientes que buscam auxílio médico (YONG *et al.*, 2019; GRAHAM; DONALDSON; BARIC, 2013), reacendeu-se o interesse pelo desenvolvimento de novas vacinas candidatas para os coronavírus, sendo este fomento suportado pela Coalização para Inovação em Preparação para Epidemias, CEPI²¹ (KRAMMER, 2020) com o objetivo de prevenir futuros cenários epidêmicos. Os imunizantes em desenvolvimento para este CoV são primariamente focados na proteína da espícula como alvo antigênico, devido ao seu

¹⁸ Epítomo: componente estrutural de um antígeno onde ocorre o reconhecimento e interação com o anticorpo específico (MICHAELIS, 2016).

¹⁹ SARS (*Severe Acute Respiratory Syndrome*): Síndrome Respiratória Aguda Grave.

²⁰ MERS (*Middle East Respiratory Syndrome*): Síndrome Respiratória do Oriente Médio.

²¹ CEPI (*Coalition for Epidemic Preparedness Innovations*): é uma parceria global filantrópica que trabalha para acelerar o desenvolvimento de vacinas contra ameaças epidêmicas e pandêmicas (CEPI, 2023).

papel chave na infectividade viral (YONG *et al.*, 2019), conforme discutido previamente.

Devido aos estudos acerca dos vírus SARS-CoV e MERS-CoV, foi gerado um robusto conhecimento técnico-científico sobre o alvo antigênico para o desenvolvimento de futuras vacinas para os coronavírus. A proteína *spike* é a principal proteína de superfície da maioria dos CoVs existentes. Além disso, os estudos pré-clínicos e clínicos desenvolvidos na época demonstraram que uma forte resposta imune é gerada em relação ao domínio RBD da proteína S, de forma que é induzida a produção de anticorpos efetivos em prevenir o ataque do vírus à célula hospedeira, garantindo a neutralização do agente patogênico (KRAMMER, 2020). Este fato foi essencial para propulsionar o rápido desenvolvimento das vacinas para a COVID-19 no período recente.

2.2.2 Principais plataformas e processos produtivos

A evolução do processo de desenvolvimento e aprovação de novos imunizantes atingiu um marco durante a pandemia de COVID-19. Plataformas vacinais inovadoras foram aprovadas para uso humano pelas agências regulatórias e, então, os produtos biológicos assim gerados foram rapidamente disponibilizados para conter o avanço da pandemia, como é o caso das vacinas à base das tecnologias de DNA e RNA. Isso se deu devido a um esforço coletivo de grupos de pesquisa mundialmente, os quais foram capazes de coordenar diversas etapas do desenvolvimento destes biológicos em paralelo a partir do isolamento do genoma viral, mantendo os padrões de qualidade e segurança ao paciente exigidos e monitorados pelas agências regulatórias.

As principais plataformas vacinais para a COVID-19 aprovadas para uso clínico podem ser divididas em três grandes grupos (HASSINE, 2021), sendo estes: vacinas compostas por vírus inteiro, que são a forma mais clássica de desenvolvimento de vacinas eficazes e seguras conhecida pela humanidade; as baseadas em ácidos nucleicos, recentemente aprovadas pela primeira vez; e as baseadas em subunidade, que são o foco deste trabalho e serão exploradas mais a fundo no subtópico 2.3 (Figura 3).

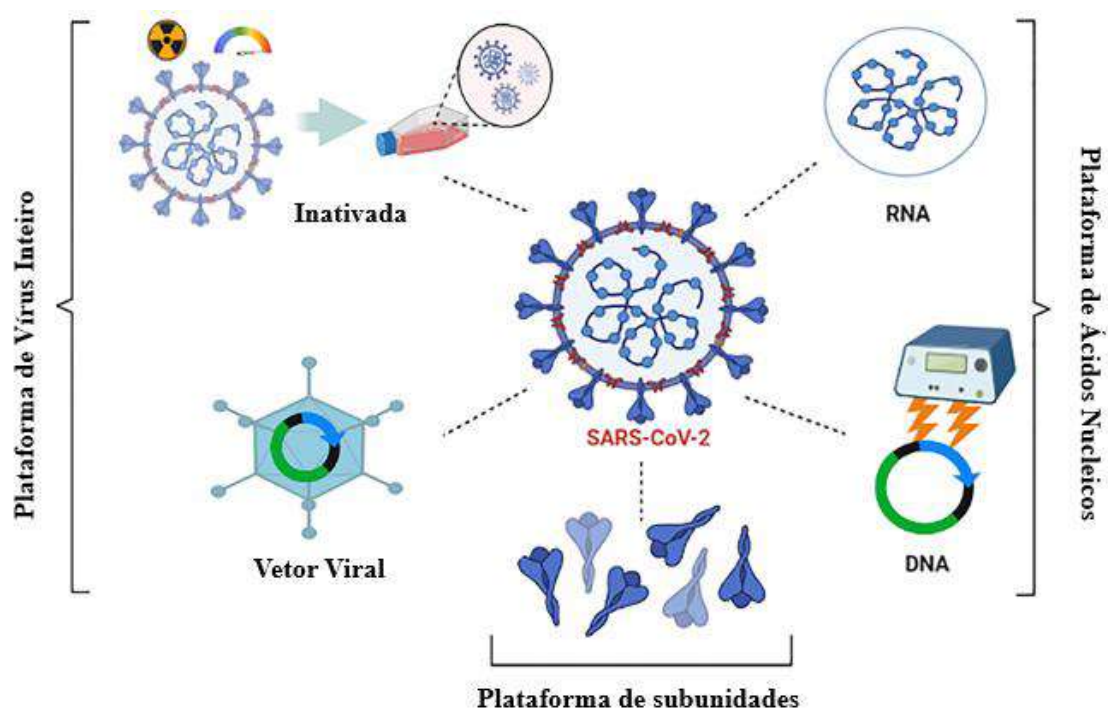


Figura 3: Principais plataformas vacinais para COVID-19. Fonte: Adaptado de HASSINE, 2021.

As plataformas baseadas em vírus inteiro são baseadas no emprego de partículas virais que foram inativadas por calor, radiação ou agentes químicos, denominada vacina inativada (HASSINE, 2021), ou que sofreram passagem de cultivos sequenciais em modelos animais, método que é empírico e repetitivo, resultando em versões atenuadas do vírus, denominada vacina atenuada (GRAHAM; MASCOLA; FAUCI, 2018). Estes processos são custosos e longos, necessitando-se de laboratórios com instalações adequadas para o manuseio e o cultivo em massa destes agentes patogênicos de forma segura e controlada, o que impõe desafios para se atingir uma produção rentável. Além disso, no caso das vacinas atenuadas, existe o risco de reversão para uma versão patogênica do vírus, especialmente em indivíduos imunocomprometidos e crianças, e, ainda, há a possibilidade de transmissão do vírus atenuado para pessoas não vacinadas (HANSSON; NYGREN; STÅHL, 2000). Estes métodos são os classicamente utilizados nas vacinas de poliomielite e gripe disponíveis no mercado (HASSINE, 2021). Devido a estas limitações e gargalos, o processo de descoberta até a disponibilização de um novo imunizante tomava, tipicamente, entre 4 e 20 anos, além de todos os desafios logísticos posteriores (GRAHAM; MASCOLA; FAUCI, 2018).

Uma alternativa para a necessidade do cultivo de patógenos responsáveis por causar a doença tal qual se deseja desenvolver um imunizante são as vacinas baseadas em vetores virais, que utilizam um vírus “seguro”, incapaz de causar doenças em humanos saudáveis, que pode ser ou não geneticamente capaz de se replicar, e que possui seu genoma modificado para expressar os antígenos de interesse, estimulando uma resposta imunológica ao entrar em contato com o organismo. Essa técnica é a empregada na vacina para Ebola Ad26.ZEBOV-GP, por exemplo, que utiliza um adenovírus-26²² como vetor viral replicante capaz de expressar a principal glicoproteína imunogênica da variante Mayinga deste patógeno (HASSINE, 2021).

Por outro lado, as vacinas baseadas em ácidos nucleicos prometem um desenvolvimento muito mais acelerado e de fácil atualização, pois o processo de produção, formulação e liberação do material genético é mantido independente do alvo molecular. O que varia para cada imunizante é apenas o fragmento de ácido nucleico codificante da proteína alvo (SANDBRINK; SHATTOCK, 2020). O tempo de desenvolvimento de vacinas virais baseadas em ácidos nucleicos depende da obtenção da sequência do genoma do vírus em questão, o que pode ser uma etapa limitante. Desta forma, é esperado que, conforme esta plataforma amadureça, haja uma expressiva redução no tempo de desenvolvimento e aprovação regulatória destes produtos biológicos. Este fato pôde ser observado durante o desenvolvimento da vacina de mRNA (RNA mensageiro) da empresa Moderna, visto que 23 dias após o sequenciamento do SARS-CoV-2 a companhia foi capaz de iniciar experimentos pré-clínicos em animais, o que permitiu que a fase 1 de estudos clínicos fosse iniciada 66 dias após o conhecimento da sequência do material genético do vírus (CORBETT *et al.*, 2020).

De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde, 36% das vacinas desenvolvidas para a COVID-19 utilizaram tecnologias inovadoras em relação às plataformas tradicionais, baseadas em vírus inteiro, representando 59% do volume global de doses de imunizantes aplicadas em países membros da organização (OMS, 2022b). Além disso, conforme os dados compilados pelo Painel de Controle do Mercado de Vacinas para

²² Adenovírus: grupo de vírus DNA encontrados em certos animais e no homem que usualmente provocam doenças respiratórias (MICHAELIS, 2016).

COVID-19 da UNICEF²³, 34,5% dos imunizantes aprovados empregam a plataforma de vacinas de subunidade, seguido das metodologias de vírus inativado e vetor viral não-replicante, com 23,6% e 20,0%, respectivamente (Anexo 2). A Figura 4 abaixo mostra um panorama global da distribuição total acumulada de vacinas candidatas por plataforma e seus respectivos estágios de desenvolvimento clínico. É importante ressaltar que, apesar de a plataforma de imunizantes baseados em subunidades possuir a maior distribuição acumulada de vacinas candidatas (Figura 4), estas representam uma porcentagem substancialmente menor das vacinas efetivamente aplicadas, uma vez que este tipo de tecnologia demanda de longos intervalos de tempo para o seu desenvolvimento devido às diversas etapas envolvidas, como geração e seleção da linhagem recombinante de elevada produtividade, isolamento de clones, geração do banco de células mestre e do banco de células de trabalho, além da caracterização da proteína.

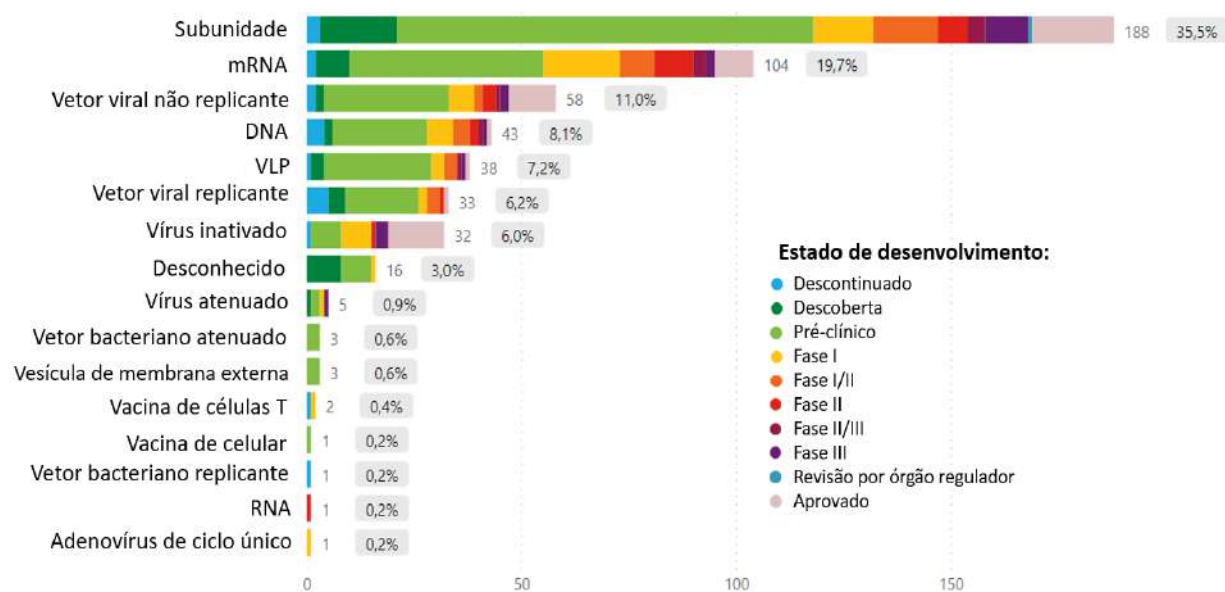


Figura 4: Distribuição total acumulada de vacinas por plataforma e estado de desenvolvimento clínico.
Fonte: Adaptado de UNICEF, 2023.

Tendo em vista estes fatos, demonstra-se uma vez mais a extrema relevância do desenvolvimento e otimização de plataformas vacinais além das convencionais para garantir o suprimento desta demanda e uma resposta acelerada quando futuros eventos pandêmicos forem observados. Na Tabela 3 abaixo, são demonstradas as principais plataformas vacinais para COVID-19 aprovadas, junto aos seus respectivos benefícios e desvantagens. Adicionalmente, é importante ressaltar que a Coalizão para Inovações em Preparação para Epidemias estabeleceu como meta futura que novas vacinas atinjam o estágio de testes clínicos em até 16 semanas após a detecção de um patógeno emergente e que as primeiras 100.000 doses estejam disponíveis dentro de 30 semanas deste evento (SANDBRINK; SHATTOCK, 2020).

²³ UNICEF: Fundo das Nações Unidas para a Infância.

Tabela 3: Principais plataformas vacinais para COVID-19: Benefícios e desvantagens.

Plataforma	Processo	Forças	Fraquezas
Vírus inativado	Vírus SARS-CoV-2 inativado por agentes químicos ou físicos	Método estabelecido; não há presença de partículas virais replicantes; processo de produção relativamente simples; estrutura do vírion conservada; pode induzir elevado título de anticorpos neutralizantes	Antígeno deve ser produzido por meio da propagação do patógeno; necessidade de adjuvantes; tipicamente há necessidade de doses de reforço; resposta principalmente humoral; risco de resposta imune celular TH2 distorcida que leva a patologia imune inflamatória
Vetor viral	Vírus geneticamente modificado para produzir antígenos de SARS-CoV-2	Método estabelecido; relativamente seguro; produção em larga escala; normalmente não necessita de adjuvantes; gera uma resposta imune robusta (pode induzir resposta imune celular); pode induzir elevado título de anticorpos neutralizantes (ainda que em menor proporção que imunização com vírus inativado)	Imunidade prévia ao vetor viral pode reduzir a resposta imune; processo de produção relativamente complexo; imunização por via nasal ou intramuscular pode produzir respostas imunes distintas; proteção pode ser incompleta ou falhar para idosos
RNA	mRNA codificante de antígenos SARS-CoV-2 encapsulado em nanopartícula lipídica	Relativamente simples de produzir; desenvolvimento rápido; não há presença de vírus; pode induzir resposta imune celular	Requer armazenamento a temperaturas ultra-frias; formulação relativamente instável; tecnologia recentemente licenciada em humanos
DNA	DNA codificante de antígenos SARS-CoV-2 disponibilizado diretamente através da inoculação	Relativamente simples de produzir; possibilidade de geração de resposta imune robusta devido ao avanço da eletroporação; pode induzir resposta imune celular; pode induzir elevado título de anticorpos neutralizantes; não há presença de vírus	Pode necessitar de sistemas de distribuição específicos; tecnologia recentemente licenciada em humanos; pode gerar proteção incompleta; sistemas de apresentação de baixa eficiência devido à dificuldade de entrega do IFA ao núcleo celular; risco de hipersensibilidade ou de resposta imune celular TH2 distorcida
Subunidade	Um ou mais antígenos recombinantes de SARS-CoV-2	Método estabelecido; não há presença de vírus ativos; imunizantes relativamente estáveis; pode induzir resposta imune celular; pode induzir elevado título de anticorpos neutralizantes; diversas opções de sistemas de apresentação do antígeno	Produção relativamente complexa; normalmente necessita de adjuvantes; tipicamente necessita de múltiplas doses de reforço; determinação da melhor combinação de antígenos é um processo lento

Fonte: Adaptado de HASSINE, 2021; GRAHAM; DONALDSON; BARIC, 2013 & HANSSON; NYGREN; STÅHL, 2000.

2.2.3 Demanda global e nacional

O mercado de vacinas possui diversas singularidades, dada a sua elevada complexidade, como a necessidade de *know-how*²⁴ altamente especializado, dificuldade e lentidão de *scale-up* de processos, demanda de instalações dedicadas e, muitas vezes, exclusivas a apenas um produto, flexibilidade muito reduzida relativa a mudanças nos processos de manufatura, além de ser um nicho altamente regulado, onde deve ser garantido, através de robustos controles de mudanças, que quaisquer modificações em processos não afetam a qualidade do produto final ou oferecem risco a segurança do paciente. Posto isto, a projeção de demanda destes biológicos é de elevada volatilidade, devido a fatores como prioridades governamentais que competem com as da área de saúde pública, restrição de orçamento de órgãos e ministérios da saúde e controle fiscal de preços, uma vez que a base primária de clientes para imunizantes são os governos estatais (OMS, 2022b).

A disponibilidade de imunizantes, frente a um cenário de surgimento de novas doenças infecciosas, é fundamental para a capacidade de reação a tal evento. No entanto, vacinas, como qualquer outro produto biológico, tendem a levar longos períodos para serem desenvolvidas, produzidas e avaliadas para uso clínico (GRAHAM; MASCOLA; FAUCI, 2018). Logo, é natural que diante de uma pandemia, como a de COVID-19, nos primeiros anos após a detecção do vírus, exista uma ampla demanda global por imunizantes, o que de fato é constatado pelo Painel Global para Equidade em Vacinas, desenvolvido pelo Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento (do inglês, UNDP²⁵), que indica que, até dezembro de 2022, 3 em cada 4 pessoas de países desenvolvidos foram vacinados com pelo menos uma dose de imunizante para COVID-19, enquanto que, nos países de baixa renda per capita, apenas 1 em cada 3 (29,37%) recebeu uma dose vacinal (Figura 5).

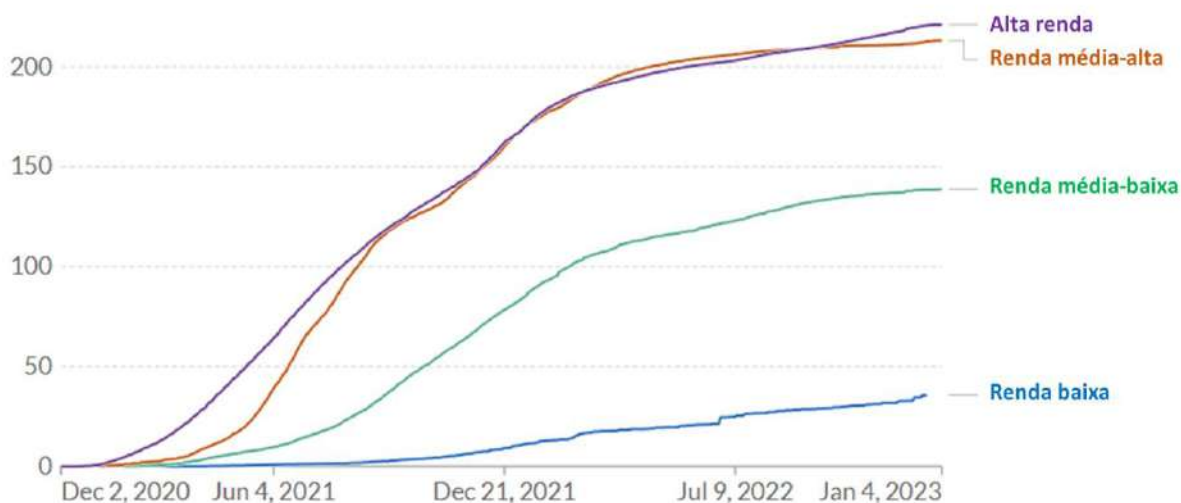


Figura 5: Doses de vacina para COVID-19 administradas a cada 100 habitantes agrupados por renda (todas as doses, incluindo doses de reforço, consideradas individualmente). Fonte: Adaptado de MATHIEU et al., 2023.

²⁴ *Know-how*: técnica e prática de eficiência em um processo produtivo (MICHAELIS, 2016)

²⁵ UNDP (*United Nations Development Programme*): programa da ONU dedicado a erradicação da pobreza e proteção do planeta, com foco em auxiliar países a desenvolver políticas, habilidades, parcerias e instituições sólidas que possam sustentar seu progresso (UNDP, 2022).

Esta disparidade de acesso às vacinas para COVID-19, e que ocorre também em menor grau para outras vacinas, foi de maior gravidade nas regiões da África e Leste do Mediterrâneo, dado que os países com maior disponibilidade de recursos financeiros, como os EUA e os pertencentes à União Europeia, ou com maior concentração de fabricantes locais de imunizantes, como China e Índia, são capazes de assegurar grande parcela do suprimento limitado de vacinas disponíveis no mercado (OMS, 2022b), conforme elucidado na Figura 6 abaixo. Ainda, de acordo com a OMS, o continente africano representa $\frac{1}{5}$ da população mundial, porém, em 2021, recebeu apenas 3% das doses de COVID-19 produzidas globalmente (Anexo 1).

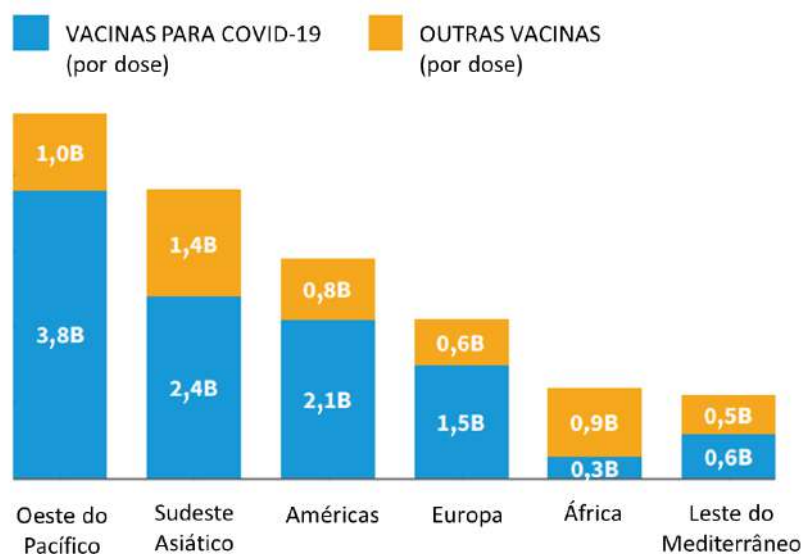


Figura 6: Comparação de volume das vacinas para COVID-19 e outros imunizantes aplicados em 2021.

Fonte: Adaptado de OMS, 2022b.

Observa-se, portanto, a necessidade de uma ampla capacidade de produção nacional de produtos biológicos, em especial, as vacinas, de forma que se tenha um estoque estratégico em casos de surtos epidêmicos, além de uma cadeia logística favorável, principalmente em países e territórios de dimensões continentais, como é o caso do Brasil. A ausência de produção 100% nacional de vacinas durante os primeiros anos da pandemia de COVID-19 foi marcada por diversos desafios logísticos para a imunização em massa, como filas de espera para importação de vacinas e de IFAs²⁶ (LARA, 2021; LOPES, 2021), rodízios de aplicação das doses disponibilizadas de acordo com faixas etárias e grupos de prioridade (realizado na maior parcela dos estados do Brasil), além de tempos de espera significativos entre a liberação do imunizante de uma faixa etária para a seguinte, o que ocorreu diversas vezes durante a campanha de vacinação em 2021 e no início de 2022 (PREFEITURA DA CIDADE DO RIO DE JANEIRO, 2021; PREFEITURA DA CIDADE DE SÃO PAULO, 2023).

Ainda, de acordo com o UNDP, até o final de 2022, 79,3% da população brasileira foi totalmente vacinada contra a doença (primeira e segunda dose para as vacinas com este esquema vacinal), sendo que foram administradas apenas 56,9 doses de reforço a cada 100 habitantes. As figuras a seguir ilustram as oportunidades de demanda reprimida global, onde são apresentadas o número total de pessoas de todas as idades que ainda não receberam sequer uma dose da vacina para COVID-19 (Figura 7) e a porcentagem da

²⁶ IFA: ingrediente farmacêutico ativo.

população completamente vacinada por país contra o custo da vacinação de 40% da população como percentual dos gastos atuais com saúde de cada país (Figura 8). De forma complementar, é possível observar na Figura 8 uma tendência inversamente proporcional entre o custo da vacinação e a porcentagem da população imunizada.

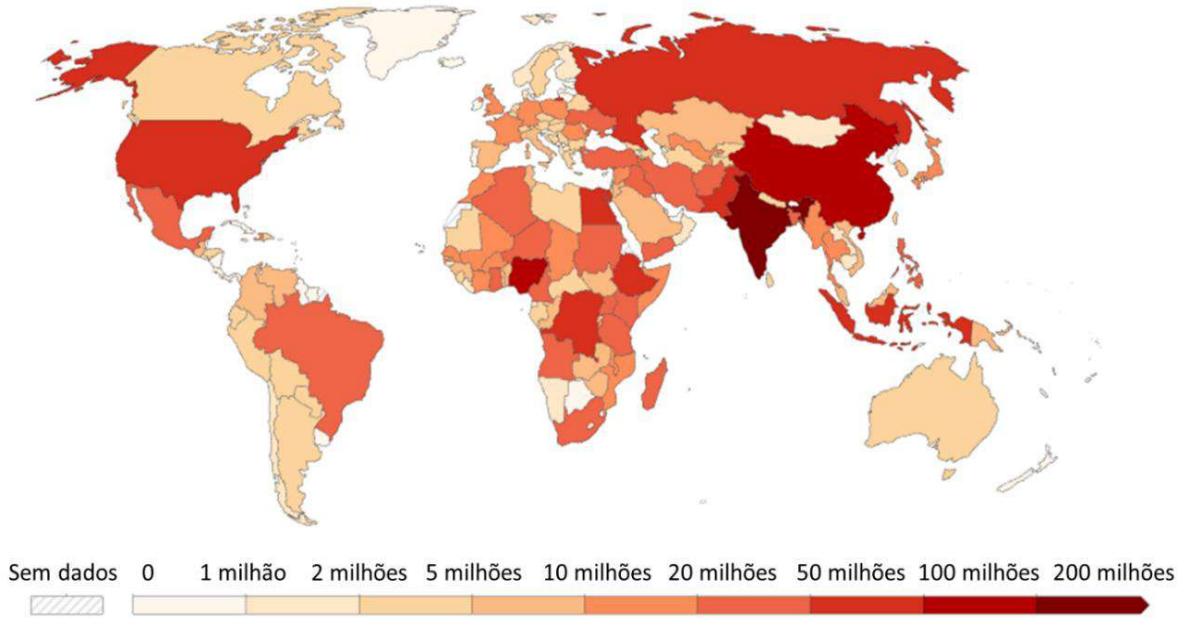


Figura 7: Número total de pessoas de todas as idades que não receberam nenhuma dose de vacina para COVID-19 até janeiro de 2023. Fonte: Adaptado de MATHIEU et al., 2023

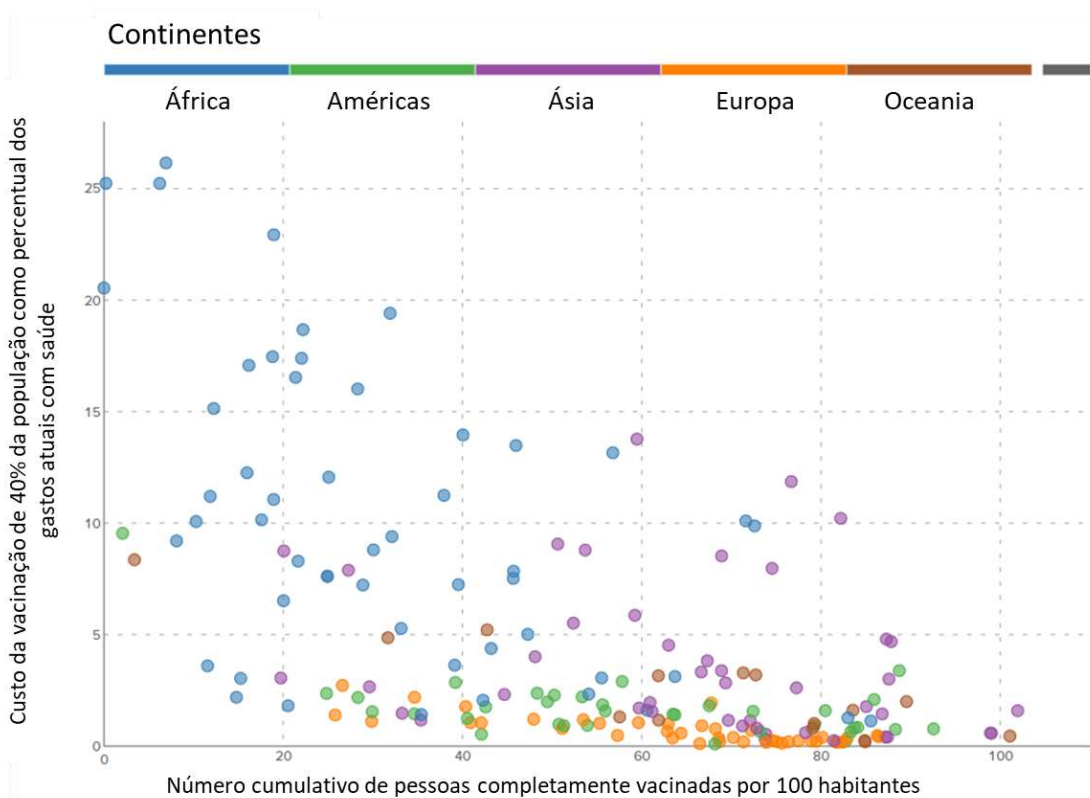


Figura 8: Porcentagem da população completamente vacinada por país, versus custo da vacinação de 40% da população como percentual dos gastos atuais com saúde por país. Fonte: Adaptado de UNDP, 2022.

Este fato é também reforçado quando se avalia o custo médio global por dose de vacina para COVID-19, que varia em média entre 2 e 40 dólares, dependendo da localização geográfica (Anexo 3), dentre outros fatores, além do custo médio logístico de 3,70 dólares a cada pessoa vacinada com duas doses. Estes custos se revelam muito significativos quando colocados em contraste aos gastos anuais *per capita* com saúde de países de baixo poder econômico, que é, em média, de 41 dólares, o que se traduz em um aumento médio de 30 a 60% de gastos com saúde para alcançar ao menos 70% de cobertura vacinal (Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento, 2022).

De acordo com Hassine (2021), “embora várias vacinas para COVID-19 tenham sido desenvolvidas, vacinas efetivas adicionais ainda são necessárias para suprir a demanda global”, frente à “rápida emergência e difusão das variantes de preocupação do SARS-CoV-2 que podem escapar dos anticorpos neutralizantes e/ou imunidade celular”, considerando pessoas imunizadas com a versão original das vacinas, desenvolvidas para a cepa ancestral (Wuhan). Este fato pode ser conjuntamente corroborado conforme o discurso realizado pelo presidente do Brasil, Luiz Inácio Lula da Silva, no dia de sua posse, no parlatório, onde, o governante destaca:

Os livros didáticos que deverão ser usados no ano letivo de 2023 ainda não começaram a ser editados; faltam remédios no Farmácia Popular; não há estoques de vacinas para o enfrentamento das novas variantes da COVID-19 (SILVA, 2023).

Entretanto, um dos principais entraves para a expansão do desenvolvimento e produção de vacinas, de acordo com a OMS, 2022b, são os elevados custos de barreira de entrada, característicos de produtos biológicos. Ainda, destaca-se que, usualmente, o mercado de imunizantes rende menores lucros em relação ao custo de entrada, quando comparado a outros ramos farmacêuticos (especialmente entre produtos biológicos), além dos elevados riscos de falha durante as etapas do desenvolvimento anteriores ao lançamento do produto. Por conseguinte, na ausência de incentivos governamentais, existe interesse limitado por parte das companhias farmacêuticas para investir em grandes plantas de desenvolvimento e produção de imunizantes.

Conclui-se, portanto, que, apesar de uma parcela significativa da população brasileira, e também mundial, já ter sido imunizada contra COVID-19, existe uma grande demanda reprimida presente, principalmente, nos países de maior vulnerabilidade socioeconômica. Além disso, ressalta-se que, como visto a fundo na seção 2.2.2, diversas plataformas vacinais necessitam de doses de reforço para manter a imunização em níveis satisfatórios para o combate da infecção causada pelo vírus SARS-CoV-2, havendo a possibilidade de uma demanda adicional de doses de reforço anuais e com preços mais elevados, conforme a pandemia se transforma em um cenário endêmico (FIERCE PHARMA, 2022). Ainda, a emergência de novas variantes de preocupação capazes de evadir a resposta imune produzida pelas vacinas é um risco constante e que necessita de uma capacidade de resposta rápida para a atualização dos imunizantes, onde a ausência de uma capacidade de produção robusta em território nacional é uma grande vulnerabilidade, como foi visto durante o primeiro ano da pandemia de COVID-19. Logo, é de grande relevância para o interesse nacional o desenvolvimento e otimização dos processos e tecnologias de produção de vacinas, em especial as desenvolvidas por instituições brasileiras, de forma a evitar futuros cenários de desabastecimento.

2.2.4 Análise de mercado

De acordo com o Relatório Global do Mercado de Vacinas 2022, compilado pela OMS, as vacinas para COVID-19 distribuídas mundialmente em 2021 foram produzidas por 19 fabricantes. Destes, 52% (correspondente a 10 produtores) não possuíam outro imunizante no mercado e foram responsáveis por 15% do volume de mercado, demonstrando a atratividade deste mercado a novos competidores entrantes. Além disso, apenas 4 destes fabricantes fazem parte dos 10 maiores produtores globais de vacinas em volume (OMS, 2022b). Estes fatos destacam que uma parcela relevante destes fabricantes possuía experiência limitada na produção em larga escala de imunizantes, o que prova também que vacinas podem de fato ser desenvolvidas e distribuídas rapidamente quando há suficientes incentivos, lucratividade e tamanho de mercado, além de arcabouço técnico-científico disponível, como citado anteriormente em relação aos desenvolvimentos para SARS e MERS.

Ademais, o relatório da OMS destaca que, apesar de um crescimento expressivo no número de fabricantes de imunizantes, a base de fornecimento de vacinas permanece altamente concentrada (com a aprovação das vacinas para COVID-19, os 10 maiores produtores capturam cerca de 90% do valor global de mercado), resultando em significativos problemas de abastecimento regional. A concentração do mercado global em volume de vacinas aplicadas contra o SARS-CoV-2 é estimada em 42%, divididos entre os dois produtores dos imunizantes mais difundidos (Pfizer/BioNTech e Serum Institute of Índia), condição que pode se mostrar altamente problemática no advento de emergências de saúde ou surtos epidêmicos (OMS, 2022b e UNICEF, 2023).

No que se refere aos dados relativos aos imunizantes contra o vírus SARS-CoV-2 aprovados para uso em humanos, de acordo com a UNICEF (2023), ao todo, 55 vacinas receberam o aval de pelo menos uma autoridade regulatória nacional para aplicação e, dentre elas, 11 estão na lista de uso emergencial da OMS. Adicionalmente, até janeiro de 2023, 15,8 bilhões de doses individuais foram entregues a 228 países e territórios, com preços que variam globalmente de 2 a 120 dólares por dose, dependendo de fatores como região geográfica e renda média *per capita*. No Brasil, até janeiro de 2023, 5 imunizantes receberam aprovação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), sendo dois deles produzidos por instituições públicas em território nacional: a Coronavac (formulação e envase), pelo Instituto Butantan, em São Paulo, e a Oxford/Covishield, produzida pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), no Rio de Janeiro. Além disso, 2 vacinas receberam autorização para importação excepcional (Tabela 4).

De acordo com a ANVISA, atualmente existem quatro formas de uma vacina para COVID-19 ser disponibilizada no país: registro; uso emergencial; importação excepcional; ou pelo consórcio COVAX *Facility*, que é uma iniciativa da OMS, GAVI²⁷ e CEPI que objetiva garantir fundos para aquisição e distribuição de vacinas para os países mais pobres do planeta. Ainda, de acordo com o Painel de Controle do Mercado de Vacinas para COVID-19, da UNICEF, 626,9 milhões de doses foram garantidas pelo governo brasileiro, dentre elas, 13,9 milhões foram doadas pela aliança COVAX e 5,2 milhões foram correspondentes a outras doações internacionais.

²⁷ GAVI: aliança internacional de vacinas, reunindo os setores público e privado com o objetivo de salvar vidas e proteger a saúde das pessoas, aumentando o uso equitativo e sustentável de vacinas (GAVI, 2023).

Tabela 4: Vacinas aprovadas para uso clínico no Brasil.

Vacina	Número de doses para imunização	Faixa etária autorizada	Plataforma	Registro
Comirnaty (Pfizer/Wyeth)	Indivíduos a partir de 5 anos: duas doses, sendo aprovada também aplicação de uma terceira dose de reforço; Crianças entre 6 meses e 4 anos: três doses	A partir de 6 meses de idade	RNA mensageiro sintético que codifica a expressão da proteína de interesse	Concedido em 23/fev/21
Comirnaty bivalente (Pfizer)	Indicada como dose de reforço	A partir de 12 anos de idade	RNA mensageiro sintético que codifica a expressão da proteína de interesse	Uso emergencial aprovado em 22/nov/22
Coronavac (Butantan)	Duas doses	A partir de 3 anos de idade	Vírus inativado	Uso emergencial aprovado em 17/jan/21
Janssen Vaccine (Janssen-Cilag)	Dose única, sendo autorizada também aplicação de uma segunda dose de reforço	A partir de 18 anos de idade	Vetor viral não-replicante de adenovírus sorotipo 26 (Ad26)	Concedido em 05/abr/22
Oxford/Covishield (Fiocruz e Astrazeneca)	Duas doses, sendo aprovada também aplicação de uma terceira dose de reforço	A partir de 18 anos de idade	Vetor viral não-replicante de adenovírus recombinante	Concedido em 12/03/21
Sputnik	Duas doses	Adultos entre 18 e 60 anos de idade	Adenovírus D-26 D-5	Autorizada parte da importação sobre condições controladas em 04/jun/21
Covaxin (Suspensa)	Duas doses	Adultos entre 18 e 60 anos de idade	Vírus inativado	Processo de importação suspenso (medida cautelar) em 27/jul/21

Fonte: Adaptado de ANVISA, 2023b.

Quanto à capacidade de produção brasileira, até abril de 2023, Bio-Manguinhos/Fiocruz entregou cerca de 211 milhões de doses da vacina para COVID-19 e, em fevereiro de 2022, a Fundação Oswaldo Cruz liberou, através da realização de transferência de tecnologia, a primeira vacina para COVID-19 produzida com IFA 100% nacional, das quais foram produzidas 15,8 milhões de doses (FIOCRUZ, 2023). Em contrapartida, o Ministério da Saúde realizou a encomenda de 105 milhões de doses de imunizantes da Fiocruz para o ano de 2022, dos quais 45 milhões foram relativos à vacina totalmente nacional. De acordo com a Fundação, a produção deste imunizante utilizando o IFA nacional contribui para a balança comercial da saúde, reduzindo a exigência de importações e garantindo a oferta do imunizante à população brasileira. Além disso, ressalta-se que a vacina brasileira resultante desta transferência tecnológica é uma das mais baratas do mundo, com um valor de 5,27 USD por dose. Ademais, além de Bio-Manguinhos/Fiocruz, o Instituto Butantan, que é um dos 10 maiores produtores mundiais de vacinas e o maior da América Latina, forneceu 112 milhões de doses da vacina CoronaVac (imunizante do Butantan e da farmacêutica chinesa, Sinovac), entre 2021 e 2022 (Instituto Butantan, 2023).

Até o início de 2023, é estimado pela UNICEF, através de declarações e compromissos das companhias produtoras de vacinas, que a capacidade de produção global de doses de imunizantes contra o SARS-CoV-2 previamente já aprovados para uso em humanos atingirá um marco de 31,87 bilhões de doses divididas entre as plataformas previamente explicitadas (Anexo 4 e Anexo 5), o que representa um aumento de 8,3% em relação a capacidade de produção destas mesmas vacinas quando comparado ao ano de 2022, conforme Figura 9.

Portanto, percebe-se que a pandemia de COVID-19 despertou o interesse de diversas empresas privadas (muitas delas inexperientes quanto à produção em escala de imunizantes) em desenvolver vacinas para esta doença viral, de forma a capturar uma parcela deste mercado, que tem uma demanda reprimida natural. No entanto, ainda existe uma grande concentração de mercado na mão de 2 principais *players* estrangeiros, tal que é de interesse nacional que o Brasil, um país de dimensões continentais, seja autossuficiente quanto à produção de imunizantes em território brasileiro. Além disso, a autonomia da vigilância epidemiológica desta doença é também justificada frente ao elevado risco do surgimento de novas variantes de preocupação do SARS-CoV-2 que possam ser capazes de evadir de forma parcial ou total a proteção garantida pelas vacinas atuais, o que poderia gerar uma nova corrida global por imunizantes.

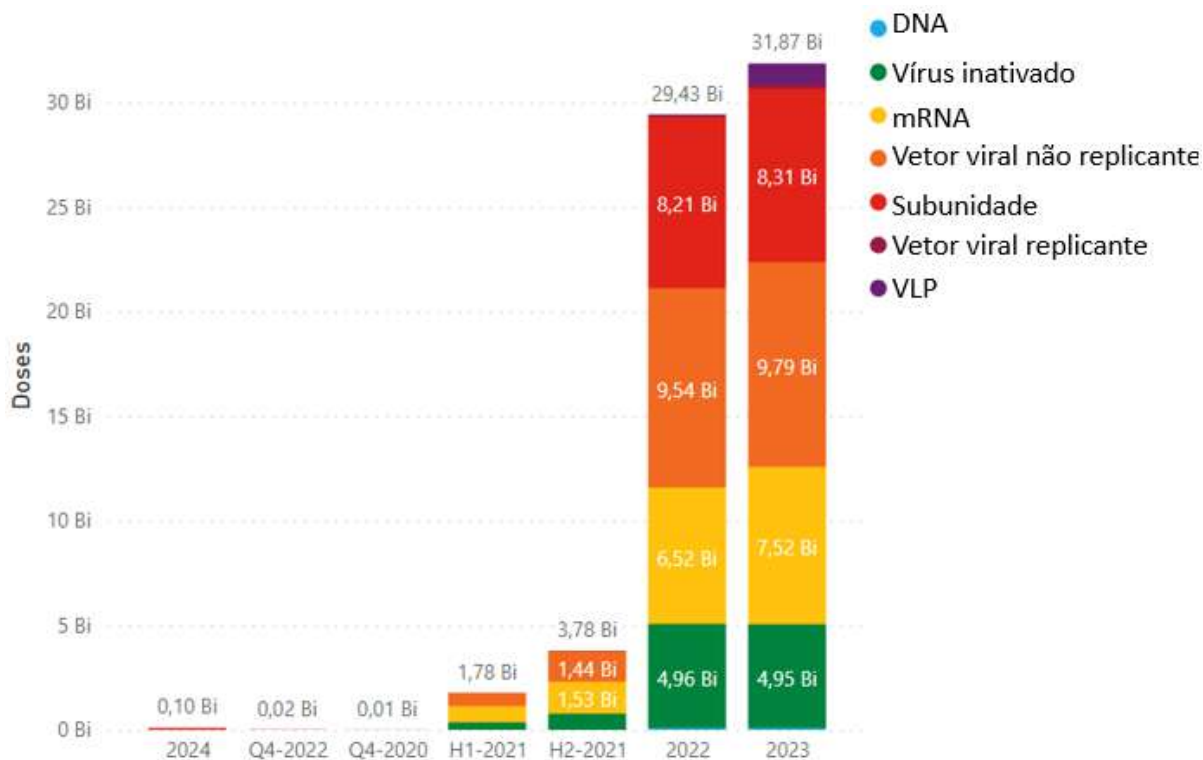


Figura 9: Capacidade reportada de produção de doses de imunizantes para COVID-19. Fonte: Adaptado de UNICEF, 2023.

2.3 Produção de antígenos recombinantes em células animais

2.3.1 Vacinas baseadas em subunidades de proteínas virais

Com os avanços da tecnologia do DNA recombinante, houve um grande desenvolvimento no campo de pesquisa e produção de vacinas de subunidade, com esta plataforma se tornando estratégica para a prevenção e controle de doenças infecciosas globalmente. O uso da tecnologia recombinante permite também produzir mudanças específicas na estrutura proteica, de forma a aprimorar características da proteína alvo de interesse, como solubilidade, estabilidade, meia vida *in vivo* (HANSSON; NYGREN; STÅHL, 2000), dentre outras.

Desta maneira, diferentemente das vacinas de vetores virais, que utilizam outro vírus como vetor de expressão da proteína de interesse ao entrar em contato com as células hospedeiras, os imunizantes baseados em subunidades proteicas são formulados contendo os antígenos de interesse do vírion. Estes antígenos são, então, apresentados ao sistema imunológico para geração de resposta imune humoral²⁸ e celular²⁹, através do ato de imunização, com subsequente produção de imunoglobulinas³⁰ neutralizantes (GRAHAM; DONALDSON; BARIC, 2013). Ressalta-se ainda que esta plataforma, atualmente amplamente consolidada, é capaz de contornar alguns dos pontos negativos das vacinas baseadas em métodos que utilizam o patógeno atenuado ou inativado, como reações

²⁸ Resposta imune humoral: mediada pela ação de anticorpos secretados por células B (LOPES; AMARAL, 2011).

²⁹ Resposta imune celular: mediada pela ação de linfócitos T (LOPES; AMARAL, 2011).

³⁰ Imunoglobulinas: anticorpos.

cruzadas adversas, que incluem inflamação, resposta alérgica e autoimune. Isto se dá, pois, esta plataforma vacinal em questão contém apenas os fragmentos ou produtos virais necessários para elucidar a resposta imune desejada (HEIDARY *et al.*, 2022).

Adicionalmente, quanto ao reconhecimento de antígenos pelo sistema imunológico humano, os epítomos reconhecidos por anticorpos neutralizantes são apresentados, normalmente, apenas em uma ou algumas das proteínas presentes na superfície do vírion. As vacinas de subunidade possuem, portanto, a vantagem da possibilidade de utilização de apenas fragmentos do agente patogênico que contenham estes epítomos imunogênicos, ou seja, que direcionam uma resposta imunológica, como peptídeos, proteínas ou polissacarídeos. Dessa forma, existe a minimização de efeitos adversos e reações imunes indesejadas causadas por outros epítomos do vírus. (HANSSON; NYGREN; STÅHL, 2000).

As vacinas de subunidade para SARS-CoV-2 utilizam, em sua grande maioria, a proteína da espícula recombinante em forma trimérica estabilizada, sendo expressa sua sequência inteira ou apenas fragmentos relacionados à geração de anticorpos neutralizantes. Quanto aos sistemas de expressão, são empregados modelos biológicos que possuem a capacidade de produzir a proteína de interesse com o padrão de glicosilação adequado. Desta maneira, é comum a utilização de células animais, as quais são capazes de produzir proteínas de estrutura complexa, de forma a garantir a estrutura correta, a atividade biológica e a estabilidade necessárias para que o antígeno recombinante estimule a geração de respostas do sistema imune, além de garantir que não ocorra reações adversas indesejadas (CASTILHO, 2019). Outro fator relevante para o uso de células animais, em especial as de mamíferos, é a capacidade de gerar modificações pós-tradução com maior grau de fidelidade quando comparado aos outros sistemas de expressão, além da possibilidade de gerar padrões de glicosilação “humanizados” (HANSSON; NYGREN; STÅHL, 2000), ou seja, mais semelhantes aos que ocorrem naturalmente em células humanas infectadas pelo vírus.

Por conseguinte, é predominante no desenvolvimento de imunizantes contra COVID-19 a utilização de células animais para a expressão dos antígenos recombinantes de interesse, como a vacina candidata desenvolvida pela Sanofi Pasteur e GSK, a VAT00002, que expressa a proteína *spike* recombinante em células de inseto, utilizando vetor de baculovírus (que utiliza a capacidade deste vírus de infectar células de artrópodes, como insetos, por exemplo, para induzir a produção de proteínas heterólogas³¹ de SARS-CoV-2). Outro exemplo do uso de células de animais recombinantes é a vacina candidata produzida pela Clover Biopharmaceuticals, SCB-2019, que utiliza de células de ovário de hamster chinês (CHO) através da tecnologia *Trimer-Tag*³² para a expressão da proteína S trimérica (HEIDARY *et al.*, 2022). Não obstante, existem desvantagens na utilização de modelos de expressão baseados em células animais, como a geração laboriosa e demorada de linhagens celulares estáveis e de alta produtividade, os elevados custos de cultivo e elevado risco de contaminação bacteriana e, até mesmo, viral (HANSSON; NYGREN; STÅHL, 2000). Além disso, os tempos de duplicação destas células são significativamente superiores no caso de células de mamíferos, da ordem de 24 horas, quando comparadas aos modelos que utilizam bactérias ou leveduras, as quais se duplicam em poucas horas.

³¹ Proteína heteróloga: parte de um organismo, porém que é estruturalmente de origem distinta (MICHAELIS, 2016).

³² Trimer-Tag: tecnologia que permite trimerizar covalentemente proteínas de interesse de forma estável e semelhante a natural, aplicável a um amplo espectro de doenças cuja proteína alvo depende de trimerização (CLOVER BIOPHARMACEUTICALS, 2023).

2.3.2 Expressão da proteína S recombinante em células animais

Um dos desafios impostos para a expressão recombinante da proteína espícula trimérica do SARS-CoV-2 é o fato de esta ser um homotrímero³³ bastante volumoso, possuindo 1380 aminoácidos e cerca de ~600 kDa, além de conter 22 sítios de N-glicosilação por monômero³⁴, o que corresponde, na prática, a uma limitação na capacidade de expressão pelos modelos biológicos transientes (JOHARI *et al.*, 2020), usualmente gerando baixos títulos de produção (em média 1-2 mg/L) em construções recombinantes transientes iniciais (ESPOSITO *et al.*, 2020), quando comparada a proteínas de menor complexidade. Não obstante, experimentos de otimização, focados principalmente no processo de transfecção e nas condições de cultivo celular, são capazes de elevar a concentração de proteína S obtida a níveis de 100-150 mg/L (STUIBLE *et al.*, 2021).

Vale ressaltar ainda que a expressão da conformação pré-fusão da proteína S é desejável para o desenvolvimento de imunizantes, devido a esta conformação ser a encontrada nativamente na estrutura do vírion infeccioso e também pelo fato de esta apresentar a maioria dos epítomos neutralizantes que podem ser alvo de anticorpos que possam evitar o processo de anexação e incorporação do coronavírus pela célula humana (HSIEH *et al.*, 2020). No entanto, a proteína da espícula trimérica em seu estado pré-fusão é metaestável (WRAPP *et al.*, 2020), conferindo um desafio para sua produção biotecnológica e posterior processamento e armazenamento.

Wrapp *et al.* (2020), foram capazes de gerar duas mutações estabilizadoras em prolinas localizadas na extremidade C-terminal da subunidade S2 da proteína *spike*, estratégia já conhecida anteriormente para a estabilização de outras proteínas da espícula de beta-coronavírus. Adicionalmente, a estabilização da conformação pré-fusão tende a amplificar a expressão recombinante de glicoproteínas virais, possivelmente impedindo o desencadeamento e/ou o dobramento incorreto da estrutura proteica, fato que, conseqüentemente, favorece a adoção de uma estrutura mais estável, como pôde ser visto também nos SARS e MERS-CoV, onde a estabilização da estrutura pré-fusão resultou em rendimentos de cultivo celular muito superiores (HSIEH *et al.*, 2020).

Adicionalmente, o grupo de pesquisa de Hsieh *et al.* (2020) foi capaz de caracterizar 100 *designs* alterados da proteína da espícula encontrada na cepa original (Wuhan), utilizando combinações de 26 substituições individuais em sua estrutura. A partir disso, uma variante estrutural denominada pelo grupo como HexaPro, caracterizada por 6 substituições benéficas simultâneas de prolina, foi capaz de exibir uma expressão celular recombinante transiente 10 vezes superior em relação a proteína original (da ordem de 33 mg/L). O grupo ainda reportou uma maior capacidade desta variante proteica de suportar estresse térmico em armazenamento a temperatura ambiente e também resistir a 3 ciclos de congelamento e descongelamento.

Além disso, um fator de extrema relevância para o desenvolvimento e produção de proteínas recombinantes é a seleção do meio de cultivo, que deve ser, idealmente, livre de materiais de origem animal e quimicamente definido para utilização em processos de produção de biológicos para uso em humanos. Estes meios são compostos por aminoácidos, vitaminas, elementos traços, sais inorgânicos, lipídios e fatores de

³³ Homotrímero: que possui as três unidades iguais.

³⁴ Shajahan *et al.* apresentam, através da análise de sequência de aminoácidos, que os sítios de N-glicosilação da proteína S de SARS-CoV-2 são fortemente conservados entre as VOCs, particularmente no domínio RBD, exceto pela perda do sítio N17 na variante Delta e adição dos sítios N20 e N188 na variante Gama.

crescimento, como insulina ou semelhantes, de maneira que sejam fornecidos todos os elementos necessários para o metabolismo do modelo de expressão optado. Estes meios, disponíveis em plataformas comerciais, servem de base para o desenvolvimento de soluções sob medida e otimizadas para as linhagens celulares e os processos produtivos desejados, de forma a promover um maior crescimento celular e levar a aumentos na produtividade (FAN; LEY; ANDERSEN, 2018).

Quanto às condições de cultivo, Esposito *et al.* (2020) conduziram experimentos de forma a otimizar o cultivo em células HEK na modalidade de expressão transiente, concluindo que a redução de temperatura de cultivo de 37 °C (instrução do fabricante) para 32 °C (condição de leve hipotermia) foi capaz de prolongar o tempo de cultivo em batelada alimentada, aumentando, portanto, a concentração da proteína de interesse obtida ao final do cultivo. Complementarmente, Johari *et al.* (2015) demonstram que a produção transiente de proteínas de estrutura complexa, como a proteína da espícula do SARS-CoV-2, necessita de otimização de cultivo para contrabalancear possíveis efeitos negativos, como a indução de resposta de proteína desdobrada e a formação intracelular de agregados oligoméricos pós-transfecção, os quais podem limitar a produtividade específica (q_p). Uma adaptação razoável, portanto, é o estudo da aplicação de condições de hipotermia leve, que é uma intervenção de engenharia de processos promissora para a produção de proteínas de difícil expressão, conforme visto. Desta forma, demonstra-se também o interesse em desenvolver linhagens recombinantes de expressão estável da proteína S, tais quais sejam capazes de reduzir as limitações presentes na modalidade de expressão transiente.

Ainda, frente à demanda de produzir-se rapidamente uma plataforma capaz de expressar a proteína da espícula recombinante, a utilização de células HEK em oposição a de células CHO, classicamente mais utilizadas para produção de proteínas glicosiladas recombinantes na indústria farmacêutica (FAN; LEY; ANDERSEN, 2018), pode ser preferencial, devido à presença de um maior número de proteoglicanos de heparam sulfato (HSPGs) em células CHO, quando comparado às células HEK. Este fato pode, portanto, resultar na necessidade de desenvolvimento e validação de métodos de purificação de maior robustez quanto à retenção de proteínas da célula hospedeira (HCPs) para células CHO (JOHARI *et al.*, 2020), possivelmente impactando no tempo de desenvolvimento de processo de produção e purificação desta proteína.

2.3.3.1 Cultivo de células animais em batelada alimentada

Os bioprocessos podem ser definidos como o campo da biotecnologia que explora as características metabólicas de organismos vivos e as aplica em escala industrial, através de métodos da engenharia de bioprocessos, para obter o máximo rendimento e produtividade possíveis. Estes bioprocessos apresentam uma gama de possíveis técnicas disponíveis para serem aplicadas, como a condução do processo em batelada (*batch*), batelada alimentada (*fed-batch*) ou contínuo. A batelada alimentada, que é o foco deste trabalho, pode ser resumida na alimentação da fonte de carbono e/ou outros nutrientes em cultivo fechado, de maneira que a concentração de substrato e a taxa específica de crescimento celular são controladas (YI, 2022), conforme o objetivo que se deseja ser atingido ao final do processo.

Em contraste, os processos contínuos, em especial a perfusão³⁵, são sistemas em que há entrada e saída simultâneas de material e que podem operar, virtualmente, sem restrições

³⁵ Perfusão: processo contínuo com reciclo celular.

através da adição contínua ou intermitente de meio de cultivo fresco, rico em nutrientes, ao biorreator (YI, 2022). A perfusão possui benefícios, como uma elevada produtividade volumétrica, devido às altas densidades celulares usualmente atingidas durante o cultivo e o curto tempo de residência do produto no interior do biorreator. Este curto tempo de exposição do produto ao cultivo é particularmente interessante para produtos sensíveis à degradação proteolítica ou outros mecanismos que diminuem a qualidade da proteína produzida, como é o caso de fatores de coagulação sanguínea, os quais são proteínas instáveis e que apresentam curto tempo de meia-vida. No entanto, devido a uma combinação de desafios técnicos e regulatórios, a indústria farmacêutica ainda transiciona lentamente em direção a adoção em massa deste tipo de processo (CHEN, *et al.*, 2022). Não obstante, para produtos de maior estabilidade, como anticorpos monoclonais, a batelada alimentada ainda é mais estabelecida em escala industrial devido ao seu desenvolvimento rápido, formato simplificado e facilidade de aumento de escala (HUANG, *et al.*, 2010).

Portanto, o processo de *fed-batch* é mais comumente aplicado, quando comparado ao processo contínuo, para produção de proteínas recombinantes através de cultivos de células animais, devido à complexidade do segundo e pelo fato de este ser mais suscetível a contaminação e efeitos metabólicos adversos, além disso, a batelada alimentada é capaz de suportar uma alta produtividade volumétrica com custos operacionais reduzidos (FAN; LEY; ANDERSEN, 2018). No sistema de cultivo em *fed-batch*, as células são inoculadas em uma concentração inicial definida e são mantidas, durante um período de tempo determinado, em condições experimentais que permitam sua sobrevivência e multiplicação, de modo a permitir a produção da proteína de interesse. Apesar do contexto exposto, há um movimento na indústria biofarmacêutica em direção aos processos contínuos, com grandes companhias do ramo buscando aplicar estes processos em seus produtos, além da colaboração com instituições acadêmicas em busca de inovações de engenharia aplicadas processos contínuos (CHEN, *et al.*, 2022).

Durante seu cultivo, as células percorrem diferentes estágios de crescimento e metabolismo, alterando progressivamente a composição do meio e produzindo metabólitos diversos (YI, 2022). No decorrer deste processo, um meio basal é utilizado para suportar esta fase de crescimento celular inicial do inóculo, seguido da posterior adição de uma solução concentrada de nutrientes, desenhada para a etapa de alimentação, capaz de prevenir a escassez de nutrientes ao longo do cultivo (FAN; LEY; ANDERSEN, 2018). A maioria dos meios comerciais desenvolvidos para alimentação de processos de batelada alimentada apresentam dois principais grupos de componentes: os que contêm glicose, surfactantes, aminoácidos e vitaminas e os que contêm diversos aminoácidos de pH básico, para manutenção do pH do meio extracelular (KLAUBERT *et al.*, 2021).

Quanto ao ambiente ao qual as células estão inseridas, Fan, Ley e Andersen (2018) definem o ambiente físico como aquele caracterizado por parâmetros de processo, como o valor de pH fisiológico, temperatura de cultivo, suprimento de oxigênio e velocidade de agitação; enquanto que o ambiente químico é definido pela escolha do meio de cultivo e de alimentação e da estratégia de alimentação a ser adotada. Estes critérios são frequentemente otimizados frente à aplicação de abordagens de planejamento estatístico de experimentos e análise de dados como *design-of-experiment* (DoE), de forma a identificar as concentrações ótimas de nutrientes, além das condições mais adequadas para o processo. Além disso, a escolha do meio de cultura e de alimentação, junto à frequência e a quantidade de alimentação implica consideravelmente na modulação dos componentes do cultivo celular (FAN; LEY; ANDERSEN, 2018).

Ressalta-se também a necessidade de otimização da estratégia de controle da alimentação da fonte de carbono, pois esta é essencial para garantir a limitação de substrato disponível, de forma a evitar a geração de subprodutos indesejados, que normalmente são associados ao excesso de glicose livre (YI, 2022). Este projeto final possui como um dos objetivos propor uma estratégia de alimentação para batelada alimentada de células HEK293 recombinantes que expressam de forma estável a proteína S pré-fusão estabilizada, com base em estudos cinéticos experimentais realizados.

2.3.3.2 Cultivo de células animais em batelada alimentada: ambiente físico

Quanto à otimização do ambiente físico de cultivo celular com ênfase na produção de proteínas virais recombinantes, Johari *et al.* (2020) avaliaram a hipótese de condução do cultivo em batelada alimentada de células CHO recombinantes capazes de expressar de forma estável a proteína da espícula de SARS-CoV-2, executada a 32 °C (condição de leve hipotermia), por 10 dias e na presença ou ausência de chaperonas químicas. Comparou-se o desempenho do cultivo na modalidade de hipotermia leve com os cultivos carregados a 37 °C integralmente e com uma mudança de temperatura de 37°C – com a finalidade de promover um maior crescimento celular durante a fase de expansão do inóculo – para 32 °C apenas no terceiro dia de cultivo. Os resultados de produção e densidade de células viáveis (VCD) obtidos pelo grupo podem ser visualizados na Figura 10 abaixo.

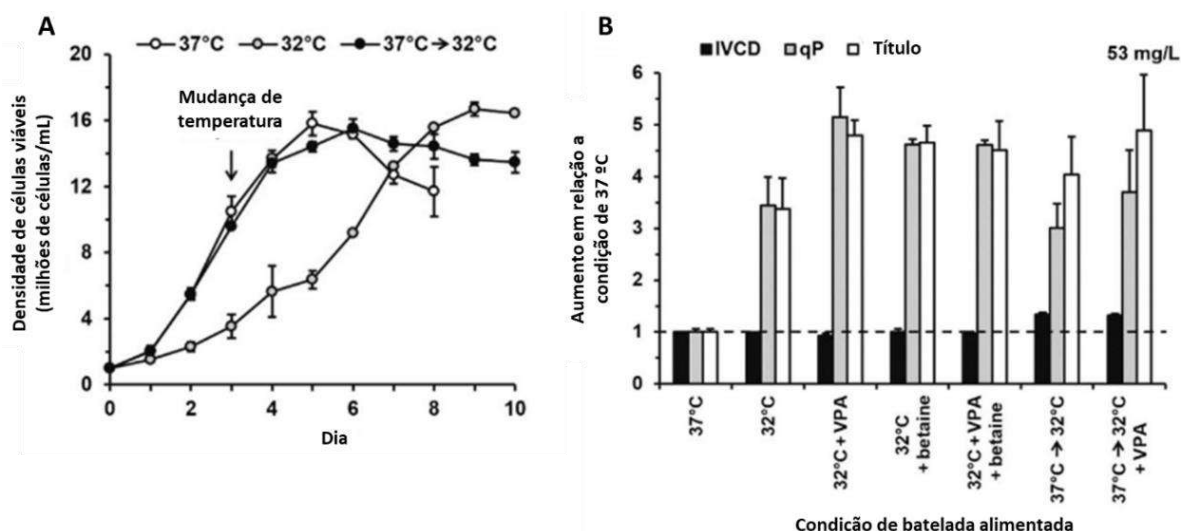


Figura 10: Comparação de diferentes condições de processo para batelada alimentada de células CHO recombinantes produtoras de proteína spike de SARS-CoV-2. A. VCD frente às diferentes temperaturas de cultivo. B. Integral da densidade de células viáveis (IVCD), produtividade específica celular (q_p) e título de produção de proteína, respectivamente, frente às diferentes condições de cultivo. Fonte: Adaptado de JOHARI *et al.*, 2020

O grupo demonstra que, apesar de uma redução na densidade celular para os cultivos a 32 °C, a produtividade específica de proteína S apresentou um aumento significativo, quando comparada com o cultivo mantido a 37 °C. Além disso, Johari *et al.* (2020) demonstram que a adição de ácido valpróico (VPA³⁶) resulta em um aumento de aproximadamente 5 vezes na produtividade celular específica, culminando em um rendimento de 51 mg/L de proteína S após purificação cromatográfica. Um efeito similar

³⁶ Ácido valpróico (VPA): é uma pequena molécula que melhora a expressão de proteínas em células de mamíferos, atuando como um inibidor de histonas desacetilases (MAYRHOFER; HUNJADI; KUNERT, 2021).

foi encontrado para a adição de betaína ao cultivo, no entanto, menos pronunciado, além de não ter sido identificado um efeito sinérgico quando combinados os dois compostos químicos. Ainda, a condição em que há mudança de 32 para 37 °C rendeu uma otimização da integral da densidade de células viáveis (IVCD ou ICV, em português) e, quando combinada com o VPA, rendeu 53 mg/L de produto. Por último, o grupo ainda postula que a expressão da proteína *spike*, de difícil expressão, não é compatível com um elevado crescimento celular, devido a uma possível indução de resposta de proteína desdobrada.

Além da temperatura de cultivo, os parâmetros relacionados à taxa de transferência de oxigênio (OTR) no meio de cultivo também são de extrema relevância para a obtenção dos resultados desejados. O crescimento celular e a eficiência de transfecção dependem, diretamente, não apenas da disponibilidade de nutrientes no meio, mas também de fatores como tipo e dimensões do agitador, volume de trabalho e velocidade de agitação. Quando estes fatores não são devidamente adaptados ao meio de cultivo e à linhagem celular utilizados, podem ocasionar um crescimento celular reduzido, formação de agregados celulares (grumos) e sedimentação celular e, até mesmo, morte das células (RIEDEL, 2020). De acordo com Jänicke, *et al.* (2007), o aumento nos volumes de trabalho dos frascos gera um efeito negativo na taxa de transferência de oxigênio, enquanto que o aumento na frequência de agitação e no diâmetro da órbita de agitação gera um efeito positivo no OTR. Desta maneira, o grupo demonstra que em frascos agitados com cerca de 60% de preenchimento do volume útil total, e à velocidade de agitação constante, cultivos de células CHO se apresentavam em estado de limitação de oxigênio já no terceiro dia de processo; este fato não era observado em frascos com volume de trabalho de 40% nas mesmas condições operacionais, o que demonstra que estas condições têm impacto crucial na performance do cultivo.

2.3.3.3 Cultivo de células animais em batelada alimentada: ambiente químico

Devido à complexidade dos sistemas biológicos, cada linhagem celular gerada apresentará suas singularidades e necessidades de cultivo específicas, sendo necessária a adaptação e posterior otimização dos processos, considerando-se cada caso individualmente. Como consequência destas peculiaridades inerentes aos cultivos celulares, é uma prática muito comum a utilização do controle manual de nutrientes em batelada alimentada em alguma etapa do desenvolvimento de bioprocessos, de forma que a medição e análise do substrato são realizadas de forma *offline* e a alimentação é introduzida em intervalos regulares, geralmente em torno de 24 horas para células de mamíferos (FAN; LEY; ANDERSEN, 2018). Alguns dos esquemas clássicos de alimentação manual envolvem a adição intermitente de nutrientes diariamente, a partir do terceiro dia de cultivo, de forma que o volume de solução adicionado pode ser uma porcentagem fixa do volume total do biorreator; adição proporcional à taxa de crescimento celular ou proporcional à concentração de células viáveis (KLAUBERT *et al.*, 2021), além de se ter a opção de manter a concentração de substrato constante após cada pulso de alimentação.

No capítulo XII do livro *Recombinant Glycoprotein Production – Methods and Protocols*, Fan, Ley e Andersen (2017) sugerem algumas estratégias de alimentação alternativas para cultivos em batelada alimentada de células CHO recombinantes, conforme mostrado na Tabela 5. Os dados do grupo são relevantes, pois demonstram a diversidade de estratégias de alimentação que podem ser adotadas para diferentes de linhagens celulares, frente aos meios basais e meios de alimentação disponíveis. Nota-se que é possível a realização da alimentação em intervalos superiores a 24 horas e, ainda, iniciando-se a partir do quarto dia de cultivo, além da possibilidade de se utilizar meios de alimentação mais concentrados ou diluídos, conforme o interesse em minimizar o aumento de volume de trabalho do

biorreator.

Tabela 5: Diferentes estratégias de alimentação para batelada alimentada de células CHO voltada para produção de proteínas recombinantes.

Meio de cultivo basal	Meio de alimentação e estratégias	
ActiCHO P	ActiCHO A; Alimentação diária a partir do dia 3 com 2% em volume em relação ao volume de cultivo inicial.	ActiCHO B; Alimentação diária a partir do dia 3 com 0,2% em volume em relação ao volume de cultivo inicial.
CD CHO	Efficient Feed A; alimentação nos dias 4, 6, 8, 10, 12, etc. Volume de alimentação de 10% em relação ao volume de cultivo inicial	FunctionMax; alimentação nos dias 4, 6, 8, 10, 12, etc. Volume de alimentação de 3,3% em relação ao volume de cultivo inicial
PowerCHO-2 CD	Cell Boost 6; alimentação nos dias 4, 6, 8, 10, 12, etc. Volume de alimentação de 10% em relação ao cultivo inicial.	

Fonte: Adaptado de FAN; LEY; ANDERSEN, 2017.

Em paralelo, é possível avaliar-se estratégias para otimizar os processos produtivos, de forma a permitir a maximização da concentração celular, elevar a produtividade específica e garantir que a proteína de interesse possua os atributos de qualidade necessários. Tal melhoria nos processos de produção pode ser alcançada através da modificação da formulação do meio de cultivo, manipulação das condições de processo (temperatura, pH, agitação, injeção de gases, dentre outros) e do desenvolvimento de estratégias de alimentação específicas (KLAUBERT *et al.*, 2021). Através do aprimoramento da estratégia de alimentação, é possível alcançar aumentos na concentração de células viáveis, na produtividade e na longevidade do cultivo. Uma estratégia alternativa de controle possível de ser aplicada aos cultivos em batelada alimentada é a alimentação dinâmica. As estratégias dinâmicas de alimentação consideram as variações na taxa específica de crescimento e no consumo de nutrientes que ocorrem durante as diferentes fases metabólicas do cultivo em batelada alimentada, as quais podem levar à escassez de nutrientes e ao acúmulo de subprodutos. Desta maneira, é possível utilizar metodologias de controle da alimentação de forma a adaptar o processo à real demanda de nutrientes e crescimento celular, tornando possível a redução de subprodutos, como lactato e amônia, através da redução dos níveis de glicose e glutamina no ambiente de cultivo, além de estimular um metabolismo celular mais eficiente, visto que os substratos são adicionados em quantidade suficiente para o consumo celular, sem sobras excessivas, como pode ocorrer quando se emprega estratégias de alimentação com volumes fixos (LU *et al.*, 2012).

No capítulo *Design of Fermentation Processes* do livro *Bioreaction Engineering Principles*, Villadsen, Nielsen e Lindén (2011) discutem o controle da vazão de alimentação do processo em *fed batch*, objetivando atingir as condições metabólicas ótimas para o cultivo durante todo o tempo de processo. Para tal, são apresentadas duas estratégias de alimentação: manter fixa a concentração de substrato em um valor ótimo durante todo o cultivo, onde espera-se manter constante, por conseguinte, a taxa específica

de crescimento celular (μ), ou, a manutenção da taxa volumétrica de produção de biomassa ao longo do tempo (q_x). É importante ressaltar que, segundo Villadsen, Nielsen e Lindén (2011), devido à natureza do processo de duplicação celular, em que a taxa de crescimento celular é proporcional ao número de células já presentes no meio, é natural que estas estratégias apresentem um caráter exponencial, em que a principal diferença será que, na segunda opção, o expoente do modelo possuirá um valor menor que $\mu_{\text{máx}}$, de forma que se reduza a velocidade de formação de biomassa.

Posto isto, a primeira estratégia é baseada na adição de substrato a uma taxa pouco abaixo da qual este substrato é convertido em produtos indesejados ou de modo a evitar um efeito inibitório no crescimento celular e/ou na formação do produto de interesse. Em contrapartida, a manutenção da taxa volumétrica de crescimento constante é voltada para condições em que a capacidade de suprir o ambiente celular com outro substrato, incluindo a transferência de oxigênio, é limitada. A segunda política normalmente não é usualmente aplicável aos cultivos de células animais, devido ao crescimento celular relativamente lento inerente a estes modelos biológicos. No entanto, com os recentes desenvolvimentos na área de Biotecnologia Farmacêutica, a partir do momento em que há uma quantidade significativa de biomassa formada e, conseqüentemente, maior acúmulo de produtos e metabólitos no meio, a taxa de transferência de oxigênio para o meio pode se tornar um fator limitante do cultivo, instante em que a segunda estratégia se torna uma alternativa atrativa.

No entanto, devido às diversas singularidades e complexidades, anteriormente supracitadas relacionadas ao cultivo de células animais, a modelagem dos mecanismos envolvidos em cultivos de células animais em batelada alimentada durante toda sua extensão de tempo é uma tarefa notavelmente árdua. Durante todo o cultivo, as células são expostas a condições extracelulares que variam continuamente, devido ao sucessivo consumo e esgotamento de nutrientes, seguidos de subseqüentes pulsos de alimentação contendo substrato fresco. As células, devem, portanto, se adaptar frente a esta frequente mudança de condições ambientais, enquanto ocorre, concomitantemente, o progressivo acúmulo de subprodutos indesejados de seu metabolismo no meio extracelular. Por conseguinte, as células passam por diferentes fases metabólicas ligadas aos *shifts* metabólicos (YAHIA *et al.*, 2016).

Adicionalmente, em estágios iniciais da fase de crescimento exponencial em células HEK293, o Ciclo de Krebs³⁷ não possui capacidade de reoxidar toda a produção de NADH³⁸ gerado pela via glicolítica³⁹, ainda que haja oxigênio suficientemente disponível no meio, de forma que há um acúmulo de lactato como subproduto convertido a partir do piruvato produzido pela glicólise, que é eventualmente secretado no meio extracelular (MARTÍNEZ-MONGE *et al.*, 2018). Desta forma, estima-se que cerca de 60 a 80% da glicose e por volta de 16 a 25% da glutamina fornecidos inicialmente como substrato ao cultivo são convertidos a lactato durante a fase exponencial inicial, em células animais industrialmente relevantes (TORRES; ALTAMIRANO; DICKSON, 2018). No entanto, frente a determinadas condições ambientais, este metabólito pode ser consumido pelas células sendo, até mesmo, metabolizado de forma concorrente com a glicose presente no substrato durante a fase de multiplicação exponencial (MARTÍNEZ-MONGE *et al.*, 2018).

³⁷ Ciclo de Krebs: ciclo de reações bioquímicas que ocorrem no organismo e que constituem uma fase da função metabólica em que o ácido acético, é oxidado a CO₂ e água, de modo a fornecer energia para uso em outros processos vitais a célula (MICHAELIS, 2016).

³⁸ NADH: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo.

³⁹ Via glicolítica/glicólise: via metabólica de catabolismo da glicose para produção de energia.

Os principais fatores ambientais que condicionam as células ao consumo de lactato em paralelo ao de glicose são a concentração de lactato no meio de cultivo (ambiente químico) e seu pH (ambiente físico). Isto se dá, pois, há, respectivamente, o acúmulo de moléculas de lactato e de prótons (H^+) no meio extracelular, o que gera um gradiente de concentração na membrana celular e facilita a mediação do transporte de lactato para o interior da célula, de forma que estas condições induzem as células a um *shift* metabólico, parando de produzir lactato, para consumi-lo (MARTÍNEZ-MONGE *et al.*, 2018). Adicionalmente, Martínez-Monge *et al.* (2018) demonstram que, em condições de pH constante, como ocorre em biorreatores, o consumo exclusivo de lactato é estimulado apenas quando a glicose/glutamina presente no sistema como substrato é completamente consumida, após tempo considerável de cultivo, fase na qual as células entram em um estado estacionário, enquanto que o crescimento celular nesta fase é insignificante para fins práticos. Em contrapartida, em sistemas em que o pH é permitido variar livremente, como é normalmente o caso de cultivos em frascos agitados, o consumo concomitante de glicose e lactato é verificado mesmo quando ainda há glicose disponível no meio, mas o pH se encontra abaixo de 6,75.

Não obstante, Liste-Calleja *et al.* (2015) evidenciam que o consumo de lactato por células HEK293 é um aspecto possivelmente vital do metabolismo destas células, viabilizando a detoxificação celular em pH ácido. Este fato se dá pois, frente a níveis de pH abaixo de 6,75, o consumo paralelo de lactato junto a glicose não culmina em uma redução de crescimento ou viabilidade celular, com as células apresentando níveis de crescimento semelhantes a quando apenas glicose é consumida, diferentemente do metabolismo de lactato realizado quando não há mais outra fonte de carbono disponível no meio extracelular. Desta maneira, o grupo é capaz de induzir o metabolismo paralelo de glicose e lactato desde as fases iniciais do cultivo e, ainda, demonstra também que, em pHs abaixo de 6,8, na ausência de lactato no meio, o crescimento celular é severamente inibido. Román *et al.* (2018) postulam que as diferenças de comportamento celular e de importantes parâmetros de cultivo, como densidade de células viáveis e produtividade volumétrica de proteína recombinante, entre os processos em escala de frascos agitados e biorreatores podem ser atribuídas, parcialmente, a diferença no controle de pH e CO_2 nos biorreatores, quando comparados aos frascos agitados, de forma que nem sempre a estratégia de manter o pH e a adição de CO_2 constante em bioprocessos envolvendo células animais é a condução de processo mais adequada.

À vista disso, a modelagem de bioprocessos é, usualmente, realizada em torno das fases de crescimento celular. No entanto, como foi visto neste capítulo, a utilização apenas do perfil de crescimento é limitada, principalmente nas condições ambientais de uma batelada alimentada, potencialmente perdendo as importantes informações dos *shifts* metabólicos, que podem ser apenas observados quando se acompanham os coeficientes de rendimento entre produção e consumo de substratos, além do crescimento celular (YAHIA *et al.*, 2016). O estudo da influência do modo de operação no metabolismo é relevante, pois o acúmulo de metabólitos como lactato e amônia no ambiente de cultivo é relacionado a diversos efeitos inibitórios, como inibição do crescimento celular, redução da expressão de proteínas recombinantes e, até mesmo, alteração nos padrões de glicosilação de glicoproteínas (MARTÍNEZ-MONGE *et al.*, 2018), justificando a busca por meios de se reduzir os níveis de lactato presentes no ambiente de um bioprocessos. O estudo das estratégias de alimentação celular é uma grande ferramenta da engenharia de bioprocessos, pois permite a manutenção da concentração de substrato em níveis bastante reduzidos, de forma que é estimulado o metabolismo celular mais eficiente da fonte de carbono e o consumo do lactato secretado durante o crescimento celular exponencial (LISTE-

CALLEJA et al., 2015).

2.4 Purificação

Após as etapas de geração da linhagem recombinante estável proveniente de células clonalmente derivadas e, posterior criação do banco de células, seguidas da otimização da produção das proteínas alvo em biorreatores, restam as etapas *downstream*⁴⁰ para purificação dos antígenos recombinantes a serem utilizados na formulação final de uma vacina de subunidade. Esta é uma das etapas mais desafiadoras do processo de produção de um produto biológico para uso em humanos e, subseqüentemente, onde ocorrem as maiores perdas, devido à quantidade de etapas de purificação necessárias para atingir-se o nível de pureza requerido e aos rendimentos relativamente baixos correspondentes a cada etapa de purificação. Posto isso, é notável que esta fase do processo é de crítica importância para o desenvolvimento de um imunizante, pois deve possuir máximo rendimento, ser escalonável, além de estar em conformidade com as boas práticas correntes (cGxP) de forma a garantir os extensivos requerimentos para a pesquisa clínica (CIBELLI et al., 2022).

Após a coleta do sobrenadante celular, existe uma gama de possíveis processos de purificação aplicáveis para se atingir o objetivo desejado. No que se refere à purificação da proteína da espícula do SARS-CoV-2, utiliza-se uma etapa de clarificação por ultrafiltração/diafiltração, seguida de processos cromatográficos (ALVIM, et al., 2022b). Várias técnicas são utilizadas para concentrar e/ou purificar proteínas e macromoléculas de interesse de outras proteínas indesejáveis e componentes derivados da célula hospedeira. O mais robusto destes métodos é a cromatografia de afinidade, em que a proteína de interesse é purificada em virtude de suas propriedades de ligação específicas a um ligante imobilizado (THERMOFISHER SCIENTIFIC, 2023). Porém, apesar da geração de produtos de elevado grau de pureza, um dos desafios da utilização dos métodos cromatográficos tradicionais, como a cromatografia por afinidade (majoritariamente cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados) e a cromatografia por exclusão molecular (frequentemente aplicada como uma etapa adicional de polimento após a utilização da cromatografia de afinidade), é a dificuldade de escalonamento destes processos (CIBELLI et al., 2022). Isto representa uma barreira quando se tem como objetivo a produção comercial de um imunizante, por exemplo. Uma proposta alternativa de Cibelli et al. (2022) para a purificação tradicional do sobrenadante de cultivo celular da proteína da espícula recombinante de SARS-CoV-2, livre de etapas de afinidade, é mostrada na Figura 11 abaixo.

⁴⁰ *Downstream*: Etapas de separação e purificação de produtos e subprodutos provenientes do cultivo celular.

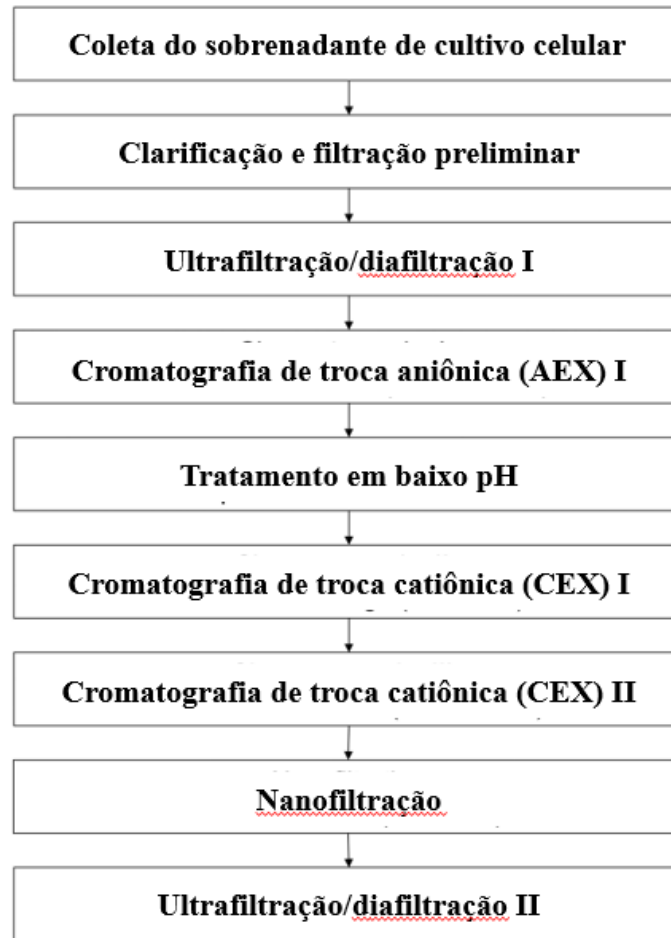


Figura 11: Fluxograma do processo alternativo de purificação da proteína spike estabilizada. Fonte: Adaptado de CIBELLI *et al.*, 2022.

O processo demonstrado na Figura 11 consiste de clarificação do sobrenadante coletado ao final da etapa de cultivo celular por meio de filtração, seguido de ultrafiltração e diafiltração em um tampão adequado para utilização em cromatografia de troca aniônica (AEX). Após a etapa de AEX, o pH é ajustado para 3,5 e, então, o material é submetido a duas etapas de cromatografia de troca catiônica, a primeira em modo *flowthrough*⁴¹, seguido de *bind/elute*⁴². Por último, o purificado das etapas anteriores é submetido a uma última nanofiltração e a uma etapa final de concentração e troca de tampão. As etapas de tratamento a baixo pH e nanofiltração são responsáveis por garantir o perfil de segurança exigido por agências regulatórias internacionais, de forma que executam a purificação de possíveis impurezas de origem viral (CIBELLI *et al.*, 2022). O grupo, desta maneira, reporta um resultado escalonável de 163 mg por litro de coleta de sobrenadante (com níveis aceitáveis de impurezas de 740 ppm de proteínas da célula hospedeira (HCP) e < 6 pg/mL, ou 1,3 ppb, de DNA residual) que fornece uma metodologia comercialmente interessante para o desenvolvimento de futuras vacinas em escala industrial. Vale ressaltar que apesar de um resultado positivo, este corresponde a 22% de rendimento, pois Cibelli *et al.* (2022) reportam uma concentração total de 737,8 mg/L de proteína da espícula no

⁴¹ No modo *flowthrough*, as impurezas se ligam à resina enquanto a macromolécula de interesse é coletada no *flowthrough* da coluna cromatográfica (CYTIVA, 2023).

⁴² No modo *bind/elute*, a macromolécula de interesse se liga ao ligante acoplado à resina por meio de interações de modo misto. Mudanças na composição e pH do tampão liberam a biomolécula da resina para permitir a coleta (a macromolécula escoca com o tampão) (CYTIVA, 2023).

14º dia de cultivo celular.

2.5 Desenvolvimento de novos biológicos

Primeiramente, devido à complexidade e ao elevado custo para a pesquisa, desenvolvimento e fabricação de um novo imunizante, frente aos diversos desafios apresentados neste capítulo, o processo de investigação de possíveis vacinas candidatas ocorre apenas após uma consideração cuidadosa das prioridades de saúde pública regionais (MITCHELL; PHILIPOSE; SANFORD, 1993), levando-se em conta a relação risco-benefício da imunização de pessoas saudáveis, frente à possibilidade de ser contaminado com a doença. De acordo com as orientações do *Food and Drug Administration* (FDA – órgão de vigilância sanitária dos EUA), o caminho do desenvolvimento clínico de uma vacina depende de sua indicação e população-alvo e, por conseguinte, dependerão também da população de estudo, do laboratório clínico, do formato de avaliação clínica, do desenho do estudo e dos *endpoints* escolhidos, que serão especificamente adaptados ao escopo do produto. Desta forma, os recursos públicos, nacionais e/ou internacionais, e dos setores privados podem ser melhor direcionados para um objetivo em comum ou metas complementares de saúde pública (MITCHELL; PHILIPOSE; SANFORD, 1993).

No Brasil, a agência regulatória responsável pela fiscalização e emissão do licenciamento de produtos farmacêuticos é a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), que tem o papel de definir a regulamentação do setor e avaliar os processos e dados recebidos, do ponto de vista da comprovação de qualidade, eficácia e segurança (ANVISA, 2023b). Atualmente, de acordo com a agência, existem 6 principais etapas do desenvolvimento de vacinas (Tabela 6). Adicionalmente, segundo a ANVISA, o desenvolvimento de uma nova vacina deve atender aos mais altos padrões de exigência de qualidade, segurança e eficácia. Desta maneira, a agência revisa os documentos técnicos e regulatórios e verifica os resultados destes parâmetros, de forma a avaliar a liberação do registro do produto, que permite a comercialização e disponibilização de um novo imunizante no país.

Os ensaios clínicos são estudos de pesquisa que tem como objeto de análise novos testes e tratamentos em desenvolvimento, de forma a avaliar profunda e criticamente seus impactos na saúde humana e também possíveis efeitos adversos. Estes testes são realizados para intervenções médicas como novos medicamentos, produtos biológicos, terapias celulares, além de procedimentos cirúrgicos, radiológicos, dispositivos médicos, tratamentos comportamentais e preventivos (OMS, 2023b). A principal diferença entre a etapa pré-clínica e os ensaios clínicos é a que a primeira fundamentalmente estuda questões da segurança do novo medicamento ou biológico, enquanto a segunda avalia a fundo como a formulação interage com o corpo humano (FDA, 2018).

Tabela 6: Etapas do Desenvolvimento de Vacinas no Brasil.

Etapa do desenvolvimento de vacinas	Breve descrição
Pesquisa básica e testes não clínicos	Identificação de possíveis candidatos à vacina.
Estudos clínicos	Realizados em humanos após se ter dados preliminares em animais e testes de laboratórios (<i>in vitro</i>).
Fase 1	Primeira etapa dos testes em humanos, para avaliação da segurança e de reações aceitáveis.
Fase 2	Avaliação da dose, do esquema de vacinação e da imunogenicidade da vacina.
Fase 3	Estudos realizados em grande número de voluntários para avaliar a eficácia e a segurança da vacina.
Registro	Após a verificação da eficácia, da segurança e da qualidade da vacina, a ANVISA faz o registro, que permite que a vacina seja comercializada e disponibilizada no Brasil.

Fonte: Adaptado de ANVISA, 2023c.

Um dos aspectos técnicos mais relevantes no contexto dos estudos clínicos é a randomização, que quando aplicada corretamente, minimiza os vieses e desequilíbrios nas características basais entre os grupos de estudo, o que garante a aplicação da medicina baseada em evidências e resultados de maior confiabilidade. Durante o processo de randomização, um indivíduo tem a mesma chance de ser designado para um grupo de tratamento específico (KAO *et al.*, 2008). Esta metodologia é a majoritariamente aplicada na indústria farmacêutica, correspondendo a quase 100% dos estudos de fase III desenvolvidos durante a pandemia para as vacinas candidatas contra COVID-19 (ARNOLDI; LIMA; CASTILHO, 2022), vide Tabela 7 abaixo. É importante ressaltar que a randomização dos ensaios clínicos não deve ser confundida com o mascaramento, que ocorre após a randomização e é definido como o procedimento em que uma ou mais das partes interessadas de um teste clínico são mantidas alheias a qual grupo de tratamento o participante foi assinalado (EUPATI, 2023). Em geral, os testes clínicos realizados em humanos, envolvem participantes de mais de uma instituição de pesquisa ou médica e, com grande frequência, mais de um país, onde cada país possui autoridade regulatória para exigir requerimentos próprios para os testes clínicos (OMS, 2023b).

Tabela 7: Metodologias utilizadas em estudos clínicos durante o cenário pandêmico.

Estudo clínico	Randomizado	Não randomizado	Aberto ⁴³	Cego ⁴⁴	Duplo cego ⁴⁵	Triplo cego ⁴⁶	Quadruplo cego ⁴⁷
Fase 1	75%	25%	29%	21%	21%	4%	25%
Fase 2	75%	25%	12%	31%	25%	19%	13%
Fase 3	96%	4%	8%	8%	46%	13%	25%

Fonte: Elaboração própria, março/2021.

Adicionalmente, de acordo com a agência estadunidense, o desenho de estudos clínicos deve responder a perguntas específicas relacionadas à qualidade e segurança do produto. Estes estudos devem também seguir um plano de estudos, ou protocolo, que é desenvolvido pela instituição de pesquisa ou fabricante. Um exemplo de roteiro de perguntas que devem constar em um protocolo de estudo é demonstrado na Tabela 8.

Tabela 8: Perguntas a serem respondidas no projeto de um ensaio clínico.

Pergunta	Objetivo
1	Quem se qualifica para participar do estudo? (critérios de seleção)
2	Quantas pessoas farão parte do estudo?
3	Quanto tempo vai durar o estudo?
4	Haverá um grupo de controle e outras formas de limitar o viés da pesquisa?
5	Como o medicamento/biológico será administrado aos pacientes e em que dosagem?
6	Quais avaliações serão realizadas, quando e quais dados serão coletados?
7	Como os dados serão revisados e analisados?

Fonte: Adaptado de FDA, 2018.

⁴³ Aberto: Todas as partes interessadas tem conhecimento dos grupos de tratamento correspondente (EUPATI, 2023).

⁴⁴ Cego: Apenas os participantes estão alheios a qual grupo de tratamento pertencem (EUPATI, 2023).

⁴⁵ Duplo cego: Os participantes e os coletores de dados e clínicos estão alheios a qual grupo de tratamento os participantes pertencem (EUPATI, 2023).

⁴⁶ Os participantes, coletores de dados, clínicos, juízes e analistas de dados estão alheios a qual grupo de tratamento os participantes pertencem (EUPATI, 2023).

⁴⁷ Os participantes, prestadores de cuidados, investigadores e avaliadores de resultados estão alheios a qual grupo de tratamento os participantes pertencem (ASHRAF *et al.*, 2021).

Quanto às fases dos estudos clínicos, os ensaios de fase 1 (ou fase I) são o primeiro passo de testagem para o desenvolvimento de um novo tratamento ou produto para uso humano, testando a segurança, efeitos adversos, dosagem e espaçamento entre doses do agente medicinal candidato. Estes testes também podem avaliar a melhor via para administrar um novo tratamento (NIH, 2023a). Normalmente, avalia-se, nesta etapa, o desempenho de um novo medicamento em um pequeno grupo de forma a verificar a faixa de segurança da dosagem e potenciais efeitos secundários (OMS, 2023b).

Já os ensaios de fase 2 (ou fase II), são desenvolvidos de forma a assegurar que o novo tratamento proposto possui eficácia suficientemente promissora para compensar a continuidade da investigação em ensaios de fase 3 (ou fase III), que possuem uma escala significativamente maior e, portanto, maiores custos associados (TORRES-SAAVEDRA; WINTER, 2022). Estes estudos clínicos de fase III são testes que verificam, além da segurança, o quão eficaz o novo tratamento é quando comparado a alternativas existentes (NIH, 2023b), ou frente ao risco associado ao tratamento/imunização de um indivíduo saudável. Os testes de fase 3 são, usualmente, a última barreira anterior à aprovação de um novo tratamento candidato (OMS, 2023b).

Adicionalmente, segundo o FDA, os testes clínicos da fase III devem fornecer a documentação crítica de eficácia e segurança da vacina, dados que são cruciais para o seu licenciamento. Desta forma, é recomendado pela agência que, em antecedência ao início dos estudos clínicos da fase 3, seja discutido com o órgão regulador correspondente os detalhes relacionados à condução do ensaio de forma a garantir que estes sejam adequadamente planejados para atender aos objetivos declarados e lograr o licenciamento do produto. Outro ponto relevante quanto ao desenvolvimento de um novo medicamento ou biológico, é o elevado custo destes ensaios clínicos e a expressiva taxa de falhas, onde, uma quantidade significativa dos tratamentos propostos não progride para a próxima fase de estudo, este fato pode ser observado na Tabela 9, conforme dados obtidos pelo FDA até 2018.

Tabela 9: Número de participantes (estimado), duração do estudo (estimada), propósito do estudo e taxa de sucesso por fase de estudo clínico.

Fase de Estudo Clínico	Número de participantes (estimado)	Duração do estudo (estimada)	Propósito do estudo	Taxa de sucesso
1	20 a 100	Vários meses	Segurança e dosagem	~70% dos candidatos
2	Até várias centenas de indivíduos	Vários meses a 2 anos	Eficácia e efeitos adversos	~33% dos candidatos
3	300 a 3000	1 a 4 anos	Eficácia e monitoramento de reações adversas	25-30%
4	Milhares de indivíduos	N/A	Segurança e eficácia	N/A

Fonte: Adaptado de FDA, 2018.

Por último, existem também os estudos pós-registro do produto. Os testes de fase 4 (ou fase IV) são realizados após o tratamento ter sido aprovado pelos respectivos órgãos competentes e já está disponível no mercado, de forma que estes ensaios são conduzidos para determinar a segurança e eficácia a longo prazo do produto, em conjunto com a triagem e identificação de possíveis efeitos adversos que não foram aparentes nos testes de fases anteriores (NIH, 2021). Ainda, vale ressaltar que nem todos os estudos fase IV são estudos de farmacovigilância, porém todo estudo de farmacovigilância é um estudo fase 4, de forma que estes são de extrema importância para avaliar a eficácia de um tratamento no mundo real, complementando os dados de eficácia disponíveis dos testes controlados anteriores e estabelecendo o verdadeiro perfil de segurança do produto (SUVARNA, 2010).

É relevante observar também que, além da realização das etapas dos testes clínicos em ordem cronológica, como classicamente era praticado, frente à emergência sanitária causada pela pandemia de COVID-19, os estudos clínicos têm sido desenvolvidos de forma adaptativa globalmente, de forma que as fases de ensaios clínicos e pré-clínicos podem ser executadas simultaneamente, permitindo a obtenção paralela de resultados mais rapidamente (ANVISA, 2023c). A Figura 12 abaixo apresenta o panorama da distribuição dos estudos clínicos para vacinas candidatas contra COVID-19 durante o cenário pandêmico.

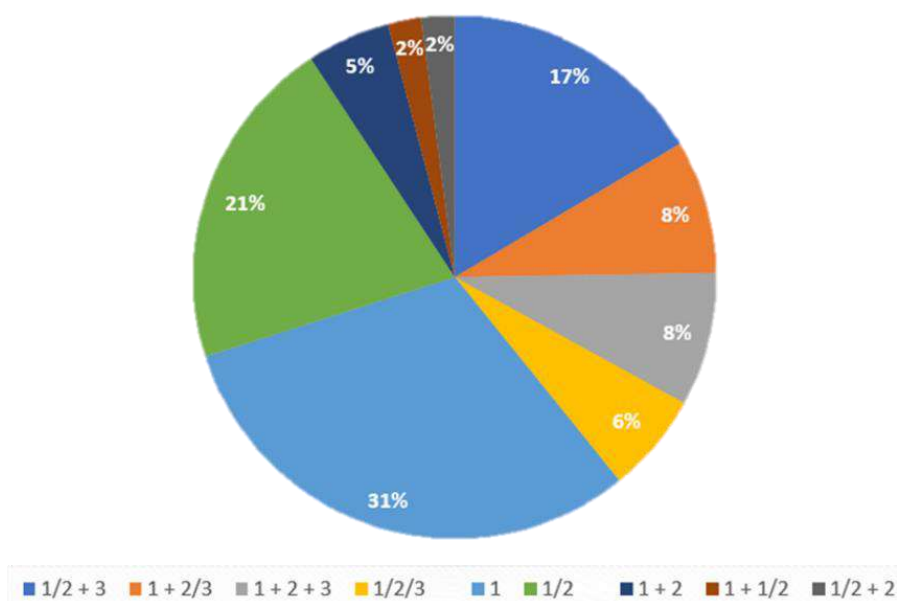


Figura 12: Distribuição das fases dos estudos clínicos de vacinas candidatas para COVID-19 durante o cenário pandêmico. Fonte: Elaboração própria, março/2021.

3. MATERIAIS E METODOLOGIA EXPERIMENTAL

3.1 Transfecção e geração de linhagens celulares recombinantes estáveis

Para todos os experimentos, com o preparo de soluções *in situ*, foi utilizada água ultrapura advinda de um sistema de purificação Milli-Q® (Merck, Alemanha).

Inicialmente, células da linhagem HEK293-3F6 (NRC, Canadá), adaptadas previamente ao cultivo em suspensão, foram diluídas para a concentração de 1×10^6 células viáveis por mL. As células foram então transfectadas pelo método de lipofecção⁴⁸ em meio comercial HEK TF (Sartorius Xell, Alemanha). Utilizou-se 1 μ L/mL do reagente Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific, EUA) e 25 μ L/mL do diluente Opti-MEM™ (Thermo Fisher Scientific, EUA), para preparar uma solução de transfecção (onde é formado um complexo plasmídeo-lipídeo) na presença de a 0,50 μ g/mL do vetor de DNA pCIneoBA2, contendo a sequência de genes codificante do ectodomínio da variante ômicron da proteína da espícula de SARS-CoV-2 em sua conformação pré-fusão, além do gene neomicina fosfotransferase, responsável por conferir resistência ao antibiótico G418 sulfato (Thermo Fisher Scientific, EUA).

As medições de viabilidade e de concentração de células viáveis (no inglês, VCD) para este e para os experimentos posteriormente descritos foram realizadas utilizando-se o método de exclusão por azul de tripan, com auxílio do contador celular automático Vi-Cell XR (Beckman Coulter, EUA), mostrado na Figura 13 abaixo.



Figura 13: Contador automático de células Vi-Cell XR utilizado na obtenção de dados primários. Fonte: Arquivo pessoal.

3.2 Cultivo celular

Entre dois e quatro dias após a transfecção, tem-se início a etapa de seleção de transfectantes positivos por meio do cultivo celular na presença do marcador de seleção, o antibiótico G418 sulfato em (100 μ g/mL), por um período de aproximadamente quatro semanas, de forma a selecionar uma subpopulação celular que expressa estavelmente a proteína da espícula recombinante. Esta etapa compreendeu o cultivo celular, utilizando-se

⁴⁸ Lipofecção: Técnica de transfecção que utiliza de lipossomos para o transporte da carga de DNA para o interior das células. Esta técnica pode ter efetividade de cinco até cem vezes maior do que outras técnicas de transfecção como por fosfato de cálcio ou com DEAE-dextran, de acordo com o tipo de célula aplicado (VON GROLL, 2003).

tubos agitados com tampa ventilada (Figura 14) de 50 mL (TubeSpin® TPP AG, Suíça) em suporte inclinado com agitação de 180 rpm (agitador orbital New Brunswick Scientific, EUA), a concentração de 1×10^6 células viáveis por mL e avolumados a 10 mL de meio quimicamente definido livre de componentes provenientes de origem animal HEK TF. Os cultivos foram carreados no ambiente controlado da incubadora de CO₂ (ThermoFischer Scientific, EUA) a 37°C e 5% de CO₂.

A cada 48 a 96 horas, a viabilidade celular foi registrada e a concentração de células viáveis ajustada para cerca de 1×10^6 células viáveis por mL, diluindo-se com meio fresco HEK TF contendo o agente químico G418 sulfato a 100 µg/mL. As trocas de meio de cultivo foram realizadas por meio da centrifugação dos *spin-tubes* a 300 g por 5 minutos, gerando-se um *pellet* ao fundo do frasco, seguindo-se de gentil ressuspensão e, então, diluição das células em concentração desejada em um volume final de 10 mL. Utilizou-se também nesta etapa, como controle negativo *mock*, células parentais HEK293 transfectadas com lipídio, porém sem adição de DNA, na presença do antibiótico e nas mesmas condições de cultivo anteriormente descritas.

Após as etapas de transfecção e de pressão seletiva, as células geneticamente modificadas foram avaliadas através do acompanhamento do cultivo celular na presença e na ausência de G418 sulfato. Foi realizado, para fins de avaliação do comportamento do metabolismo celular, o acompanhamento e comparação das viabilidades e taxas de crescimento dos cultivos das linhagens transfectadas na presença e ausência do agente químico G418 sulfato por aproximadamente três semanas. Estes cultivos foram realizados seguindo a metodologia anteriormente exposta e nas mesmas configurações experimentais supracitadas.

3.3 Batelada alimentada e estratégias de alimentação

Devido à complexidade e demanda temporal da etapa referente ao isolamento e caracterização de clones recombinantes de alta produtividade a partir do *pool* de células transfectadas, foram utilizadas linhagens estáveis isoladas previamente em trabalhos do grupo do Laboratório de Engenharia de Cultivo Celulares para os estudos cinéticos e de modelagem de bioprocessos. Estas linhagens, geradas anteriormente pelo trabalho de Federico Marsili e Renata Alvim, foram obtidas através do mesmo processo de transfecção e pressão seletiva previamente abordado. Os clones produzidos foram isolados sendo então, posteriormente, criopreservados em ultrafreezer e/ou nitrogênio líquido, de forma que a proteína de interesse seja produzida por células oriundas de um mesmo banco.

Estudos cinéticos com cultivos celulares em suspensão foram realizados, na modalidade batelada alimentada, utilizando-se quatro linhagens HEK293 previamente transfectadas: HEK293-617-B4, HEK293-D614G-F9, HEK293-P1-C9, além do *pool* de células produtoras da variante ômicron de SARS-CoV-2 (HEK293-S-BA2). Estes cultivos foram mantidos em frascos do tipo *Erlenmeyer* de 250 mL, com tampa ventilada e sem chicanas (Corning, EUA), agitados a 140 rpm (órbita de 1" ou 2,54 cm) e contendo 40 mL de meio comercial HEK TF, sem adição de antibióticos, com concentração inicial de, aproximadamente, 7,0 g/L de glicose e 1×10^6 células viáveis por mL (com viabilidades iniciais > 96%), no ambiente controlado da incubadora de CO₂ umidificada, a 37°C e 5% de CO₂ e dispostos conforme Figura 14. Os volumes de trabalho dos cultivos foram desenhados de forma a preencherem uma razão inferior a 30% da capacidade total do frasco agitado. Essa limitação se dá devido à saturação da capacidade de aeração do sistema (KLAUBERT *et al.*, 2021) frente à limitada área da interface líquido-gás, onde ocorre a transferência de massa do sistema. A solução comercial concentrada de nutrientes,

quimicamente definida, livre de conteúdo de origem animal, HEK FS (Sartorius Xell, Alemanha), suplementada com 10% de L-alanil-L-glutamina, GlutaMAX (ThermoFischer Scientific, EUA), foi utilizada como solução para alimentação. Esta solução suplementada com GlutaMAX contém uma concentração de aproximadamente 30 g/L de substrato (glicose).

As medições de viabilidade, concentração de células viáveis, glicose e lactato foram acompanhadas diariamente durante toda a duração do experimento e, com base nestas medições, a concentração de glicose foi ajustada utilizando-se a solução concentrada de nutrientes, HEK FS, contendo aproximadamente 30 g/L de glicose, de modo a ajustar a concentração de glicose final no meio de cultivo para 3,5 g/L (condição recomendada previamente determinada empiricamente no laboratório), após cada pulso de alimentação, aplicando-se a equação, ou eq., (3.1) abaixo, manipulada diretamente através do balanço de massa global e por componentes do sistema, em que $V_{F,n}$ é o volume de alimentação (*feed*) a ser adicionado no dia n , V_{n-1} é o volume de meio contido no frasco anterior à adição de solução concentrada de alimentação fresca, S_n é a concentração de substrato que se deseja obter pós adição, S_F é a concentração de substrato na alimentação (*feed*) e S_{n-1} é a concentração anterior à alimentação. O volume V_{n-1} é obtido diretamente através da medição do volume adicionado aos frascos e removido durante as atividades de amostragem, ou, indiretamente, através da pesagem da massa de líquido no interior dos frascos, onde 1 g de meio corresponde a aproximadamente 1 mL⁴⁹.

$$V_{F,n} = \frac{V_{n-1}(S_n - S_{n-1})}{(S_F - S_n)} \quad (3.1)$$

O monitoramento de glicose e lactato foi realizado através do analisador bioquímico de metabólitos YSI 2700 *Select Biochemistry Analyzer* (Yellow Springs Instruments, EUA), que utiliza das enzimas glicose oxidase e lactato oxidase imobilizadas no biossensor de glicose e lactato, respectivamente. Ao final do cultivo, o sobrenadante foi coletado e centrifugado a 1000 g por 10 minutos, sendo posteriormente filtrado e armazenado sob refrigeração. Adicionalmente, é relevante realizar a coleta do sobrenadante antes de haver uma queda na viabilidade celular para valores menores que 60% (FAN; LEY; ANDERSEN, 2018), para evitar excessiva liberação de proteases e outros subprodutos tóxicos no meio extracelular, durante a fase de declínio celular, que podem degradar a proteína de interesse ou dificultar substancialmente sua recuperação.

⁴⁹ Considerou-se a densidade da suspensão de células equivalente à da água, pois o meio HEK TF é aquoso ($\rho \approx 1$ g/mL) e as células têm densidade $\sim 1,07$ g/mL)

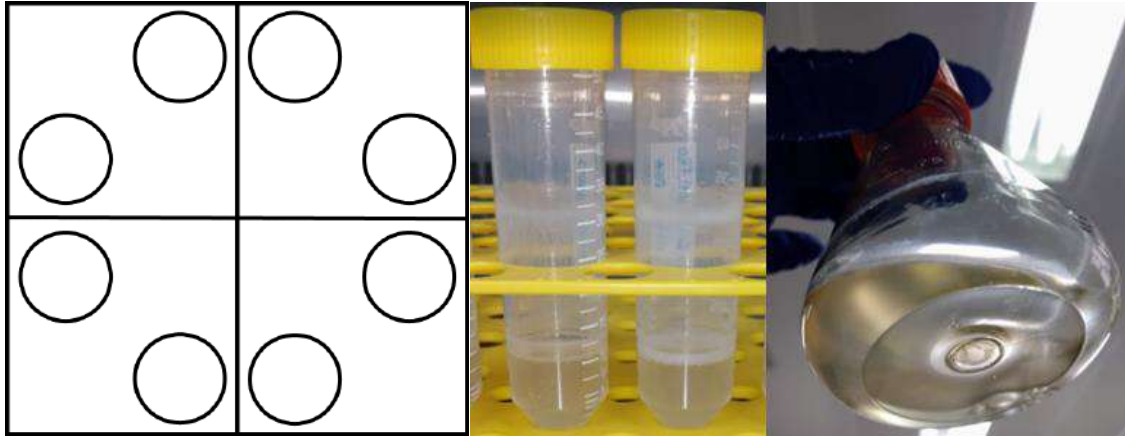


Figura 14: Disposição dos frascos Erlenmeyers ventilados no agitador orbital (à esquerda). Ilustração do cultivo em frascos agitados do tipo TubeSpin® e Erlenmeyer, respectivamente. Fonte: Arquivo pessoal.

Para os experimentos de estudo das diferentes estratégias de alimentação, o cálculo da taxa específica de consumo de substrato q_s foi realizado através de dados experimentais para a fase exponencial de cultivos em batelada simples obtidos previamente pelo membro do Laboratório de Engenharia de Cultivos Celulares Renata G. F. Alvim, utilizando-se das mesmas linhagens celulares, meio de cultivo, solução de alimentação e condições de cultivo previamente abordadas e, baseando-se na aproximação da eq. (3.2) pela determinação da integral de células viáveis (ICV).

A equação (3.2) abaixo, supondo-se q_s constante no intervalo de tempo considerado para a análise, permite que este parâmetro seja calculado a partir dos dados de ICV, definida na eq. (3.3), traçando-se os dados experimentais de cultivos celulares correspondentes a concentração de substrato (glicose) contra ICV nos diferentes tempos de amostragem. O valor da taxa q_s é então determinado por meio de regressão linear, pois o coeficiente angular da reta é o oposto de q_s . Os valores de ICV foram aproximados a partir do método dos trapézios para o cálculo da área sob a curva de um gráfico representando a concentração de células viáveis (X_v) contra o tempo (t).

$$q_s = -\frac{1}{X_V} \frac{dS}{dt} \quad (3.2)$$

$$ICV = \int_0^t X_V dt \quad (3.3)$$

Considerando-se q_s constante, obtêm-se a eq. (3.3), onde \bar{X}_V é a concentração média de células viáveis no intervalo avaliado.

$$q_s \bar{X}_V \int_{t_0}^t dt = - \int_{S_0}^S dS \quad (3.4)$$

$$q_s \bar{X}_V (t - t_0) = -(S - S_0) \quad (3.5)$$

O volume de alimentação a ser adicionado ao sistema a cada intervalo de tempo, a partir de um determinado dia do cultivo, foi então estimado através da média aritmética da concentração de células viáveis medida experimentalmente no dia i e da concentração de células viáveis prevista para o dia seguinte ($i+1$), conforme eq. (3.6). Utilizando-se da taxa

de crescimento específica obtida por meio da eq. (3.9), correspondente ao coeficiente angular obtido ao realizar a regressão linear do logaritmo natural da concentração de células viáveis (X_v) contra o tempo, e aplicando-a o valor de μ encontrado na eq. (3.10), é possível prever a concentração de células ao longo do tempo.

$$\bar{X}_{i,i+1} = \frac{X_i + X_{i+1}}{2} \quad (3.6)$$

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (3.7)$$

Considerando μ constante, tem-se:

$$\mu \int_{t_0}^t dt = \int_{X_0}^X \frac{1}{X} dX \quad (3.8)$$

$$\mu(t - t_0) = \ln X - \ln X_0 = \ln\left(\frac{X}{X_0}\right) \quad (3.9)$$

$$X = X_0 e^{\mu(t-t_0)} \quad (3.10)$$

Para as demais estratégias de alimentação estudadas, utilizou-se a eq. (3.1) para a previsão do volume de solução concentrada em nutrientes a ser adicionado a cada pulso de alimentação para atingir-se a concentração final de substrato (glicose) desejada no meio de cultivo, sendo estas concentrações definidas em 2,5 ou 3,5 g/L de glicose. Adicionalmente, desenhou-se os experimentos de maneira a avaliar se o dia inicial de adição do feed promoveria efeitos positivos ou negativos no comportamento do cultivo, sendo avaliada a adição inicial de alimentação nos dias 4 e 5 de cultivo.

3.4 Detecção semi-quantitativa da produção de proteína *spike* recombinante por imunensaio do tipo *spot blot*

Em sequência, para a detecção da presença e estimativa da produção de proteína da espícula recombinante no sobrenadante dos cultivos, adicionou-se 3 μ L de amostras de sobrenadante, previamente centrifugados, a uma membrana de nitrocelulose 0,45 μ m (ThermoFischer Scientific, EUA). Após secagem das amostras, a membrana deve ser incubada em solução de bloqueio com 5% (m/v) de leite em pó desnatado (Molico, Brasil) em tampão tris salino (TBS) + Tween 20 (ambos Sigma-Aldrich, EUA) a 0,05% por 1h30 a 2 h, a fim de evitar-se que o anticorpo utilizado para a detecção da proteína da espícula do SARS-CoV-2 seja adsorvido de forma não-específica pela superfície da membrana.

Então, esta membrana passa por um processo de incubação com um anticorpo monoclonal primário anti-proteína *spike* #IM-0827 (RHEABIOTECH, Brasil), produzido em camundongo, na diluição de 1:4000 em solução de incubação TBS 1X + Tween 20 a 0,05% e 0,5% (m/v) de leite em pó desnatado, por 50 min a 1 h e, posteriormente, incubação secundária por cerca de 1 h com anticorpo monoclonal (mAb) anti-camundongo

conjugado a HRP⁵⁰ produzido em cabra (#A4416, Sigma-Aldrich, EUA), em diluição 1:10000, na mesma solução de incubação, respectivamente. Entre as etapas de bloqueio e incubação, a membrana é rinsada e lavada com 15 a 20 mL solução TBS 1X + Tween 20 a 0,05%.

Por fim, a membrana é tratada com 300 µL de solução proveniente de um kit de revelação Clarity™ Western ECL Substrate (BIO-RAD, EUA), um substrato quimioluminescente compatível com o mAb anti-camundongo HRP Sigma 1:10000 (#A4416, Sigma-Aldrich, EUA) utilizado. Desse modo, espera-se que, ao revelar a membrana, seja possível observar um sinal de quimioluminescência proporcional à concentração de proteína da espícula nos pontos (*spots*) contendo esta proteína de interesse. Adicionalmente, Stuible *et al.* (2021) destacam a importância da realização destas análises de proteína da espícula em tempo hábil, devido a tendência desta proteína de se degradar progressivamente em armazenamento a 4 °C. Este foi um dos motivos que estimulou o desenvolvimento de variantes termoestáveis da proteína S.

A quantificação dos resultados obtidos através do procedimento de *spot blot* foi realizada utilizando-se o *software open-source*⁵¹ gratuito ImageJ 64-bit Java 8 versão 1.53t de 24/ago/2022 para o sistema operacional Windows 10 (disponível em: <https://imagej.nih.gov/ij/download.html>). O programa escolhido foi classificado como *Configured Off-The-Shelf* (COTS), pois permite parametrização e armazenamento de dados no sistema, no entanto, o *software* não foi customizado de nenhuma maneira para se adequar às necessidades específicas da análise realizada. Posto isto, foram utilizados os módulos *built-in*⁵² *Gels* > *Select First Lane* > *Plot Lanes* e *Analyse* > *Measure* > *Area* para quantificação da densitometria de *pixels* apresentada na imagem resultante da revelação do imunoblot. Portanto, a partir do processo exposto, é possível realizar a criação de curvas de calibração que permitem correlacionar a densitometria de *pixels* analisada a uma concentração conhecida de proteína espícula de SARS-CoV-2 presente em um controle positivo, para cada variante da proteína S avaliada (conforme Figura 15 abaixo).

⁵⁰ HRP: horseradish peroxidase, ou peroxidase de “raiz forte”.

⁵¹ *Open-source*: programa de código aberto, disponibilizado ao público.

⁵² *Built-in*: módulos/funções que fazem, integralmente, parte original de um sistema.

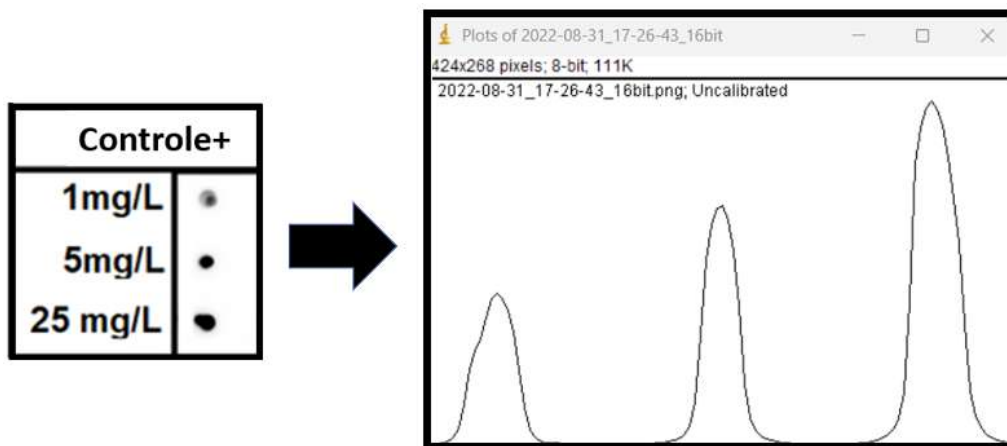


Figura 15: Análise semi-quantitativa de densitometria do spot blot para proteína S realizada pelo software gratuito ImageJ. O programa correlaciona a intensidade de pixels presentes na imagem (proporcional a concentração de proteína S) gerada através da revelação do imunoblot à área abaixo da curva, possibilitando seu equacionamento matemático.

4. MODELAGEM FENOMENOLÓGICA DE BIOPROCESSOS

O objetivo deste capítulo é descrever as premissas e equações adotadas para a modelagem matemática de diferentes estratégias de alimentação para o processo em batelada alimentada conduzido em linhagens recombinantes de células HEK293 produtoras de proteínas de difícil expressão, como é o caso da proteína da espícula do vírus SARS-CoV-2. O ponto de partida utilizado para os resultados reportados no item 5.4 deste trabalho são parâmetros cinéticos obtidos empiricamente através dos dados para a fase exponencial de batelada simples obtidos pelo membro do Laboratório de Engenharia de Cultivos Celulares Renata G. F. Alvim com as mesmas linhagens celulares, meio de cultivo, solução de alimentação e condições de cultivo previamente abordadas, conjuntamente com as devidas restrições para estes parâmetros cinéticos, em conformidade com registros reportados na literatura para o cultivo de células animais recombinantes (também discutido no item 5.4).

Quanto à escolha dos modelos matemáticos representativos de bioprocessos, Villadsen, Nielsen e Lidén (2011) destacam no capítulo *Design of Fermentation Processes* do livro *Bioreaction Engineering Principles* que, apesar de os processos de batelada e batelada alimentada serem intrinsecamente transientes, as mudanças ambientais que ocorrem durante o cultivo em biorreatores são suficientemente lentas para justificar um estado metabólico quase estacionário das células presentes, com verdadeiro comportamento dinâmico sendo experimentado apenas quando há mudanças abruptas de substrato ou parâmetros de cultivo.

Por conseguinte, frente ao estado estacionário adotado como premissa biológica nestes processos, tem-se que as taxas de reação dos modelos cinéticos e de produção podem ser mensuradas por modelos cinéticos não-estruturados⁵³ Monodianos (VILLADSEN; NIELSEN; LIDÉN, 2011), vide eq. (4.1), onde μ e $\mu_{m\acute{a}x}$ representam, respectivamente, a taxa e taxa máxima específica de crescimento celular em h^{-1} , $K_{S,i}$, a constante de saturação para o substrato i em g/L e S_i , a concentração do substrato i presente no meio em g/L. Estes parâmetros podem ser obtidos empiricamente utilizando-se de dados experimentais referentes a diferentes concentrações iniciais de substrato e suas respectivas medições de taxa específica de crescimento celular ao longo do tempo para a linhagem de interesse (YAHIA; MALPHETTES; HEINZLE, 2021). A definição da taxa específica de crescimento celular é apresentada na eq. (4.2).

$$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \prod_{i=1}^n \frac{S_i}{K_{S_i} + S_i} \quad (4.1)$$

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (4.2)$$

O fator de rendimento para o crescimento celular e a taxa específica de consumo de substrato podem ser representados pelas eq.s (4.3) e (4.4), respectivamente.

⁵³ Modelos cinéticos de bioprocessos não-estruturados: o material celular é representado por uma única variável, como a massa celular ou o número total de células.

$$-Y_{x/s} = \frac{\frac{dX}{dt}}{\frac{dS}{dt}} \approx \frac{\Delta X}{\Delta S} \quad (4.3)$$

$$q_s = -\frac{1}{X} \frac{dS}{dt} \quad (4.4)$$

Adicionalmente, é comum a adição de coeficientes de manutenção e morte celular, para representatividade mais fiel do comportamento metabólico em avaliação. No entanto, estudos de *Design of Experiment*, DOE, de Kornecki e Strube (2019) para modelos biológicos de células de mamíferos recombinantes demonstram que estes parâmetros de modelos cinéticos não possuem efeitos estatisticamente significativos para estes bioprocessos quando se aplica a abordagem cinética de Monod (1949). O estudo desenvolvido pelo grupo sugere que os principais parâmetros cinéticos destes modelos aplicados a células animais, voltados a resposta de produção de biomassa viável X_v , são: a taxa específica máxima de crescimento celular $\mu_{m\acute{a}x}$; os coeficientes de rendimento $Y_{Pi/Si}$ de conversão de glicose em massa celular, glutamina em amônia, glutamina em massa celular e glicose em lactato; seguidos da densidade de células viáveis X_v , respectivamente. Desta maneira, devido ao baixo benefício da incorporação de complexidade resultante dos termos de manutenção e morte celular, estes termos não foram adotados durante as simulações apresentadas posteriormente neste capítulo.

Logo, conforme demonstrado no Capítulo 3: Materiais e Metodologia Experimental, frente às medições de glicose e lactato realizadas experimentalmente no Laboratório de Engenharia de Cultivos Celulares, a eq. (4.2) pode ser apresentada na forma do modelo de base Monodiana de Aiba *et al.*, (1968), explicitado na eq. (4.5) abaixo, considerando-se a contribuição da inibição do crescimento celular pelo subproduto lactato, conforme abordado anteriormente na seção 2.3.3.3.

$$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \frac{[Glc]}{K_{glc} + [Glc]} \frac{K_{lac}}{K_{lac} + [Lac]} \quad (4.5)$$

Após a definição do modelo metabólico, é possível obter as equações que governam as políticas de alimentação do biorreator através da aplicação do balanço de massa por componentes do sistema.

$$\left(\frac{d(cV)}{dt}\right)_{ac\acute{u}mulo} = c_{feed}F(t) - c_{saída}F(t) + V \left(\frac{dc}{dt}\right)_{geração/consumo} \quad (4.6)$$

Em que c é um componente do meio de cultivo (S , P ou X) e o termo $c_{saída}F(t)$ é nulo, uma vez que não há corrente de saída. A partir do balanço de massa por componente, a estratégia de alimentação exponencial é modelada tal que a concentração de substrato S no meio de cultivo seja mantida constante. Uma vez que $S = S_o = [Glc]_o$ e assumindo-se, para fins de simplificação matemática, a premissa de que a concentração de lactato extracelular se mantém aproximadamente constante durante a maior parte do cultivo após o início da política de alimentação escolhida, tem-se que:

$$\mu_o = \mu_{\max} \frac{[Glc]_o}{K_{Glc} + [Glc]_o} \frac{K_{Lac}}{K_{Lac} + \overline{[Lac]_o}} \quad (4.7)$$

Onde $[Glc]_o$ e $\overline{[Lac]_o}$ são, respectivamente, a concentração de glicose a qual tem-se interesse em ser mantida após a etapa de batelada simples inicial, que é fixada em um valor constante adequado e, a concentração média de lactato no meio de cultivo prevista após início da alimentação e baseada em dados experimentais de triagem inicial. Logo, aplicando-se as eqs (4.2), (4.3) e (4.7) no balanço de massa por componente (4.6), obtêm-se as expressões abaixo, onde o tempo t começa a ser contado ao final da etapa de batelada simples inicial ($t_o = 0$).

$$X = X_o \frac{\exp(\mu_o t)}{1 + bX_o \exp(\mu_o t) - bX_o} \quad (4.8)$$

$$F = \frac{\mu_o X_o V_o}{Y_{X/S}(S_F - S_o)} \exp(\mu_o t) \quad (4.9)$$

$$V = V_o(1 + bX_o \exp(\mu_o t) - bX_o) \quad (4.10)$$

Nas eq.s (4.8), (4.9) e (4.10), b é uma constante representada pelos parâmetros obtidos da fase exponencial do cultivo em batelada simples inicial e pela concentração de substrato S_F na corrente de alimentação:

$$b = \frac{1}{Y_{X/S}(S_F - S_o)} \quad (4.11)$$

No entanto, deve observar-se que, na ausência de um controlador capaz de realizar a implementação da estratégia de alimentação exponencial, é possível utilizar uma bomba em um *set up* de vazão constante, que pode ser modelada conforme as equações abaixo:

$$\int_{V_o}^V dV = F \int_{t_o=0}^t dt \quad (4.12)$$

Onde, novamente, t_o é o tempo inicial de alimentação, após a condução da etapa de batelada simples. A partir de então, a modelagem da batelada estendida depende de 2 suposições, uma na qual o ambiente de cultivo proporcionado pela vazão $F(t)$ constante é capaz de suprir a necessidade metabólica das células ($S \gg K_s$) e, portanto, μ tenderá ao limite μ_{\max} , ou, a situação na qual a oferta de nutrientes é inferior a demanda metabólica celular ($S \ll K_s$) e, logo, μ será reduzido e necessariamente inferior a μ_{\max} .

Aplicando-se as definições previamente explicitadas e a equação (4.12) ao balanço de massa, a região do cultivo onde o crescimento é exponencial ($S \gg K_s$) pode ser modelada por:

$$V = V_o + Ft \quad (4.13)$$

$$X = \frac{X_o V_o \exp(\mu_{m\acute{a}x} t)}{V_o + Ft} \quad (4.14)$$

$$S = \frac{FS_F t + S_o V_o + \frac{X_o V_o}{Y_{X/S}} (1 - \exp(\mu_{m\acute{a}x} t))}{V_o + Ft} \quad (4.15)$$

Em contrapartida, a fase do cultivo onde o crescimento é limitado pelo substrato ($S \ll K_s$) pode ser representada pelas expressões:

$$\mu = \frac{FS_F Y_{X/S}}{FS_F Y_{X/S} t + Y_{X/S} S_o V_o + X_o V_o} \quad (4.16)$$

$$X = \frac{FS_F Y_{X/S} t + Y_{X/S} S_o V_o + X_o V_o}{V_o + Ft} \quad (4.17)$$

$$S = \frac{FS_F Y_{X/S} K_s}{FS_F Y_{X/S} (\mu_{m\acute{a}x} t - 1) + (Y_{X/S} S_o V_o + X_o V_o) \mu_{m\acute{a}x}} \quad (4.18)$$

em que, o tempo de transição entre as duas regiões de crescimento pode ser determinado no ponto onde o crescimento celular exponencial é igual ao crescimento limitado, igualando as equações (4.14) e (4.17), obtêm-se a equação (4.19), que pode ser resolvida numericamente para obtenção do tempo de transição τ_t :

$$X_o V_o \exp(\mu_{m\acute{a}x} \tau_t) = FS_F Y_{X/S} \tau_t + Y_{X/S} S_o V_o + X_o V_o \quad (4.19)$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Transfecção por lipofecção

Primeiramente, avaliou-se a transfecção de células parentais HEK293-3F6 por meio da lipofecção de plasmídeos contendo os genes responsáveis pela produção variante ômicron da proteína da espícula de SARS-CoV-2 e pela resistência ao antibiótico G418 sulfato em células parentais HEK293, com objetivo de selecionar células recombinantes estáveis capazes de produzir eficientemente esta proteína estrutural deste coronavírus.

A concentração e viabilidade celular foram acompanhadas ao longo do tempo pós-transfecção, em cultivos na presença de G418 sulfato utilizando-se frascos TubeSpin® de 50 mL e meio de cultivo comercialmente disponível HEK TF, com um volume de trabalho de 20% do volume útil do frasco (correspondente a 10 mL). Como controles, foram cultivadas, em paralelo, as células parentais HEK293-3F6 na ausência de G418 sulfato e o controle negativo (na presença de G418 sulfato), referido como *mock*, em que foi realizado o processo de transfecção, porém, sem adição do plasmídeo que contém os genes da proteína S e de resistência ao agente químico citotóxico citado. Os resultados são apresentados na Figura 16, que compreende um período de 28 dias de pressão seletiva por meio da presença de G418 sulfato para as células transfectadas e o controle negativo (*mock*), finalizando este processo 32 dias após a transfecção realizada (32 d.p.t.).

Observa-se que a viabilidade celular no dia inicial de experimento (4 d.p.t.), anteriormente ao início da adição de G418 sulfato, revela uma viabilidade levemente superior para os cultivos de células que não expressam os genes heterólogos, *mock* e parental, fato este que se justifica, pois, a expressão de transgenes pode ser um evento de estresse às células, culminando na queda de viabilidade observada nas células transfectadas com sucesso.

A partir do 3º dia após a adição do antibiótico (7 d.p.t.), a viabilidade do controle negativo *mock* decresceu rapidamente, se mantendo em cerca de 20-25% durante o restante do tempo de acompanhamento realizado. As células modificadas geneticamente demonstraram um início de recuperação no 17º dia após adição de G418 sulfato (21 d.p.t.), que se refletiu em uma maior proliferação celular e maiores concentrações de células viáveis alcançadas a partir do 24º dia pós adição de antibiótico.

Após 28 dias de condução do cultivo na presença de G418 sulfato (32 d.p.t.), as células transfectadas atingiram uma viabilidade celular de 87%. De acordo com dados reportados na literatura por Alvim *et al.* (2022b) para lipofecção de células HEK293-3F6 com o gene da proteína S de SARS-CoV-2 sob as mesmas condições, as células transfectadas alcançaram cerca de 90% de viabilidade entre 21 e 24 dias pós-transfecção. Paralelamente, Johari *et al.* (2020) observaram para células CHO também transfectadas para produção da proteína S trimérica de SARS-CoV-2 que a recuperação da viabilidade ocorreu após 19 dias (21 d.p.t.) de pressão seletiva de L-Metionina sulfoximina (MSX). Esta variação pode ser explicada, possivelmente, pela variabilidade inerente a este tipo de experimento, uma vez que o plasmídeo usado é de integração aleatória, resultando em individualidades entre cada processo de transfecção.

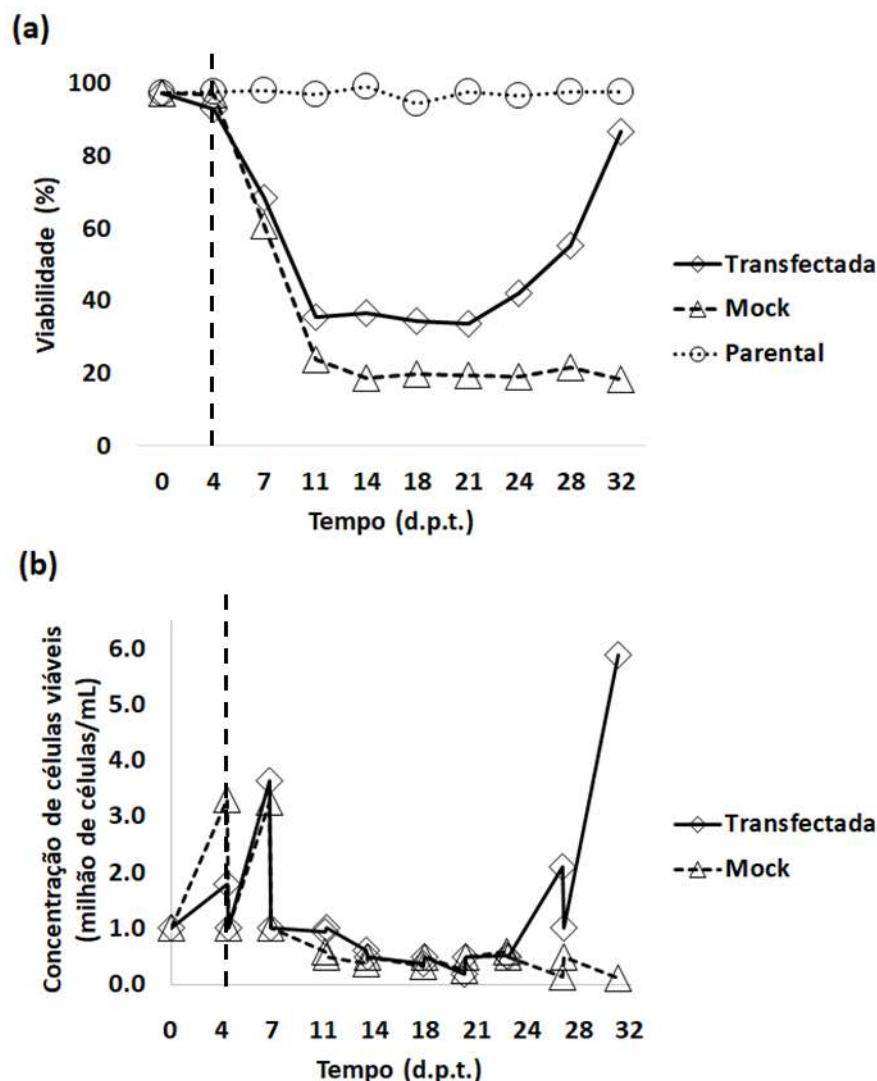


Figura 16: Viabilidade celular (a) e concentração de células viáveis (b) em função do tempo de cultivo para as células transfectadas e mock, na presença de G418 sulfato, e para células parentais não transfectadas, na ausência de G418 sulfato. Início da adição de G418 sulfato marcado pela linha tracejada vertical.

Adicionalmente, foram coletadas amostras de 500 μ L do sobrenadante de cultivo nos dias em que as células foram diluídas, anteriormente à diluição em meio HEK TF fresco, de forma a avaliar a presença da proteína da espícula de SARS-CoV-2 secretada no meio de cultivo ao longo dos dias pós transfecção. As amostras foram aplicadas a uma membrana de nitrocelulose, um anticorpo de detecção anti-proteína *spike* foi adicionado, sendo a presença da proteína S detectada por meio de um anticorpo secundário conjugado à peroxidase HRP e da reação de um substrato quimioluminescente. Portanto, ao revelar a membrana, o sinal de luminescência dos *spots* apresenta-se aproximadamente proporcional à concentração da proteína de interesse. Os resultados obtidos até o 28º dia (32 d.p.t.) de cultivo na presença de G418 sulfato podem ser visualizados na Figura 17. O resultado encontrado é compatível com a literatura para expressão estável de proteína da espícula inteira trimérica de SARS-CoV-2 em células HEK293-3F6, conforme demonstrado por Alvim *et al.* (2022b), em que a expressão transitente desta proteína perde a capacidade de emitir um sinal significativo durante o *immunoblot* a partir do 14º d.p.t., enquanto, para a expressão estável, verificam-se resultados positivos ao menos até o 100º d.p.t.

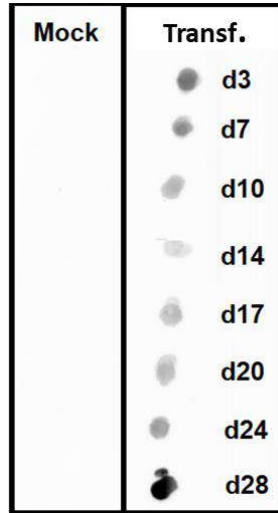


Figura 17: Immunoblot das frações coletadas do sobrenadante de cultivo durante o tempo (em dias) de aplicação de pressão seletiva por G418 sulfato nas células recém-transfectadas (à direita) e nas células que não receberam o plasmídeo (controle negativo, mock, à esquerda).

A seguir, foi realizada a avaliação desta linhagem transfectada gerada frente à sua capacidade de resistência ao agente citotóxico G418 sulfato ao longo do tempo (que infere-se que seja diretamente relacionada à integração estável dos genes transfectados), sendo realizado o acompanhamento do cultivo deste *pool* de células modificadas geneticamente durante 22 dias, na presença e na ausência do agente de seleção G418 sulfato. Obtiveram-se, então, os resultados demonstrados na Figura 18. É possível observar que o perfil da concentração de células viáveis e de viabilidade celular, em ambos os casos foi similar, o que permite inferir que o gene que confere resistência ao G418 sulfato manteve sua expressão estável ao longo do período avaliado. Houve uma ligeira variação negativa em relação ao cultivo na ausência do antibiótico, porém justificada devido ao estresse celular causado por este agente químico citotóxico.

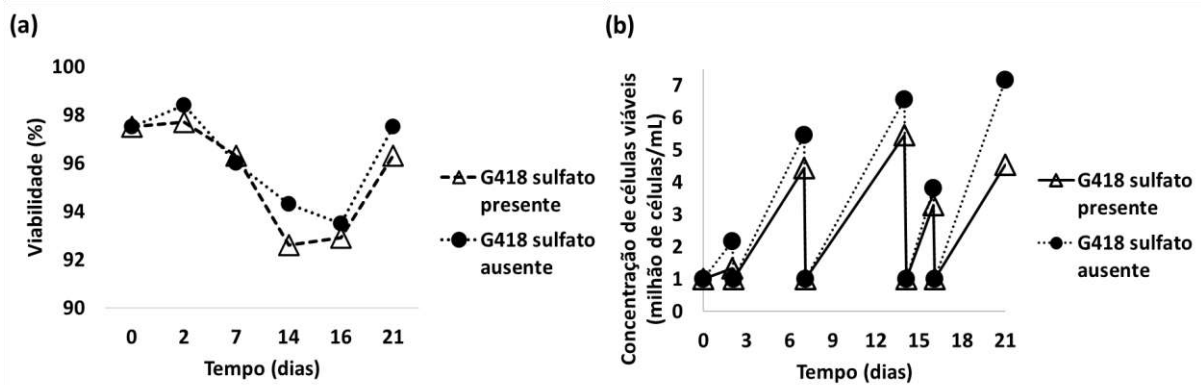


Figura 18: Viabilidade (a) e concentração de células viáveis (b) versus tempo de cultivo das células transfectadas para as condições de presença ou ausência de G418 sulfato.

A linhagem gerada foi então criopreservada em três criotubos contendo 1,0 mL de suspensão celular a uma concentração de 1×10^7 células viáveis por mL em meio HEK TF contendo 10% (v/v) de DMSO. Os criotubos foram armazenados em ultrafreezer a -80°C , sob a codificação “HEK-293-S-O RCB HEK TF + G418 1E7cells – 41 d.p.t. LAA – 14/ABR/22”.

5.2 Avaliação cinética do cultivo em batelada alimentada

A seguir, alinhado à estratégia do laboratório para o desenvolvimento de uma nova vacina de subunidade recombinante para variantes de COVID-19, foi utilizado, como ponto de partida para os estudos experimentais relacionados ao estudo da estratégia de alimentação para cultivos em batelada alimentada e para a modelagem de bioprocessos, linhagens de HEK293 recombinantes estáveis produtoras da proteína da espícula das variantes D614G, gama e delta, geradas previamente no Laboratório de Engenharia de Cultivos Celulares, estabelecidas por meio de metodologia análoga à utilizada no item anterior deste trabalho, porém seguido de isolamento de células únicas por FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorter*) e estabelecimento de linhagens clonalmente derivadas, também enominadas simplesmente como clones.

As linhagens recombinantes utilizadas foram clones isolados previamente no LECC/COPPE/UFRJ, fruto do trabalho de Federico Marsili e Renata Alvim, produtores de proteína *spike* das variantes delta (HEK293-617-B4), D614G (HEK293-D14G-F9) e gama (HEK293-P1-C9), além de um *pool* de células produtoras da proteína S da variante ômicron BA.2 (HEK293-S-BA2pcDNA), para o qual ainda não se havia isolado clones na época deste estudo. É importante ressaltar que a utilização de linhagens clonalmente derivadas é recomendada para geração de material a ser utilizado futuramente em estudos clínicos por algumas agências regulatórias, incluindo a ANVISA, o que acarreta uma demanda adicional de tempo de aproximadamente 5 meses para obtenção destes clones e justifica, então, a utilização destes clones previamente isolados no presente trabalho.

Foram então realizados estudos cinéticos em batelada alimentada (*fed-batch*) para estas linhagens celulares, de forma a obter parâmetros cinéticos de processo para a modelagem matemática e também para a avaliação da produção de proteína S secretada no sobrenadante do cultivo celular. Os resultados podem ser vistos na Figura 19.

Através dos resultados obtidos (Figura 19) analíticas, nota-se que todos os cultivos mantiveram viabilidade superior a 96% até o sexto dia de cultivo, o que é compatível com o encontrado na literatura para outras linhagens de células HEK293 produtoras de proteína S recombinante (GREEN; HAMAKER; LEE, 2023). Observa-se que o cultivo do *pool* de células referente à variante ômicron (BA.2) foi o que obteve máxima densidade de células viáveis (VCD de $19,13 \times 10^6$ células/mL) e também o que se manteve com a VCD elevada por mais tempo ($18,55 \times 10^6$ células/mL no dia 11), enquanto o clone expressando a variante D614G foi o que apresentou menor crescimento celular, atingindo VCD máxima de $11,47 \times 10^6$ células/mL no 8º dia de cultivo.

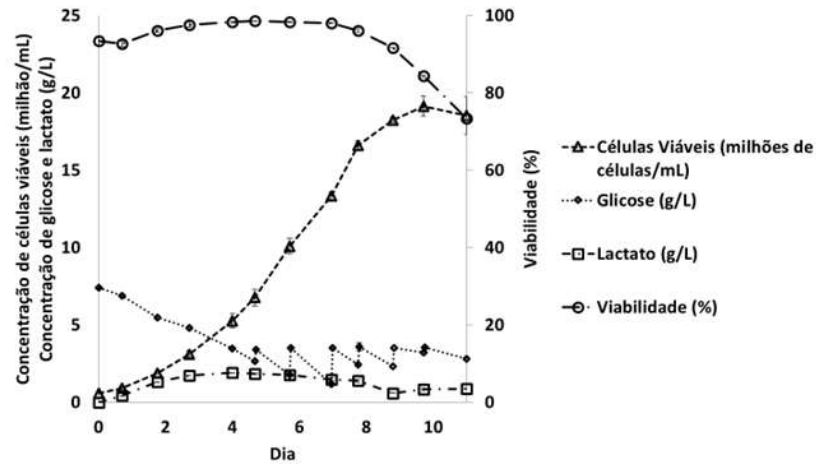
O perfil de viabilidade foi similar para as células produtoras de proteína *spike* para as 4 variantes. Já o perfil de células viáveis foi semelhante entre os cultivos do clone da variante gama (HEK293-P1-C9) e do *pool* de células produtor da variante ômicron ((HEK293-S-BA2pcDNA). Os clones produtores de proteína S alcançaram menores concentrações de células viáveis, o que poderia estar relacionado a questões metabólicas de cada clone, ou à expressão da proteína recombinante. A viabilidade observada para a VCD dos cultivos, principalmente em relação aos cultivos dos clones HEK293-617-B4 e HEK293-D614G-F9, pode ser explicada parcialmente pela propriedade de diferentes variantes da proteína da espícula de SARS-CoV-2 serem intrinsecamente mais fáceis ou difíceis de expressar. Joubert *et al.* (2023) observaram que a expressão de proteína S de algumas variantes ocasiona em uma queda de viabilidade mais pronunciada que o usual.

Quanto ao comportamento dos níveis de glicose e lactato no meio extracelular, observou-

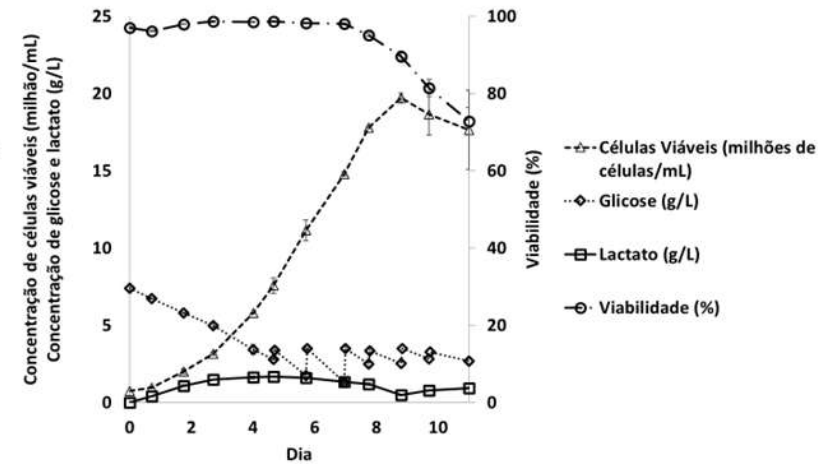
se que a formação de lactato é dominante durante a primeira fase de crescimento exponencial, período em que há, principalmente, consumo de glicose e elevada formação de lactato, o que vai de encontro ao reportado na literatura (MARTÍNEZ-MONGE *et al.*, 2018; TORRES; ALTAMIRANO; DICKSON, 2018). Este fato levou ao acúmulo deste subproduto até, em média, cerca do 5º dia de cultivo (atingindo concentrações de cerca de 1,93 a 2,00 g/L), momento após o qual observou-se consumo concomitante de glicose e lactato metabólico. Este *shift* para o consumo de lactato, contudo, parece ter sido atrasado para o clone B4/delta e inexistente para o clone F9/D614G.

Verificou-se também que as células atingiram a fase estacionária de crescimento por volta do 7º dia de cultivo, permanecendo com viabilidades entre 90 e 95% entre os dias 7 e 9 de processo, em média. Como consequência do consumo de lactato paralelo ao de glicose, a concentração deste subproduto inibitório no meio foi então reduzida ao longo do tempo, durante esta fase, até o 9º dia de cultivo (0,48-0,92 g/L de lactato). Neste momento, provavelmente devido ao declínio celular, a formação de lactato voltou a ser novamente dominante havendo seu acúmulo líquido no meio extracelular. Os fatos observados estão de acordo com os *shifts* metabólicos experimentados por células HEK293 durante bioprocessos de batelada, conforme observado por Yahia *et al.* (2016), Martínez-Monge *et al.* (2018) e Liste-Calleja *et al.* (2015) e discutido previamente no item 2.3.3.3 da revisão bibliográfica.

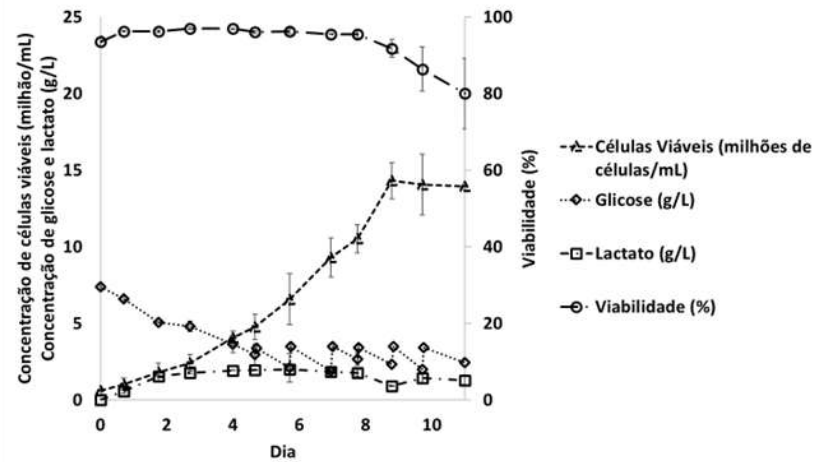
(a) Pool: Ômicron



(b) Gama: Clone C9



(c) Delta: Clone B4



(d) D614G: Clone F9

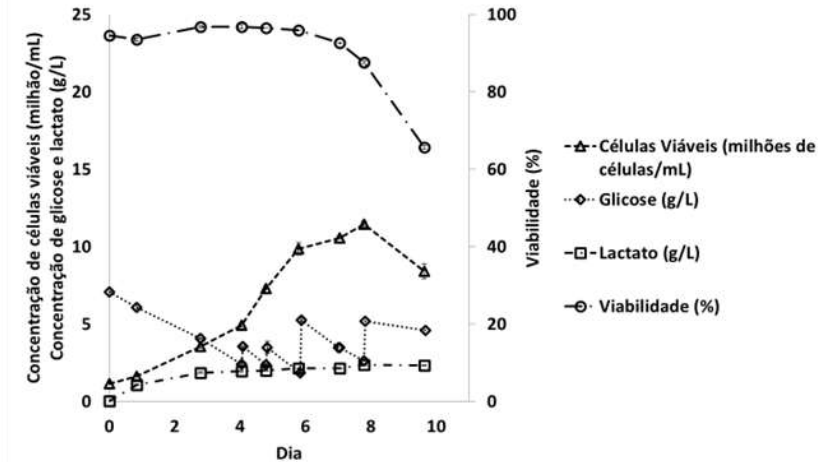


Figura 19: Concentração de células viáveis, glicose e lactato e viabilidade celular versus tempo de batelada alimentada para as 4 linhagens celulares avaliadas: (a) pool de células-ômicon BA.2 (HEK293-S-BA2pcDNA3.1), (b) gama-clone C9 (HEK293-UFRJvac-P1-C9), (c) delta-clone B4 (HEK293-UFRJvac-617-B4) e (d) D614G-clone F9 (HEK293-F9). As barras de erro representam o desvio padrão de duplicatas experimentais).

De maneira interessante, foi possível observar também que o cultivo de pior desempenho em termos de viabilidade e VCD (clone F9/D614G) foi o único que não apresentou consumo de lactato relevante, tendo sua concentração mantida em cerca de 2,00 g/L entre os dias 4 e 10 de cultivo. Logo, este clone foi o que demonstrou menor habilidade de detoxificação de lactato. Isto pode explicar ao menos parcialmente a inibição no crescimento e queda de viabilidade mais acentuada apresentada por este clone, uma vez que o lactato é um composto conhecidamente inibitório para cultivos de células de mamíferos e, em especial, células HEK293 (LISTE-CALLEJA *et al.*, 2015).

A produção de proteína da espícula recombinante secretada no meio extracelular durante a batelada alimentada foi avaliada de forma preliminar/qualitativa para os clones HEK293-617-B4 (B4/delta) e HEK293-D614G-F9 (F9/D614G), por meio do *spot blot* mostrado na Figura 20. Observa-se que a intensidade do sinal das amostras aumenta ao longo dos dias de cultivo, como esperado.

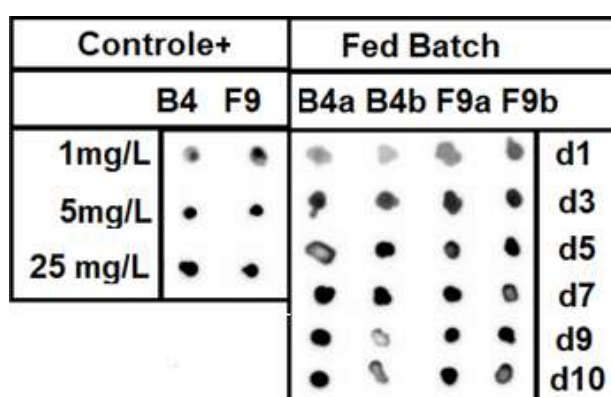


Figura 20: Imunoblot em duplicata para estimativa da concentração de proteína S. Amostras recolhidas a partir do sobrenadante de cultivo em batelada para os clones B4/delta (HEK293-617-B4) e F9/D614G (HEK293-D614G-F9), durante o total de 10 dias de cultivo. Controle positivo de concentração conhecida à esquerda e experimentos em duplicata para cada clone à direita.

De acordo com a literatura (Tabela 10), resultados entre 50 e 150 mg/L têm sido reportados para linhagens recombinantes produtoras da proteína espícula inteira ou apenas de seu domínio RBD em processos de batelada alimentada em frascos agitados, utilizando-se de expressão estável. Não obstante, títulos de até 500-700 mg/L chegaram a ser reportados como fruto de estratégias otimizadas de transfecção, de isolamento/*screening* de clones e/ou de cultivo celular. Estes resultados reportados na literatura são sumarizados na Tabela 10. Conforme anteriormente discutido, a concentração de proteína da espícula obtida é altamente dependente da variante expressa pelo clone (JOUBERT *et al.*, 2023) e também pela linhagem celular produtora gerada, pois o número de cópias do gene codificante da proteína integradas de forma estável no genoma celular, em geral, é variável de um clone para o outro (GREEN; HAMAKER; LEE, 2023).

Quanto aos dados presentes na literatura reportados na Tabela 10, é pertinente observar que os resultados de produção de maiores concentrações da proteína S recombinante de SARS-CoV-2 são aqueles em que houve mudança da condução do cultivo da temperatura de 37°C para de 32°C, condição de leve hipotermia, de tal forma que se permitiu um cultivo prolongado com elevadas viabilidades mais duradouras e com maior expressão de proteína (GREEN; HAMAKER; LEE, 2023; JOUBERT *et al.*, 2023; MAYRHOFER; HUNJADI; KUNERT, 2021). Mayrhofer, Hunjadi e Kunert (2021) reportam, ainda, que o tratamento hipotérmico induziu níveis excepcionalmente elevados de expressão recombinante, de cerca de 10 vezes o nível resultante da condução do processo a 37°C, de

forma que é uma possibilidade interessante para futuros estudos avaliar o desempenho dos clones apresentados frente a estas condições.

Tabela 10: Comparação entre concentração de proteína spike ou domínio RBD recombinante de SARS-CoV-2 recuperada do sobrenadante de cultivo celular e suas linhagens parentais, processo utilizado e tempo de cultivo, respectivamente.

Linhagem parental	Proteína expressa	Processo utilizado	Tempo de cultivo	Título de produção	Referência
GS-CHO	Proteína da espícula trimérica (Wuhan)	Batelada simples em frascos agitados	4 dias	53 mg/L (após purificação)	JOHARI <i>et al.</i> , 2020
Expi293F™	Domínio RBD (Wuhan)	Batelada simples em frascos agitados	5 dias	90 mg/L	CASTRO <i>et al.</i> , 2021
HEK293	Domínio RBD (RBD resíduos 319-599)	<i>Fed-batch</i> em frascos agitados	20-24 dias	100-140 mg/L	GREEN; HAMAKER; LEE, 2023
CHO	Proteína espícula trimérica (Wuhan)	Perfusão	18 dias	Até 500 mg/L	MAYRHOFER; HUNJADI; KUNERT, 2021
CHO	Proteína da espícula trimérica inteira (variantes alfa e ômicron BA.1)	<i>Fed-batch</i> em frascos agitados	13 dias	~200mg/L	JOUBERT <i>et al.</i> , 2023
CHO	Proteína de fusão spike-scFv (variante delta)	<i>Fed-batch</i> em frascos agitados	13 dias	~700mg/L	JOUBERT <i>et al.</i> , 2023

Fonte: Elaboração própria.

Adicionalmente, Joubert *et al.* (2023) ponderam que a diferença entre os níveis de expressão de variantes da proteína espícula se deve principalmente a diferentes capacidades de expressão recombinante destas proteínas pelo organismo hospedeiro, não necessariamente tendo forte relação com os eventos probabilísticos relacionados à variabilidade entre os experimentos de transfecção e seleção de clones, como a eficiência de integração dos plasmídeos contendo os genes codificantes das variantes da proteína S, por exemplo. Desta maneira, o grupo gerou através de integração aleatória de genes diferentes pools de expressão estável para as variantes de proteína da espícula, com transfecções e seleções independentes, onde é possível verificar a variabilidade dos títulos de produção recombinante entre as variantes apresentadas, de forma que se mostra pouca

dependência do processo de transfecção e seleção realizados.

5.3 Avaliação das estratégias de alimentação em batelada alimentada

Em sequência, foram avaliadas quatro diferentes estratégias de alimentação para o modo de *fed-batch*: (A) adição de nutrientes baseada em dados prévios para as taxas específicas de crescimento e de consumo de glicose, para prever a demanda futura de substrato, considerando-se a taxa de consumo de substrato (q_s) e taxa específica de crescimento celular (μ) constantes durante todo o cultivo; (B) ajuste para 3,5 g/L a partir do dia 4 de cultivo (condição recomendada previamente determinada empiricamente no laboratório); (C) ajuste da concentração de substrato pós-alimentação para 2,5 g/L a partir do dia 5; e (D) ajuste para 3,5 g/L a partir do dia 5 de cultivo. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 21 e Figura 22.

Observa-se que o comportamento apresentado para as diferentes estratégias de alimentação foi bastante similar, exceto para a estratégia (A), em que se considerou q_s e μ constantes a todo instante, onde ocorreu acúmulo excessivo de glicose no meio, o que provavelmente resultou em efeitos inibitórios. É relevante observar que, frente a elevadas concentrações de glicose disponível em culturas de células, este carboidrato passa a ser consumido em taxas muito exacerbadas, sendo majoritariamente convertido a lactato, com a oxidação incompleta da fonte de carbono, ainda que existam condições aeróbicas suficientes para tal. Este desequilíbrio metabólico leva a uma baixa eficiência energética, gerando uma menor quantidade de ATP por mol de glicose, além da possibilidade de haver acúmulo de metabólitos inibitórios. Adicionalmente, ressalta-se que a amônia se acumula no meio de cultivo em decorrência da rápida metabolização da glutamina, e este efeito é acentuado quando a eficiência energética da metabolização da glicose é baixa (CASTILHO, informação pessoal).

No entanto, verifica-se que, para os cultivos nos quais a proposta foi limitar o início da alimentação apenas após o 5º dia de cultivo, houve um decréscimo mais rápido da viabilidade durante os dias finais de processo (Figura 22). Além disso, observa-se que o perfil da concentração de células viáveis, e também o seu valor máximo, demonstra ter uma possível dependência do dia inicial de alimentação, conforme verificado no perfil comportamental destas variáveis de cultivo (Figura 21 e Figura 22). Uma hipótese para tal, seria a possibilidade de a glicose no meio de cultivo não estar sendo consumida de forma balanceada em relação a outros nutrientes para a linhagem recombinante gerada, de maneira que mesmo havendo glicose disponível no meio, poderia estar ocorrendo exaustão de algum outro nutriente limitante.

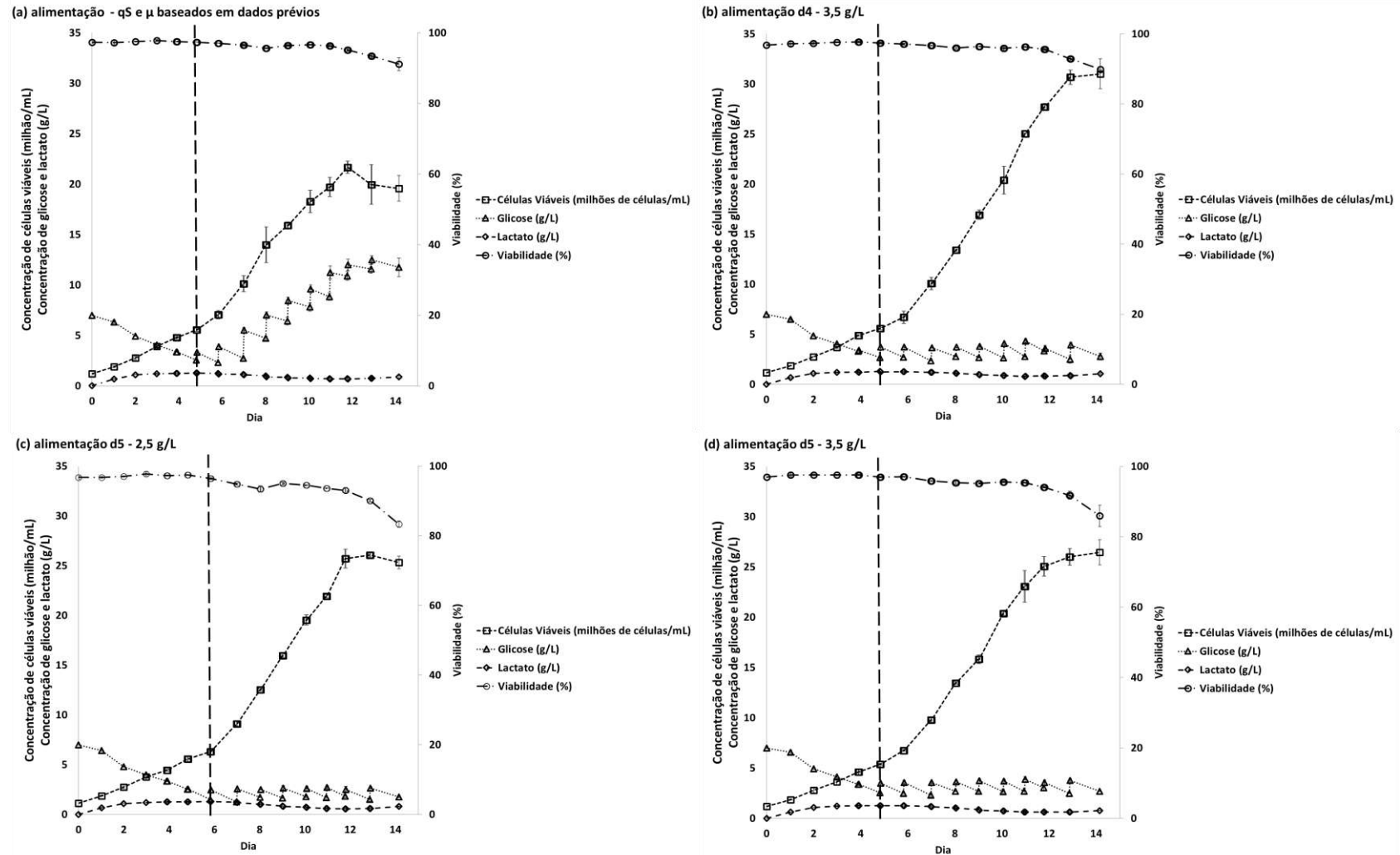


Figura 21: Diferentes estratégias de alimentação para cultivos de células HEK293 recombinantes produtoras da variante ômicron da proteína espícula de SARS-CoV-2. (a): considerando-se q_s e μ constantes durante o cultivo; (b): ajuste para 3,5 g/L de substrato a partir do dia 4 de cultivo; (c): ajuste para 2,5 g/L de substrato a partir do dia 6 de cultivo; (d) ajuste para 3,5 g/L de substrato a partir do dia 5 de cultivo. As barras de erro representam o desvio padrão de duplicatas experimentais. A linha tracejada vertical indica o início da alimentação.

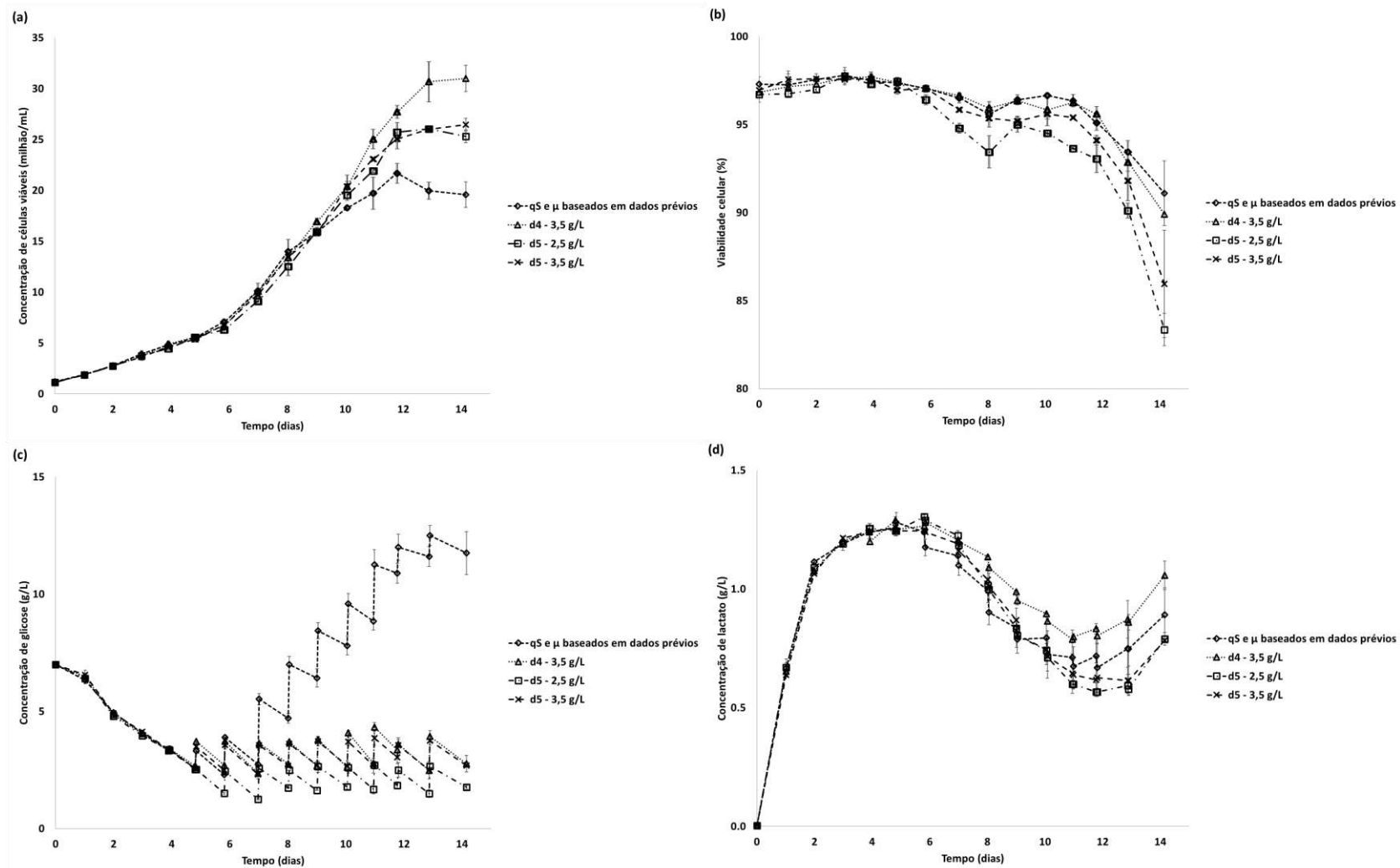


Figura 22: Comparação de comportamento entre as diferentes estratégias de alimentação para cultivos de células HEK293 recombinantes produtoras da variante ômicron da proteína espícula de SARS-CoV-2. Variáveis avaliadas: (a) concentração de células viáveis (milhão/mL); (b) viabilidade celular (%); (c) glicose (g/L); (d) lactato (g/L). Estratégias: losango: considerando-se q_s e μ constantes durante o cultivo; triângulo: ajuste para 3,5 g/L de substrato a partir do dia 4 de cultivo; quadrado: ajuste para 2,5 g/L de substrato a partir do dia 5 de cultivo; cruz: ajuste para 3,5 g/L de substrato a partir do dia 5. As barras de erro representam o desvio padrão de duplicatas experimentais.

Outro ponto relevante observado foi que a concentração de glicose no 5º dia de cultivo para a condição (c) da Figura 21 ainda era superior ao valor de ajuste proposto de 2,5 g/L (registrou-se o valor médio de 2,53 g/L para o cultivo), desta forma este cultivo recebeu seu primeiro *feed* apenas no 6º dia, sendo que este também registrou a maior queda de viabilidade no 14º dia de cultivo (83,4%). Desta maneira, para futuros estudos, uma proposta de avaliação desta hipótese seria a alimentação do cultivo inicialmente entre dias 4-6 com um *feed* contendo apenas glicose, testando-se o ajuste para 3,5 e 2,5 g/L, de maneira a avaliar se a presença de outros nutrientes na alimentação teria impacto significativo. Além disso, ressalta-se que os perfis de concentração de glicose e lactato verificados se mostraram de acordo com o reportado na literatura, com o formato característico de “til” para a curva de acúmulo e consumo de lactato no meio extracelular, similar ao encontrado por Konakovsky *et al.* (2016) para células de mamíferos. Uma possibilidade é de que o lactato volte a se acumular no meio extracelular no final dos cultivos quando há a adição de *feed* concentrado em substrato mesmo com as células em fase de declínio, o que resulta em um excesso de glicose e conversão deste carboidrato a lactato.

Adicionalmente, foi possível observar, durante estes experimentos avaliados, uma significativa influência da relação entre o volume de trabalho utilizado e o volume útil total nas variáveis de cultivo acompanhadas. Comparando-se os dados apresentados na Figura 21 (com cerca de 5% do volume útil de um frasco Erlenmeyer de 250 mL) com o cultivo inicial do pool de células que expressam a variante ômicron da proteína S da Figura 19 (com 15% a 20% de volume de trabalho do mesmo tipo de frasco), é possível verificar que os cultivos com menor volume de meio puderam ser estendidos por um maior período de tempo, apresentando sua VCD, em média, de 35 a 40% maior que o anterior. É importante ressaltar também que, apesar de as condições operacionais (que acarretam em diferenças na transferência de oxigênio) provavelmente serem as causas mais significativas por trás da variação observada, esta também pode ter sua origem parcialmente no preparo do inóculo utilizado para os experimentos, uma vez que o crescimento celular foi menos acelerado, quando comparado com os resultados obtidos por Renata G. F. Alvim para a mesma linhagem. Não obstante, é crucial garantir que não existam limitações na disponibilidade de oxigênio durante experimentos de seleção e triagem, uma vez que estas condições não ideais de cultivo podem gerar resultados inconsistentes, sendo este um desafio presente no cultivo de células animais a elevadas concentrações celulares (HUANG *et al.*, 2010).

Acredita-se, portanto, que durante os dias finais de cultivo em frascos agitados, a transferência de oxigênio tenha se tornado um dos fatores limitantes da manutenção prolongada do cultivo deste *pool* de clones, frente a às elevadas VCDs atingidas por esta linhagem, como observado nas Figura 19 e 21. Esta relação entre o desempenho do cultivo e o volume utilizado é de fato encontrada na literatura, que reporta que mudanças nas condições de cultivo como volume do frasco, volume útil aplicado e velocidade e órbita de agitação podem afetar o metabolismo celular, a produtividade, o crescimento e a viabilidade do cultivo, quando associados à transferências de oxigênio ineficientes (PÉREZ-RODRIGUEZ *et al.*, 2022). Infere-se, também, que estes fatores podem ser intensificados quando considerados no contexto do cultivo de células com tendência de formação de agregados, como é o caso de células HEK293.

Pérez-Rodríguez *et al.* (2022) demonstram que, em cultivos de células CHO em frascos agitados do tipo *Erlenmeyer* de 250 mL sem chicanas, empregando-se as mesmas

condições de velocidade de agitação e diâmetro de órbita, o K_{La} ⁵⁴ pode sofrer uma variação de cerca de 11 h^{-1} – quando se utiliza um volume de trabalho de 20% (correspondente a 50 mL), para cerca de 24 h^{-1} , quando aplicado um volume de trabalho de 25 mL (correspondente a 10% do volume total), o que se traduz em um aumento de cerca de 116% no valor de K_{La} quando se reduz à metade do volume de trabalho. Desta maneira, o grupo conclui que, quanto maior o volume de trabalho em frascos *Erlenmeyers* agitados, maiores as chances de ocorrerem limitações de oxigênio, principalmente quando elevadas VCDs são atingidas. Contudo, um ajuste cuidadoso das condições operacionais é requerido, visto que condições excessivas de tensão de cisalhamento decorrentes de agitação ou níveis excessivos de O_2 dissolvido também podem ser deletérios às células (PÉREZ-RODRIGUEZ *et al.*, 2022). Ademais, é importante ressaltar que Pérez-Rodríguez *et al.* (2022) denotam que, apesar da significativa variação no valor do K_{La} , não foi observado efeito significativo na produção de anticorpo monoclonal recombinante pelas células CHO.

Por conseguinte, é recomendado para futuros estudos em frascos agitados utilizando a linhagem recombinante supracitada, a avaliação de diferentes razões entre volume útil e volume total do frasco, de forma a encontrar a opção ótima para realização do cultivo visando à máxima produção de proteína da espícula recombinante de SARS-CoV-2. De maneira semelhante, também é válida a avaliação destes cultivos em diferentes velocidades de agitação, devido ao seu impacto direto no K_{La} , conforme anteriormente discutido. Ainda, é importante ressaltar que o perfil de glicosilação de proteínas expressas de forma recombinante é dependente do nível de oxigênio dissolvido na cultura (RESTELLI *et al.*, 2006), de maneira que também é uma proposta cabível de investigação o acompanhamento do padrão de glicosilação da proteína S frente a diferentes volumes de trabalho utilizados e velocidades de agitação. Alternativamente, estudos nesta direção poderiam ser carreados em biorreatores dotados de sistema de monitoramento e controle de agitação e oxigênio dissolvido.

Além disso, observa-se que a estratégia baseada nos valores das taxas de consumo de substrato (q_s) e específica de crescimento celular (μ) constantes durante todo o cultivo não se mostrou adequada, uma vez que o metabolismo celular sofre alterações ao longo do cultivo, e o consumo de glicose em um dado intervalo de tempo pode, portanto, não ser idêntico no intervalo de tempo subsequente, o mesmo ocorrendo para o crescimento celular. Nos experimentos realizados, para todos os cultivos, foi observado que o valor de q_{glc} se manteve aproximadamente 0,50 g de glicose por milhão de célula nas primeiras 48h de cultivo, após as quais houve uma queda deste para cerca de 50%, entre 0,21-0,25 para o terceiro dia. Posteriormente, entre os dias 4 e 7 de cultivo, a taxa de consumo de glicose se manteve aproximadamente constante no valor de 0,11 a 0,15 g de glicose por milhão de célula, onde houve concorrente consumo de lactato.

Quanto à taxa específica de crescimento (μ), esta manteve-se aproximadamente constante nas primeiras 48 horas de cultivo (entre cerca de 0,32 e 0,39 d^{-1}), apresentando uma queda gradativa até cerca do 5º dia de cultivo, a partir do qual, um novo crescimento celular reduzido foi observado, com μ aproximadamente constante e com valores entre 0,27 e 0,30 d^{-1} entre os dias 7 e 8 de cultivo (aproximadamente 75% da taxa inicial de crescimento). Verifica-se, portanto, que os resultados se apresentam em concordância com as diferentes fases metabólicas de crescimento e consumo de glicose/lactato descritas no item 2.3.3.3 da revisão bibliográfica realizada. Adicionalmente, deve se levar em conta também o erro

⁵⁴ K_{La} : coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio, medido em h^{-1} .

intrínseco ao cálculo destas taxas a cada intervalo de 24 horas, uma vez que pequenas alterações na amostragem ou contagem de células pode resultar em flutuações significativas de μ e q_s .

Em relação à estimativa da produtividade da variante ômicron (BA.2) da proteína da espícula recombinante de SARS-CoV-2 nos cultivos realizados, foi possível verificar, através da densitometria de *pixels* realizada a partir da imagem do *immunoblot* mostrado na Figura 23, que a estratégia que rendeu maior concentração de proteína foi a correspondente ao ajuste para 3,5 g/L de glicose a partir do dia 4, previamente empregada no laboratório. A segunda estratégia de maior rendimento foi a de ajuste de glicose para 2,5 g/L a partir do 5º dia, mas que, porém, apenas teve seu primeiro *feed* possível no dia 6, conforme previamente explicitado, obtendo-se uma concentração de proteína *spike* de cerca de 54% da obtida pela estratégia de maior produção.

A estratégia menos adequada foi a que considerou q_s e μ baseados em dados prévios de crescimento e consumo de glicose (produzindo cerca de 38% do valor obtido para a melhor estratégia), provavelmente, devido ao acúmulo de glicose no meio extracelular, o que pode acarretar no acúmulo de metabólitos inibitórios, menor crescimento celular e consumo menos eficiente de substrato. Por último, a estratégia de alimentação de ajuste da glicose para 3,5 g/L a partir do dia 5 forneceu uma concentração de ~53% do máximo obtido, para fins práticos e frente ao erro experimental inerente ao método, o mesmo título da estratégia de 2,5 g/L (~54%) e compatível com o comportamento do cultivo, que também foi muito similar (conforme figuras 21 e 22). Este resultado reforça a correlação entre a VCD e a produção de proteína, visto que a estratégia de alimentação que permitiu alcançar a maior concentração de células viáveis foi também a que forneceu a maior produção de proteína da espícula de SARS-CoV-2, enquanto que as duas estratégias que apresentaram VCDs similares, forneceram também concentrações de proteína muito semelhantes. Já a estratégia com menor VCD foi a que apresentou também menor produção de proteína S. Vale ressaltar que a detecção por *spot blot* possui um erro associado significativo, devido à saturação da membrana, de maneira que os valores obtidos através desta análise são úteis para uma comparação entre a magnitude dos resultados e não para uma quantificação precisa.

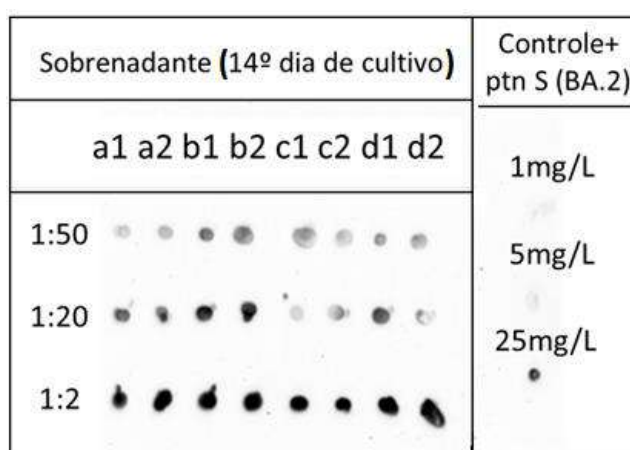


Figura 23: Immunoblot das frações coletadas do sobrenadante no 14º dia de cultivo. Duplicatas da esquerda para a direita: a – q_s e μ considerados constantes durante todo o cultivo; b – ajuste para 3,5 g/L de substrato no 4º dia de cultivo; c – ajuste para 2,5 g/L de substrato no 5º dia de cultivo; d – ajuste para 3,5 g/L de substrato no 5º dia de cultivo.

Portanto, frente às concentrações de proteína *spike* observadas na literatura (Tabela 10), o resultado encontrado indica que as concentrações obtidas nos cultivos deste trabalho estão na mesma faixa de outros trabalhos, publicados em revistas internacionais. Para outras proteínas recombinantes, em especial anticorpos monoclonais, contudo, são reportadas concentrações mais altas, na faixa de 1 a 10 g/L, geralmente. Segundo Langer e Rader (2015), naquele momento, para o desenvolvimento de novos bioprocessos a serem implementados industrialmente, uma concentração de produto ≥ 3 g/L seria almejada. Contudo, os níveis de expressão podem variar significativamente em função de proteína expressa, como anteriormente discutido neste trabalho.

5.4 Emprego de modelagem fenomenológica de bioprocessos para avaliar os dados experimentais

Nesta etapa do presente trabalho, avaliou-se a modelagem matemática fenomenológica macroscópica exposta no Capítulo 4: Modelagem de Bioprocessos, frente aos resultados experimentais obtidos para o *pool* de células HEK293 produtoras da variante ômicron da proteína da espícula de SARS-CoV-2.

É pertinente destacar que os dados experimentais utilizados para a determinação do valor numérico das constantes expostas neste capítulo foram os gerados por Renata G. F. Alvim, pois é extremamente relevante que os parâmetros utilizados em modelos matemáticos envolvendo células animais sejam obtidos a partir de dados de cultivo celular obtidos por profissionais experientes no cultivo destas células, devido à possíveis variações que podem surgir intrinsecamente no preparo e no decorrer destes cultivos celulares. Além disso, destaca-se que fatores anteriores ao experimento realizado podem afetar negativamente a variabilidade dos resultados, como a influência do preparo do inóculo prévio à expansão celular para utilização no experimento, por exemplo, que tem consequências no metabolismo dos cultivos posteriormente realizados (SARTORI *et al.*, 2018).

É importante ressaltar também que, apesar da relevância comercial de um entendimento profundo sobre o metabolismo e cinética de crescimento de células animais (em especial de mamíferos) para otimização da produção e desenvolvimento de produtos biológicos, existem dados escassos reportados na literatura para os parâmetros cinéticos e de produtividade destas células. A busca por tais parâmetros cinéticos para linhagens HEK293 se mostra, portanto, uma tarefa árdua, uma vez que os dados disponíveis são escassos e, quando existentes, são, majoritariamente referentes a células de hibridoma (YAHIA; MALPHETTES; HEINZLE, 2015) e CHO (LÓPEZ-MEZA *et al.*, 2015), frequentemente apresentando elevada variabilidade intrínseca.

O fato exposto se dá, muito provavelmente, devido ao elevado valor agregado destes produtos biofarmacêuticos, de maneira que não se havia incentivo o suficiente para o desenvolvimento de um entendimento completo de processo para estes biológicos. Portanto, o foco da indústria, até então, vinha se apresentado no desenvolvimento de linhagens celulares recombinantes de altos títulos de produção, otimização do meio de cultivo e escalonamento de processos da escala de bancada para biorreatores (LÓPEZ-MEZA *et al.*, 2015). Todavia, no ano de 2004, a agência regulatória americana, FDA, instituiu o uso da metodologia *Quality by Design* (QbD), auxiliando desta maneira na modificação da mentalidade da indústria em direção a uma abordagem mais científica para o desenvolvimento de biofármacos (CRAVEN *et al.*, 2013).

Logo, com a finalidade de desenvolver maior entendimento sobre o processo de produção de um produto biológico, torna-se necessário identificar quais os parâmetros de efeito

significativo na viabilidade celular e título de produção de proteínas recombinantes, além da exploração de como estes afetam o fenótipo celular e qualidade do produto final, principalmente em relação aos padrões de glicosilação proteica (YAHIA; MALPHETTES; HEINZLE, 2021). Por conseguinte, o QbD exige uma compreensão completa dos parâmetros críticos de processos (CPPs) que afetam os atributos críticos de qualidade (CQAs) destes biológicos (CRAVEN *et al.*, 2013), de forma que o processo seja operado de maneira inteligente, consistente e garanta a qualidade e segurança da entrega do produto acabado ao paciente.

Inicialmente, quanto aos parâmetros cinéticos de Monod correspondentes a cada cultivo a ser individualmente avaliado através do modelo proposto, é possível calcular, através da eq. (4.2), a taxa específica de crescimento celular (μ) a partir do coeficiente de regressão linear obtido através do gráfico gerado ao plotar-se o logaritmo natural da concentração de células viáveis do cultivo (X_V) *versus* o tempo. Este parâmetro, portanto, foi obtido empiricamente, conforme a metodologia descrita por Sartori *et al.* (2018) para células BHK-21 utilizadas em processos de batelada. Sartori *et al.* (2018) demonstram também que é aplicável obter-se empiricamente o fator de rendimento de conversão de substrato em células, por meio da eq. (4.3), como o coeficiente angular resultante de dados de concentração de células viáveis em função da concentração do substrato limitante no meio de cultivo.

De maneira semelhante, o parâmetro $\mu_{\text{máx}}$ observado ($\mu_{\text{máx,obs}}$), correspondente a máxima taxa específica de crescimento celular observada experimentalmente durante o cultivo da linhagem de células HEK293 recombinantes estudada, foi obtido através do valor máximo observado do coeficiente de regressão linear, obtido na fase exponencial do cultivo em batelada. Este artifício foi aplicado devido à escassez de dados experimentais de batelada alimentada a diferentes concentrações iniciais de substrato, uma vez que, idealmente, o valor de $\mu_{\text{máx}}$ pode ser obtido através dos dados de diferentes bateladas simples com valores crescentes de substrato e, por conseguinte, valores crescentes de μ . Esta aproximação adiciona uma limitação à previsão do modelo, pois o valor de μ experimental não é capaz de atingir o valor teórico de $\mu_{\text{máx}}$ de Monod.

A seguir, assumindo-se a aplicabilidade da Equação de Monod, é possível obter-se, para glicose e lactato, as constantes de saturação pelo substrato e inibição pelo produto, K_{glc} e K_{lac} , respectivamente, ajustando-se numericamente estes parâmetros através do método da soma dos mínimos quadrados residuais não linear, por meio do software Microsoft Excel[®] 2019, de maneira que seja resolvido o sistema composto da eq. (4.5) e da eq (5.3) a seguir. Desta forma, o método busca encontrar as constantes que melhor explicam os dados encontrados experimentalmente, obtendo-se os menores resíduos após convergência da solução, vide eq. (5.1), e o maior valor do coeficiente de determinação R^2 , conforme eq. (5.3). Neste método, respectivamente, SSR representa a variação total da previsão do modelo para os dados experimentais, ou seja, a soma dos quadrados residuais, obtida pelo somatório do quadrado das diferenças entre o valor previsto pelo modelo (\hat{y}_i) e o valor experimental (y_i), enquanto SST representa a variação total dos valores experimentais em relação à sua média, ou seja, a soma dos quadrados totais, que consiste no somatório do quadrado da diferença entre o valor experimental observado (y_i) e o valor médio de todos os valores observados experimentalmente (\bar{y}_i).

$$SSR = \sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y_i)^2 \quad (5.1)$$

$$SST = \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2 \quad (5.2)$$

$$R^2 = 1 - \frac{SSR}{SST} \quad (5.3)$$

Posto isto, foram utilizados como estimativas de valor inicial, de forma a auxiliar na convergência do problema a ser resolvido numericamente, os parâmetros K_{glc} e K_{lac} disponíveis na literatura para células BHK-21 (SARTORI *et al.*, 2018) e CHO (CRAVEN *et al.*, 2013) e, como limites inferior e superior de cada constante da solução desejada, as faixas destas constantes disponíveis na literatura para células animais, majoritariamente híbridoma (YAHIA; MALPHETTES; HEINZLE, 2015) e CHO (CRAVEN *et al.*, 2013; LÓPEZ-MEZA *et al.*, 2015), além dos dados reportados por Sartori *et al.* (2018) para células BHK-21. Estes valores presentes na literatura para as respectivas constantes são apresentados na Tabela 11.

É importante ressaltar que se sugere que, para cada condição desejada, os coeficientes de rendimento $Y_{i,j}$, e a respectiva taxa específica de crescimento μ e o parâmetro do modelo $\mu_{m\acute{a}x}$ sejam obtidos empiricamente através dos dados experimentais obtidos em bateladas simples realizadas a diferentes concentrações iniciais de substrato, conduzidas para cada tipo de condição desejada. Desta forma, apenas as constantes K_{glc} e K_{lac} , precisam ser obtidas numericamente conforme previamente descrito neste item. Para os resultados apresentados nas simulações deste item, foram utilizados os dados experimentais gerados por outro membro do LECC/COPPE/UFRJ (Renata G. F. Alvim) em 2022, para cultivo em batelada simples da linhagem recombinante estudada. Desta maneira, é possível refletir da melhor forma as variações decorrentes dos modos de operação e do preparo do inóculo, que impactam diretamente no rendimento e crescimento celular, que tendem a ter uma variabilidade de maior magnitude em relação à escala e no modo de operação utilizados.

Tabela 11: Valores de referência encontrados na literatura para a constante de saturação K_{glc} e de inibição K_{lac} .

Linhagem celular	K_{glc} (g/L)	K_{lac} (g/L)	Autor
BHK-21	0,009-0,359	10,45-18,60	SARTORI <i>et al.</i> , 2018
r-CHO 320	0,180	13,51	CRAVEN <i>et al.</i> , 2013
r-CHO	0,290-1,023	N/A	LÓPEZ-MEZA <i>et al.</i> , 2015
Híbridoma	0,135-0,863	0,06-8,11	YAHIA; MALPHETTES; HEINZLE, 2015

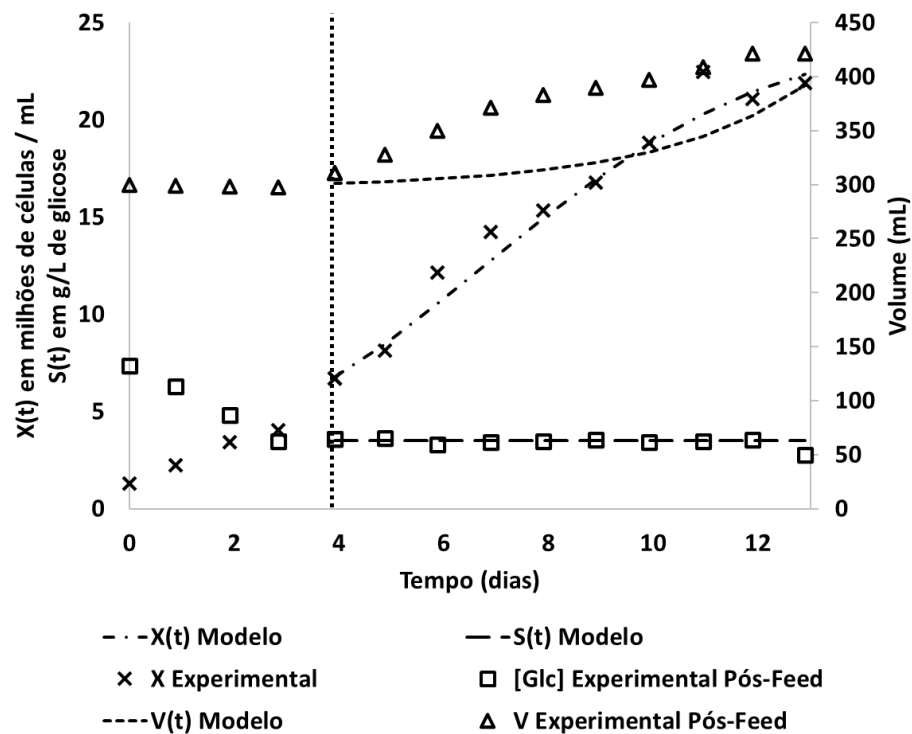
Fonte: Elaboração própria.

Algumas limitações notáveis quanto a esta abordagem adotada são as seguintes:

- 1) Apesar de, normalmente, o parâmetro μ ser definido como uma constante durante todo o cultivo, isto não é usualmente verídico para cultivos de células animais, onde, em decorrência dos *shifts* metabólicos observados, o valor de μ decresce ao longo do cultivo celular, mesmo se condições experimentais ótimas são mantidas (YAHIA; MALPHETTES; HEINZLE, 2021), conforme exposto previamente no item 2.3.3.3. Este mesmo racional é aplicável aos coeficientes de rendimento ($Y_{i,j}$), considerados constantes durante todo o processo (SARTORI *et al.*, 2018).
- 2) Adicionalmente, como observado anteriormente, o consumo de glicose e lactato varia conforme as células experienciam os *shifts* metabólicos supracitados, além das variações do ambiente extracelular, de forma que durante o final da fase estacionária e início da fase de declínio celular, os volumes de alimentação observados experimentalmente não seguem o aumento exponencial descrito na eq. (4.9).
- 3) É importante observar também que células animais, em especial de mamíferos, utilizadas em processos de batelada e batelada alimentada costumam apresentar um declínio significativo na concentração de células totais durante os dias finais de cultivo, logo, manifestando uma maior divergência do modelo adotado. Isto ocorre uma vez que o processo de lise celular é estimulado nestes ambientes estressantes (CRAVEN *et al.*, 2013), de maneira que seria necessária a introdução de uma nova constante que representasse este comportamento para incorporá-lo ao modelo.
- 4) Ademais, é usual que o modelo multiplicativo de Monod falhe na descrição da concentração celular quando esta atinge valores elevados, principalmente nos dias finais de cultivo, uma vez que há crescimento observável ainda que ocorra o esgotamento de substratos considerados supostamente limitantes neste modelo (SARTORI *et al.*, 2018);
- 5) Por último, a mesma limitação encontrada para a determinação de $\mu_{\text{máx}}$ devido à escassez de dados experimentais em batelada simples a diferentes concentrações iniciais de substrato também é verdadeira para a determinação das constantes K_{glc} e K_{lac} , uma vez que, durante a fase inicial para uma única batelada simples, o valor de μ permanece aproximadamente constante para diferentes concentrações de substrato (conforme este vai sendo consumido no decorrer da batelada), de maneira que há uma limitação inerente quando se tenta obter estas constantes a partir de um conjunto de dados limitado.

Não obstante, apesar das limitações apresentadas por modelos não estruturados, que contêm informações mecanísticas de processo limitadas, estes ainda servem como uma ferramenta efetiva para o desenvolvimento de processos (CRAVEN *et al.*, 2013). Os resultados obtidos para as constantes cinéticas do modelo explicitado e para as simulações realizadas para as estratégias de alimentação exponencial e contínua, utilizando estas constantes empiricamente obtidas e em conformidade com a metodologia explicitada anteriormente são apresentados na Figura 24 e Tabela 12 a seguir.

(a) Modelo: Estratégia de Alimentação Exponencial



(b) Modelo: Estratégia de Alimentação Constante

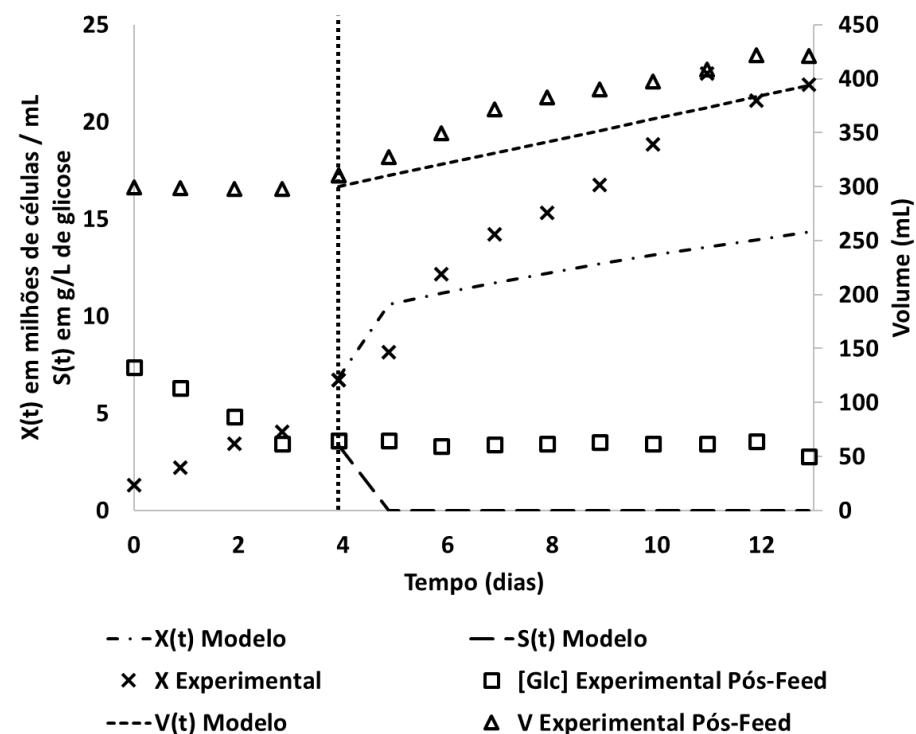


Figura 24: Comparação entre os resultados obtidos experimentalmente para batelada alimentada em pulsos para células HEK293 recombinantes produtoras da variante ômicron da proteína espícula de SARS-CoV-2 por Renata G. F. Alvim, em 2022, e os obtidos através da modelagem matemática de bioprocessos previamente explicitada. À esquerda, apresenta-se a estratégia de alimentação exponencial, enquanto que à direita, a estratégia de alimentação constante. A linha pontilhada vertical representa o início da política de alimentação e da vigência do modelo adotado.

Tabela 12: Parâmetros cinéticos de Monod obtidos neste trabalho, com base em dados experimentais obtidos por Renata G. F. Alvim para a linhagem de células HEK293 produtora da proteína S da variante ômicron BA.2.

$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	$Y_{\text{x/s}}$ (10^6 células/g de glicose)	K_{glc} (g/L)	K_{lac} (g/L)
0,02	0,94	0,02	1,32

Fonte: Elaboração própria. Constantes obtidas a partir dos dados experimentais de Renata G. F. Alvim.

Com base nos dados reportados na Tabela 12, é possível verificar que os valores reportados para $\mu_{\text{máx}}$ estão condizentes com as às faixas reportadas na literatura para células HEK293: 0,0106–0,0246 h^{-1} (LISTE-CALLEJA; LECINA; CAIRÓ, 2014); 0,0232–0,0358 (MARTÍNEZ-MONGE *et al.*, 2018); 0,024–0,027 h^{-1} (ALTARAS *et al.*, 2005, apud LISTE-CALLEJA; LECINA; CAIRÓ, 2014). Quanto aos valores das constantes K_{glc} e K_{lac} , estes foram compatíveis com a ordem de grandeza encontrada em estudos reportados para outras células animais de mamíferos (Tabela 11), porém é importante observar que há uma elevada variabilidade entre diferentes tipos de células e, até mesmo, entre linhagens recombinantes provenientes da mesma célula parental (YAHIA; MALPHETTES; HEINZLE, 2015), conforme previamente discutido no Capítulo 4.

Através da Figura 24, é possível observar que o comportamento do modelo de alimentação exponencial utilizado, correspondente às equações (4.11–4.14), foi significativamente consonante com os dados experimentais obtidos durante a alimentação em pulsos para os frascos agitados por Renata G. F. Alvim, em 2022, apresentando um coeficiente de determinação (eq. 5.3) de 0,99 para a concentração de células. Isto sugere que este formato de alimentação, em pulsos, está sendo adequado ao cultivo, uma vez que é esperado que a alimentação exponencial seja a mais benéfica ao metabolismo celular do que uma alimentação constante, que não aumenta ao longo do tempo. Adicionalmente, nota-se que o comportamento da concentração celular previsto pelo modelo para processos de estensa duração também se mostrou de predição adequada, uma vez que, através da eq. (4.8), nota-se que a concentração de células tende de maneira assintótica ao valor de $1/b$ no limite de $t \rightarrow \infty$ e este fato foi observado experimentalmente (Figura 24).

Em contrapartida, o modelo apresenta um perfil inerente de aumento exponencial do volume de cultivo que não se aproxima do comportamento obtido experimentalmente para alimentação em pulsos. Não obstante, frente às diferenças entre a estratégia de alimentação em pulsos e a estratégia exponencial e, considerando todas as limitações expostas anteriormente, é necessária uma avaliação mais profunda do comportamento do cultivo, com a utilização de uma maior quantidade de dados experimentais, para de fato determinar a adequação deste modelo quando avaliado em diferentes condições operacionais.

Complementarmente, foi realizada uma análise de sensibilidade dos parâmetros apresentados na Figura 25, de maneira a determinar quais destes parâmetros possuem maior impacto no modelo desenvolvido, utilizando-se do racional realizado por Craven *et al.* (2013), que varia cada parâmetro a ser investigado em $\pm 25\%$ de seu valor absoluto, de forma a avaliar individualmente o seu efeito na concentração celular (escolhido pelo grupo devido a ser uma variável chave que impacta todas as outras variáveis de processo). O impacto da variação dos parâmetros foi determinado através da soma dos quadrados da diferença entre os dados experimentais para alimentação em pulsos, os valores previstos

pelo modelo para alimentação exponencial e vide eq. (5.1), conforme previamente discutido.

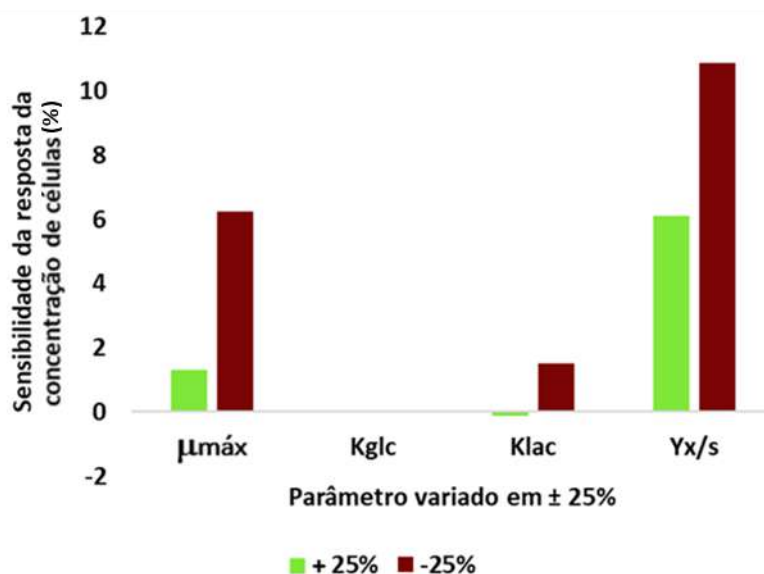


Figura 25: Sensibilidade da resposta de concentração celular do modelo fenomenológico macroscópico adotado, em porcento, frente à variação nas diferentes constantes adotadas. Variação de +25%, em verde, à esquerda. Variação de -25%, em vermelho (bordô), à direita. Efeitos estimados normalizados pela soma do quadrado da diferença entre o valor de concentração celular previsto pelo modelo e os valores de concentração celular encontrados experimentalmente para batelada alimentada em pulsos.

Os resultados obtidos na Figura 25 acima demonstram uma elevada sensibilidade do modelo a aumentos no coeficiente de rendimento de glicose (substrato) em células, seguido da sensibilidade à variação do parâmetro $\mu_{máx}$. Quanto às constantes para glicose e lactato, apenas o percentual de variação da constante de inibição por lactato demonstrou ter um efeito mais relevante para o modelo, quando comparado à constante de saturação para glicose. De acordo com Craven *et al.* (2013), observa-se que a concentração celular é, de forma geral, relativamente insensível quanto às constantes de saturação de Monod, sendo que o modelo possui uma resposta mais exacerbada quando parâmetros determinados experimentalmente são alterados (como o rendimento e a taxa específica de crescimento). Adicionalmente, o grupo demonstra que o modelo costuma não apresentar sensibilidade significativa quando se tratam de parâmetros obtidos através do ajuste numérico.

Por último, utilizou-se o modelo proposto para simular o processo de produção da proteína da espícula de SARS-CoV-2 em batelada alimentada nas escalas de bancada (volume de trabalho de 3 L) e escala piloto (volume de trabalho de 15 L), selecionando-se a estratégia de alimentação exponencial (eq.s 4.10-4.14) e aplicando-se as mesmas constantes obtidas para a escala de frascos agitados (Tabela 13) nestas equações. Desta forma, foi realizada uma previsão da quantidade, em litros, de solução concentrada de nutrientes para alimentação que seria necessária ao final de um processo de batelada alimentada de mesma duração em dias que os experimentos realizados em frascos agitados neste trabalho (entre 7-14 dias). Os resultados das simulações realizadas são sumarizados na Tabela 13.

Tabela 13: Simulação de processo de produção de proteína spike recombinante em batelada alimentada para escala de bancada (3L) e escala piloto (15L). Simulações realizadas para processos de 7, 10 e 15 dias de duração. Os volumes (vol.) apresentados são o volume total de alimentação necessário para suprir a demanda do processo completo em mL. O custo estimado foi realizado através da cotação de 1L de solução concentrada de nutrientes HEK FS, valores atualizados em maio/2023, preço especial para projetos em combate a COVID-19.

Simulação	Vol. de alimentação (7 dias) / custo estimado (R\$)	Vol. de alimentação (10 dias) / custo estimado (R\$)	Vol. de alimentação (14 dias) / custo estimado (R\$)
Escala bancada (3L)	88,47 mL R\$ 60,91	309,47 mL R\$ 213,07	1073,84 mL R\$ 739,35
Escala piloto (15L)	442,33 mL R\$ 304,55	1547,33 mL R\$ 1065,35	5369,21 mL R\$ 3696,75

Fonte: Elaboração própria.

6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

O presente trabalho avaliou o desempenho do processo em batelada alimentada para a produção de proteína *spike* de SARS-CoV-2 como potencial IFA de uma vacina de subunidade recombinante para COVID-19. O processo foi avaliado de maneira experimental e através de modelagem fenomenológica empírica de bioprocessos. Experimentalmente, foram estudados cultivos de células HEK293 recombinantes na escala de frascos agitados, de forma a gerar maior conhecimento científico sobre o processo, obtendo-se resultados promissores para o estudo e desenvolvimento de estratégias de alimentação e condução do processo, frente às condições operacionais investigadas.

Foram gerados com sucesso *pools* de células HEK293-3F6 recombinantes capazes de expressar de maneira estável a proteína *spike* da variante ômicron de SARS-CoV-2, após 28 dias de pressão seletiva na presença de G418 sulfato, obtendo-se resultados compatíveis com a literatura para produção desta proteína. Adicionalmente, foi possível avaliar o perfil comportamental dos parâmetros de processo em batelada alimentada: viabilidade celular, concentrações de células viáveis, de glicose, e de lactato, conjuntamente com a produção de proteína S obtida para os clones gerados previamente no LECC/COPPE/UFRJ, capazes de produzir a proteína da espícula das variantes delta, D614G e gama de SARS-CoV-2, além de um *pool* de células produtoras da variante ômicron BA.2. Desta forma, foi possível evidenciar a variação no crescimento, longevidade do cultivo e produção proteica entre as diferentes linhagens recombinantes. Observou-se também que o cultivo de pior desempenho em termos de viabilidade celular e VCD (clone F9/D614G) foi o único que não apresentou consumo de lactato relevante, ou seja, o de menor habilidade de detoxificação de lactato extracelular.

Quanto às estratégias de alimentação estudadas, foi observado que para aquelas em que a alimentação era introduzida apenas após o 5º dia de cultivo, houve um decréscimo mais acentuado da viabilidade celular e densidade de células viáveis. Além disso, foi verificada uma influência significativa da razão entre o volume de trabalho aplicado e o volume total do frasco nos parâmetros relacionados ao crescimento celular e longevidade do cultivo, demonstrando a relevância da transferência de oxigênio para este tipo de bioprocessos. Também foi evidenciada durante os experimentos realizados a capacidade inibitória de elevadas concentrações de substrato (glicose) em relação à conversão de substrato em massa celular e formação do produto de interesse.

Em relação aos parâmetros cinéticos de Monod, a taxa específica de crescimento celular observada foi consonante com os valores reportados na literatura para células HEK293 recombinantes. Ademais, foi verificado que, para a produção de proteína *spike* recombinante, a estratégia de alimentação mais adequada foi a do ajuste de glicose para 3,5 g/L a partir do 4º dia de cultivo (obtendo-se estimativas de concentração de proteína recombinante de cerca de 2x o valor observado para as demais estratégias), tal qual havia sido determinado empiricamente em experimentos anteriores no LECC/COPPE/UFRJ. Este resultado também corroborou a hipótese da relação diretamente proporcional entre a concentração de células viáveis presentes durante os dias finais de cultivo e a produção de proteína obtida.

Quanto à modelagem fenomenológica macroscópica do processo de batelada alimentada, os parâmetros empíricos obtidos foram compatíveis com dados reportados na literatura para HEK293 e para outras células animais utilizadas na área de Biotecnologia Farmacêutica para a produção de proteínas recombinantes. Adicionalmente, o modelo

utilizado, prevendo estratégia exponencial de alimentação, apresentou um ajuste capaz de descrever satisfatoriamente os resultados obtidos experimentalmente em batelada alimentada por pulsos, de maneira que, apesar da simplicidade da metodologia experimental dos modelos adotados (baseado na equação de Monod modificada), os pulsos de alimentação definidos em função dos dados de glicose no cultivo celular parecem ter permitido obter resultados que seriam alcançados com uma estratégia mais sofisticada de alimentação, baseada no aumento da quantidade de *feed* alimentada ao longo do tempo. Desta maneira, é recomendada a avaliação do desempenho deste modelo frente a uma maior quantidade de dados experimentais, de forma que se garanta que os resultados observados para o conjunto de dados disponíveis para este trabalho são reprodutíveis.

Por último, ressalta-se que, ao longo do estudo experimental, foi possível observar a influência de diversos fatores operacionais no comportamento do cultivo celular, que sugerem oportunidades de melhoria destes processos, possibilitando lograr maiores concentrações de células viáveis, estender o tempo de cultivo e, logo, potencialmente aumentar a produção da proteína S de SARS-CoV-2 recombinante. Dentre as oportunidades de melhoria identificadas, seja durante a revisão bibliográfica, ou durante os experimentos realizados neste trabalho, sugere-se que sejam realizados os seguintes estudos experimentais:

- Avaliação do desempenho do processo de produção em batelada alimentada de proteína da espícula recombinante de SARS-CoV-2 frente a condições de hipotermia leve (32°C), com mudança de temperatura de 37°C para 32°C após a fase inicial do processo (por exemplo, conduzir o cultivo até o quarto dia na temperatura de 37 °C para então passar a utilizar a condição de hipotermia leve);
- Incorporação de aditivos químicos ao meio de cultivo celular, como ácidos graxos de cadeia curta (por exemplo, ácido valérico), de maneira a avaliar o efeito destas moléculas na produção da proteína recombinante;
- Realização de cultivos em frascos agitados em diferentes razões de volume de trabalho para volume total do frasco e também diferentes velocidades de agitação, para avaliar o impacto de alterações na transferência de oxigênio, em especial durante os dias finais de cultivo, onde há elevada concentração de células presentes no meio;
- Estudo mais aprofundado para avaliar se outros nutrientes são limitantes no cultivo, de maneira que se avalie a hipótese de que o dia em que se inicia a alimentação do processo de *fed-batch* possa ter influência direta sobre a duração do cultivo, concentração de células viáveis máxima atingida, viabilidade e produção máximas atingidas;
- Realização de experimentos de batelada simples a diferentes concentrações iniciais de substrato, de maneira a gerar constantes de afinidade pelo substrato e inibição pelo produto de maior grau de confiabilidade;
- Avaliar a incorporação no modelo matemático de um componente que corrija o comportamento previsto com base nos dados que são coletados ao longo da condução do processo em batelada alimentada.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Ministério Da Saúde. Estudos clínicos com vacinas. Distrito Federal. 2023a. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/paf/coronavirus/vacinas/estudos-clinicos>. Acesso em: 14 jan. 2023.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Ministério Da Saúde. Vacinas - Covid-19. Distrito Federal. 2023b. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/paf/coronavirus/vacinas>. Acesso em: 14 jan. 2023.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Ministério da Saúde. Vacina contra Covid-19: dos testes iniciais ao registro: entenda os passos obrigatórios para que uma vacina possa ser comercializada e disponibilizada no brasil. Entenda os passos obrigatórios para que uma vacina possa ser comercializada e disponibilizada no Brasil. Distrito Federal. 2023c. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2020/vacina-contra-covid-19-dos-testes-iniciais-ao-registro>. Acesso em: 25 abr. 2023.
- AIBA, S., SHODA, M., NAGATANI, M. 1968. Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 10: 845-864.
- ALVIM, R; LIMA, T; MARSILI, F; CASTILHO, L. "Towards updatable, multivalent Covid vaccines: A platform process to produce trimeric spike protein of SARS-COV-2 variants expressed in HEK293 stable cell clones" in "Vaccine Technology VIII", Tarit Mukhopadhyay, Merck Research Laboratories, USA; Charles Lutsch, Sanofi Pasteur, France; Linda Hwee-Lin Lua, University of Queensland, Australia; Francesc Godia, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain Eds, ECI Symposium Series, (2022a). https://dc.engconfintl.org/vaccine_viii/52.
- ALVIM, R.; LIMA, T.; RODRIGUES, D.; MARSILI, F.; BOZZA, V.; HIGA, L.; MONTEIRO, F.; LEITÃO, I.; CARVALHO, R.; GALLIEZ, R.; CASTINEIRAS, T.; NOBREGA, A.; TRAVASSOS, L.; FERREIRA JR, O.; TANURI, A.; VALE, A. CASTILHO, L. From a recombinant key antigen to an accurate, affordable serological test: lessons learnt from covid-19 for future pandemics. *Biochemical Engineering Journal*, [S.L.], v. 186, p. 108537, ago. 2022b. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2022.108537>.
- ARNOLDI, L.; LIMA, T.; CASTILHO, L. ESTUDOS EXPERIMENTAIS E TEÓRICOS PARA DAR SUPORTE AO DESENVOLVIMENTO DE NOVAS VACINAS BASEADAS EM PROTEÍNAS RECOMBINANTES. In: SIAC – SEMANA DE INTEGRAÇÃO ACADÊMICA DA UFRJ, 11., 2022, Rio de Janeiro. Caderno de Resumos - Sistema SIAC - UFRJ. Rio de Janeiro: Editora Ufrj, 2022. v. 1, p. 59-59. Disponível em: <https://sistemasiac.ufrj.br/cadernoController/gerarCadernoResumo/36000000>. Acesso em: 27 abr. 2023.
- ARRUDA, H.; LIMA, T.; ALVIM, R.; V.; ABREU, D.; MARSILI, F.; CRUZ, K.;

- MARQUES, M.; SOSA-ACOSTA, P.; QUINONES-VEGA, M. Conformational stability of SARS-CoV-2 glycoprotein spike variants. *IScience*, [S.L.], v. 26, n. 1, p. 105696, jan. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.isci.2022.105696>.
- ASHRAF, S. A quadruple blinded placebo controlled randomised trial to evaluate the effectiveness of an Iodine complex for patients with mild to moderate COVID-19 in Pakistan (I-COVID-PK): a structured summary of a study protocol for a randomised controlled trial. *Trials*, [S.L.], v. 22, n. 1, 10 fev. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13063-021-05081-3>.
 - BERCHE, P. The enigma of the 1889 Russian flu pandemic: a coronavirus?. *La Presse Médicale*, [S.L.], v. 51, n. 3, p. 104111, set. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lpm.2022.104111>.
 - BYAMBASUREN, O.; CARDONA, M.; BELL, K.; CLARK, J.; MCLAWS, M.; GLASZIOU, P. Estimating the extent of asymptomatic COVID-19 and its potential for community transmission: systematic review and meta-analysis. *Official Journal Of The Association Of Medical Microbiology And Infectious Disease Canada*, [S.L.], v. 5, n. 4, p. 223-234, 31 dez. 2020. University of Toronto Press Inc. (UTPress). <http://dx.doi.org/10.3138/jammi-2020-0030>.
 - CASCELLA, M.; RAJNIK M.; ALEEM A.; *et al.* Features, Evaluation, and Treatment of Coronavirus (COVID-19) [Updated 2022 Oct 13]. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554776/>. Acesso em 17 dez. 2022.
 - CASTILHO, L. Aspectos básicos do cultivo *in vitro* de células animais. Aula da disciplina EQB079 - Cultivo de células animais. Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2019.
 - CASTRO, R.; NOBRE, L.; ELEUTÉRIO, R.; THOMAZ, M.; PIRES, A.; MONTEIRO, S.; MENDES, S.; GOMES, R.; CLEMENTE, J.; SOUSA, M. Production of high-quality SARS-CoV-2 antigens: impact of bioprocess and storage on glycosylation, biophysical attributes, and elisa serologic tests performance. *Biotechnology And Bioengineering*, [S.L.], v. 118, n. 6, p. 2202-2219, 27 mar. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.27725>.
 - CEPI - COALITION FOR EPIDEMIC PREPAREDNESS INOVATION. Preparing for future pandemics. Noruega. 2023. Disponível em: <https://cepi.net/>. Acesso em: 01 maio 2023.
 - CHEN, R.; HWANG, C.; LEE, K.; ZYDNEY, A.; KOKAI-KUN, J. Where Do We Stand on Adopting Continuous Manufacturing for Biologics? 2022. Disponível em: <https://www.bioprocessonline.com/doc/where-do-we-stand-on-adopting-continuous-manufacturing-for-biologics-0001>. Acesso em: 25 jun. 2023.
 - CIBELLI, N; ARIAS, G.; FIGUR, M.; KHAYAT, S.; LEACH, K.; LOUKINOV, I.; SHADRICK, W.; CHUENCHOR, W.; TSYBOVSKY, Y.; PATEL, A. Advances in purification of SARS-CoV-2 spike ectodomain protein using high-throughput

screening and non-affinity methods. *Scientific Reports*, [S.L.], v. 12, n. 1, 15 mar. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-022-07485-w>.

- CLOVER BIOPHARMACEUTICALS. Our Technology. China. 2023. Disponível em: <https://www.cloverbiopharma.com/science&technology/ourtechnology.html>. Acesso em: 04 maio 2023.
- CORBETT, K.; EDWARDS, D.; LEIST, S.; ABIONA, O.; BOYOGLU-BARNUM, S.; GILLESPIE, R.; HIMANSU, S; SCHÄFER, A.; ZIWAWO, C.; DIPIAZZA, A. SARS-CoV-2 mRNA vaccine design enabled by prototype pathogen preparedness. *Nature*, [S.L.], v. 586, n. 7830, p. 567-571, 5 ago. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2622-0>.
- CRAVEN, S.; SHIRSAT, N.; WHELAN, J.; GLENNON, B. “Process Model Comparison and Transferability across Bioreactor Scales and Modes of Operation for a Mammalian Cell Bioprocess”. *Biotechnology Progress*, vol. 29, no 1, janeiro de 2013, p. 186–96. <https://doi.org/10.1002/btpr.1664>.
- CUI, J.; LI, F.; SHI, Z. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology*, [S.L.], v. 17, n. 3, p. 181-192, 10 dez. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9>.
- CYTIVA. Fundamentals of mixed mode (multimodal) chromatography. Estados Unidos 2023. Disponível em: <https://www.cytivalifesciences.com/en/us/solutions/protein-research/knowledge-center/protein-purification-methods/multimodal-chromatography>. Acesso em: 01 maio 2023.
- DANCER, S.; TANG, J.; MARR, L.; MILLER, S.; MORAWSKA, L.; JIMENEZ, J. Putting a balance on the aerosolization debate around SARS-CoV-2. *Journal Of Hospital Infection*, [S.L.], v. 105, n. 3, p. 569-570, jul. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2020.05.014>.
- ESAKANDARI, H.; NABI-AFJADI, M.; FAKKARI-AFJADI, J.; FARAHMANDIAN, N.; MIRESMAEILI, S.; BAHREINI, E. A comprehensive review of COVID-19 characteristics. *Biological Procedures Online*, [S.L.], v. 22, n. 1, 4 ago. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12575-020-00128-2>.
- ESPOSITO, D.; MEHALKO, J.; DREW, M.; SNEAD, K.; WALL, V.; TAYLOR, T.; FRANK, P.; DENSON, J.; HONG, M.; GULTEN, G. Optimizing high-yield production of SARS-CoV-2 soluble spike trimers for serology assays. *Protein Expression And Purification*, [S.L.], v. 174, p. 105686, out. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2020.105686>.
- EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. Implications of the further emergence and spread of the SARS-CoV-2 B.1.1.529 variant of concern (ômicron) for the EU/EEA — first

- update. December 2, 2021 (<https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/treat-assessment-covid-19-emergence-sars-cov-2-variant-omicron-december-2021.pdf>).
- EUROPEAN PATIENTS' ACADEMY ON THERAPEUTIC INNOVATION. Blinding of The Trial. Holanda. 2023. Disponível em: <https://learning.eupati.eu/mod/book/view.php?id=342&chapterid=276>. Acesso em: 29 abr. 2023.
 - FAN, Y.; LEY, D.; ANDERSEN, M. Fed-Batch CHO Cell Culture for Lab-Scale Antibody Production. In: PIKANÇO-CASTRO, Virgínia; SWIECH, Kamilla. Recombinant Glycoprotein Production: methods and protocols. Berlim: Springer, 2018. Cap. 12. p. 147-161. (Methods in Molecular Biology (MIMB, volume 1674)). Disponível em: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-1-4939-7312-5>. Acesso em: 15 jan. 2023.
 - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. U.S. Department Of Health And Human Services. Guidance for Industry: general principles for the development of vaccines to protect against global infectious diseases. General Principles for the Development of Vaccines to Protect Against Global Infectious Diseases. Estados Unidos. 2011. Disponível em: <https://www.fda.gov/files/vaccines,%20blood%20&%20biologics/published/Guidance-for-Industry--General-Principles-for-the-Development-of-Vaccines-to-Protect-Against-Global-Infectious-Diseases.pdf>. Acesso em: 23 abr. 2023.
 - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. U.S. Department Of Health And Human Services. Step 3: Clinical Research. Estados Unidos. 2018. Disponível em: <https://www.fda.gov/patients/drug-development-process/step-3-clinical-research>. Acesso em: 27 abr. 2023.
 - FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fiocruz libera primeira vacina Covid-19 nacional. Rio de Janeiro. 2022. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/noticia/fiocruz-libera-primeira-vacina-covid-19-nacional#:~:text=As%20pouco%20mais%20de%20550,de%20doses%20da%20vacina%20nacional..> Acesso em: 15 jan. 2023.
 - FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fiocruz esclarece sobre vacina Covid-19. Rio de Janeiro. 2023. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/noticia/fiocruz-esclarece-sobre-vacina-covid-19>. Acesso em: 23 abr. 2023.
 - GAVI. Our Alliance. Suíça 2023. Disponível em: <https://www.gavi.org/our-alliance>. Acesso em: 02 maio 2023.
 - GRAHAM, B.; MASCOLA, J.; FAUCI, A. Novel Vaccine Technologies. *Jama*, [S.L.], v. 319, n. 14, p. 1431, 10 abr. 2018. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2018.0345>.
 - GRAHAM, R.; DONALDSON, E.; BARIC, R. A decade after SARS: strategies for controlling emerging coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology*, [S.L.], v. 11, n. 12, p. 836-848, 11 nov. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3143>.

- GREEN, E.; HAMAKER, N.; LEE, K. Comparison of vector elements and process conditions in transient and stable suspension HEK293 platforms using SARS-CoV-2 receptor binding domain as a model protein. *Bmc Biotechnology*, [S.L.], v. 23, n. 1, 7 mar. 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12896-023-00777-7>.
- HANSSON, M.; NYGREN, P.; STÅHL, S. Design and production of recombinant subunit vaccines. *Biotechnology And Applied Biochemistry*, [S.L.], v. 32, n. 2, p. 95, 1 out. 2000. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1042/ba20000034>.
- HASSINE, I. Covid-19 vaccines and variants of concern: a review. *Reviews In Medical Virology*, [S.L.], v. 32, n. (4): e2313, 9 nov. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/rmv.2313>.
- HE, J.; GUO, Y.; MAO, R.; ZHANG, J. Proportion of asymptomatic coronavirus disease 2019: a systematic review and meta-analysis. *Journal Of Medical Virology*, [S.L.], v. 93, n. 2, p. 820-830, 13 ago. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.26326>.
- HEIDARY, M.; KAVIAR, V.; SHIRANI, M.; GHANAVATI, R.; MOTAHAR, M.; SHOLEH, M.; GHAHRAMANPOUR, H.; KHOSHNOOD, S. A Comprehensive Review of the Protein Subunit Vaccines Against COVID-19. *Frontiers In Microbiology*, [S.L.], v. 13, 14 jul. 2022. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2022.927306>.
- HSIEH C., GOLDSMITH J., SCHAUB J., DIVENERE A., KUO H., JAVANMARDI K., LE K., WRAPP D., LEE A., LIU Y., CHOU C., BYRNE P., HJORTH C., JOHNSON N., LUDES-MEYERS J., NGUYEN A., PARK J., WANG N., AMENGOR D., MAYNARD J., FINKELSTEIN I., MCLELLAN J. Structure-based Design of Prefusion-stabilized SARS-CoV-2 Spikes. *bioRxiv [Preprint]*. 2020 May 30:2020.05.30.125484. doi: 10.1101/2020.05.30.125484. Update in: *Science*. 2020 Jul 23;; PMID: 32577660; PMCID: PMC7302215.
- HUANG, X.; WEI, F.; HU, L.; WEN, L.; CHEN, K. Epidemiology and Clinical Characteristics of COVID-19. *Archives Of Iranian Medicine*, [S.L.], v. 23, n. 4, p. 268-271, 1 abr. 2020. Maad Rayan Publishing Company. <http://dx.doi.org/10.34172/aim.2020.09>.
- HUANG, Y.; HU, W.; RUSTANDI, E.; CHANG, K.; YUSUF-MAKAGIANSAR, H.; RYLL, T. (2010). Maximizing productivity of CHO cell-based fed-batch culture using chemically defined media conditions and typical manufacturing equipment. *Biotechnology Progress*, 26(5), 1400–1410. doi:10.1002/btpr.436
- INSTITUTO BUTANTAN. Ministério da Saúde. Como é feita a vacina da influenza do Butantan? Produção envolve IFA próprio e meses de formulação. Governo do Estado de São Paulo. São Paulo. 2021. Disponível em: <https://butantan.gov.br/noticias/como-e-feita-a-vacina-da-influenza-do-butantan-producao-envolve-ifa-proprio-e-meses-de-formulacao>. Acesso em: 16 dez. 2022.

- INSTITUTO BUTANTAN. Ministério da Saúde. Instituto Butantan é condecorado com Grande-Colar do Mérito do TCU pelo trabalho na pandemia de Covid-19: honraria referente ao ano de 2021, quando o butantan trouxe a primeira vacina contra covid-19 do país, foi adiada em virtude da emergência sanitária. Honraria referente ao ano de 2021, quando o Butantan trouxe a primeira vacina contra Covid-19 do país, foi adiada em virtude da emergência sanitária. São Paulo. 2023. Disponível em: <https://butantan.gov.br/noticias/instituto-butantan-e-condecorado-com-grande-colar-do-merito-do-tcu-pelo-trabalho-na-pandemia-de-covid-19>. Acesso em: 23 abr. 2023.
- JÄNICKE, G., SAUTER, C., BUX, R., HAAS, J. (2007). Characterisation of Shake Flasks for Cultivation of Animal Cell Cultures. In: Smith, R. (eds) Cell Technology for Cell Products., vol 3. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5476-1_131
- JOHARI, Y.; ESTES, S.; ALVES, C.; SINACORE, M.; JAMES, D. Integrated cell and process engineering for improved transient production of a “difficult-to-express” fusion protein by CHO cells. *Biotechnology And Bioengineering*, [S.L.], v. 112, n. 12, p. 2527-2542, 7 set. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.25687>.
- JOHARI, Y.; JAFFÉ, S.; SCARROTT, J.; JOHNSON, A.; MOZZANINO, T; POHLE, T.; MAISURIA, S; BHAYAT-CAMMACK, A; LAMBIASE, G; BROWN, A. Production of trimeric SARS-CoV-2 spike protein by CHO cells for serological COVID-19 testing. *Biotechnology And Bioengineering*, [S.L.], v. 118, n. 2, p. 1013-1021, 11 nov. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.27615>.
- JOUBERT, S.; STUIBLE, M.; LORD-DUFOUR, S.; LAMOUREUX, L.; VAILLANCOURT, F.; PERRET, S.; OUMET, M.; PELLETIER, A.; BISSON, L.; MAHIMKAR, R. A CHO stable pool production platform for rapid clinical development of trimeric SARS-CoV-2 spike subunit vaccine antigens. *Biotechnology And Bioengineering*, [S.L.], 29 mar. 2023. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.28387>.
- KAO, L.; TYSON, J.; BLAKELY, M.; LALLY, K. Clinical Research Methodology I: introduction to randomized trials. *Journal Of The American College Of Surgeons*, [S.L.], v. 206, n. 2, p. 361-369, fev. 2008. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2007.10.003>.
- KLAUBERT, Stephanie R.; CHITWOOD, Dylan G.; DAHODWALA, Hussain; WILLIAMSON, Madison; KASPER, Rachel; LEE, Kelvin H.; HARCUM, Sarah W. Method to transfer Chinese hamster ovary (CHO) batch shake flask experiments to large-scale, computer-controlled fed-batch bioreactors. *Methods In Enzymology*, [S.L.], p. 297-320, 2021. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/bs.mie.2021.05.005>.
- KONAKOVSKY, V.; CLEMENS, C.; MÜLLER, M.; BECHMANN, J.; BERGER, M.; SCHLATTER, S.; HERWIG, C. Metabolic Control in Mammalian Fed-Batch Cell Cultures for Reduced Lactic Acid Accumulation and Improved Process Robustness. *Bioengineering*, [S.L.], v. 3, n. 1, p. 5, 11 jan. 2016. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/bioengineering3010005>.
- KORNECKI, M.; STRUBE, J. Accelerating Biologics Manufacturing by Upstream

- Process Modelling. *Processes*, [S.L.], v. 7, n. 3, p. 166, 21 mar. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/pr7030166>.
- KRAMMER, F. SARS-CoV-2 vaccines in development. *Nature*, [S.L.], v. 586, n. 7830, p. 516-527, 23 set. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2798-3>.
 - LANCET, The. COVID-19 in Brazil: “so what?”. *The Lancet*, [S.L.], v. 395, n. 10235, p. 1461, maio 2020. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)31095-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(20)31095-3).
 - LANGER, E.; RADER, R. Biopharmaceutical Manufacturing: historical and future trends in titers, yields, and efficiency in commercial-scale bioprocessing. *Bioprocessing Journal*, [S.L.], v. 13, n. 4, p. 47-54, 16 jan. 2015. *BioProcessing Journal*. <http://dx.doi.org/10.12665/j134.langer>.
 - LARA, L. 50 países já iniciaram a vacinação contra Covid-19 e Brasil não está na lista: cerca de 17,5 milhões de pessoas já receberam a primeira dose do imunizante em todo o mundo. Cerca de 17,5 milhões de pessoas já receberam a primeira dose do imunizante em todo o mundo. 2021. Disponível em: <https://www.cnnbrasil.com.br/internacional/50-paises-ja-iniciaram-a-vacinacao-contracovid-19-e-brasil-nao-esta-na-lista/>. Acesso em: 23 abr. 2023.
 - LEÓN, G.; HERRERA, M.; VARGAS, M.; ARGUEDAS, M.; SÁNCHEZ, A.; SEGURA, Á.; GÓMEZ, A.; SOLANO, G.; CORRALES-AGUILAR, E.; RISNER, K. Development and characterization of two equine formulations towards SARS-CoV-2 proteins for the potential treatment of COVID-19. *Scientific Reports*, [S.L.], v. 11, n. 1, 10 maio 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-021-89242-z>.
 - LISTE-CALLEJA, L.; LECINA, M.; CAIRÓ, J. HEK293 cell culture media study towards bioprocess optimization: animal derived component free and animal derived component containing platforms. *Journal Of Bioscience And Bioengineering*, [S.L.], v. 117, n. 4, p. 471-477, abr. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.09.014>.
 - LISTE-CALLEJA, L.; LECINA, M.; LOPEZ-REPULLO, J.; ALBIOL, J.; SOLÀ, C.; CAIRÓ, J. Lactate and glucose concomitant consumption as a self-regulated pH detoxification mechanism in HEK293 cell cultures. *Applied Microbiology And Biotechnology*, [S.L.], v. 99, n. 23, p. 9951-9960, 14 ago. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-015-6855-z>.
 - LOPES, C.; AMARAL, F. EXPLORANDO O SISTEMA IMUNOLÓGICO. Minas Gerais: Editora Puc Minas, 2011. Cap. 5. p. 1-44. Disponível em: http://www1.pucminas.br/imagedb/documento/DOC_DSC_NOME_ARQUI20130912164902.pdf?_ga=2.20345080.1932309377.1682986534-445469469.1682986534. Acesso em: 01 maio 2023.
 - LOPES, D. The place of Brazil at the vaccine line: a deliberate strategy of not tackling the novel coronavirus from the start has left the pandemic out of control in brazil.. *A*

deliberate strategy of not tackling the novel coronavirus from the start has left the pandemic out of control in Brazil.. 2021. Disponível em: <https://www.orfonline.org/expert-speak/place-brazil-vaccine-line/>?. Acesso em: 23 abr. 2023.

- LÓPEZ-MEZA, J.; ARAÍZ-HERNÁNDEZ, D.; CARRILLO-COCOM, L.; LÓPEZ-PACHECO, F.; ROCHA-PIZAÑA, M.; ALVAREZ, M. Using simple models to describe the kinetics of growth, glucose consumption, and monoclonal antibody formation in naive and infliximab producer CHO cells. *Cytotechnology*, [S.L.], v. 68, n. 4, p. 1287-1300, 20 jun. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10616-015-9889-2>.
- LU, Franklin; TOH, Poh Choo; BURNETT, Iain; LI, Feng; HUDSON, Terry; AMANULLAH, Ashraf; LI, Jincui. Automated dynamic fed-batch process and media optimization for high productivity cell culture process development. *Biotechnology And Bioengineering*, [S.L.], v. 110, n. 1, p. 191-205, 1 set. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.24602>.
- MARTÍNEZ-MONGE, I.; ALBIOL, J.; LECINA, M.; LISTE-CALLEJA, L.; MIRET, J.; SOLÀ, C.; CAIRÓ, J. Metabolic flux balance analysis during lactate and glucose concomitant consumption in HEK293 cell cultures. *Biotechnology And Bioengineering*, [S.L.], v. 116, n. 2, p. 388-404, dez. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.26858>.
- MATHIEU, E.; RITCHIE, H.; RODÉS-GUIRAO, L.; APPEL, C.; GIATTINO, C.; HASELL, J.; MACDONALD, B.; DATTANI, S.; BELTEKIAN, D.; ORTIZ-OSPINA, E.; ROSER, M. "Coronavirus Pandemic (COVID-19)". *OurWorldInData.org*. Reino Unido. 2020. Disponível em: '<https://ourworldindata.org/coronavirus>' [Recurso Online], Acesso em 01 jan 2023.
- MAYRHOFER, P.; HUNJADI, M.; KUNERT, R. Functional Trimeric SARS-CoV-2 Envelope Protein Expressed in Stable CHO Cells. *Frontiers In Bioengineering And Biotechnology*, [S.L.], v. 9, 17 dez. 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fbioe.2021.779359>.
- MELLO, I; CONCEIÇÃO, M.; JORGE, S.; CRUZ, P.; ALVES, P.; CARRONDO, M.; PEREIRA, C. Viral vaccines: concepts, principles, and bioprocesses. In: CASTILHO, L. *et al.* *Animal Cell Technology: from biopharmaceuticals to gene therapy. From Biopharmaceuticals to Gene Therapy*. New York: Taylor & Francis, 2008. Cap. 18. p. 435-455.
- MICHAELIS. *Dicionário Brasileiro da Língua Portuguesa*. São Paulo. 2016. Disponível em: <<http://michaelis.uol.com.br/>>. SAVI, M. G. M.; BURG, H. S. (Trad., adap.)
- MITCHELL VS, PHILIPOSE NM, SANFORD JP, editors. Institute of Medicine (US) Committee on the Children's Vaccine Initiative: Planning Alternative Strategies. *The Children's Vaccine Initiative: Achieving the Vision*. Washington (DC): National Academies Press (US); 1993. 6, Stages of Vaccine Development. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK236428/>. Acesso em 24 abr. 2023.

- MONOD, J. THE GROWTH OF BACTERIAL CULTURES. Annual Review Of Microbiology, [S.L.], v. 3, n. 1, p. 371-394, out. 1949. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.mi.03.100149.002103>.
- NATIONAL CANCER INSTITUTE AT THE NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. U.S. Department Of Health And Human Services. Phase I clinical trial. Estados Unidos. 2023a. Disponível em: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/phase-i-clinical-trial>. Acesso em: 27 abr. 2023.
- NATIONAL CANCER INSTITUTE AT THE NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. U.S. Department Of Health And Human Services. Phase III clinical trial. Estados Unidos. 2023b. Disponível em: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/phase-3-clinical-trial>. Acesso em: 27 abr. 2023.
- NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH - NIH OFFICE OF AIDS RESEARCH PEOPLE WITH HIV Research. U.S. Department Of Health And Human Services. Phase 4 Trial. 2021. Disponível em: <https://clinicalinfo.hiv.gov/en/glossary/phase-4-trial>. Acesso em: 27 abr. 2023.
- NNAJI, C.; SHEY, M.; ADETOKUNBOH, O.; WIYSONGE, C. Immunogenicity and safety of fractional dose yellow fever vaccination: a systematic review and meta-analysis.: A systematic review and meta-analysis. Vaccine, [s.l.], v. 38, n. 6, p. 1291-1301, fev. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.12.018>.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. Suíça. 2023a. Disponível em: <https://covid19.who.int/>. Acesso em: 01 jul. 2023.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Clinical trials. Suíça. 2023b. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/clinical-trials>. Acesso em: 27 abr. 2023.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Tracking SARS-CoV-2 variants: variants of concern (VOC). Suíça. 2022a. Disponível em: <https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants>. Acesso em: 17 dez. 2022.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Global Vaccine Market Report 2022: a shared understanding for equitable access to vaccines. Suíça: World Health Organization, 2022b. 59 p. (OMS/IVB/2022.001). Disponível em: <https://www.who.int/publications/m/item/global-vaccine-market-report-2022>. Acesso em: 05 jan. 2023b.
- PALMEIRA V. IBICT - Instituto Brasileiro de Informação em Ciência e Tecnologia. Estruturas de Proteínas de Ligação a RNA SARS-CoV-2 e Alvos Terapêuticos. Rio de Janeiro. 2021. Disponível em: <http://evidenciascovid19.ibict.br/index.php/tag/proteinas-nao-estruturais/#:~:text=J%C3%A1%20as%20prote%C3%ADnas%20n%C3%A3o%20estr>

uturais,antivirais%20contra%20o%20Coronav%C3%ADrus%202019. Acesso em: 19 dez. 2022.

- PÉREZ-RODRIGUEZ, S.; REYNOSO-CERECEDA, G.; VALDEZ-CRUZ, N.; TRUJILLO-ROLDÁN, M. A comprehensive comparison of mixing and mass transfer in shake flasks and their relationship with MAb productivity of CHO cells. *Bioprocess And Biosystems Engineering*, [S.L.], v. 45, n. 6, p. 1033-1045, 26 mar. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00449-022-02722-y>.
- PONTE, G; PIMENTEL, I. História e qualidade: produção da vacina contra febre amarela na Fiocruz. *Bio-Manguinhos/Fiocruz*. Rio de Janeiro. 2017. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/noticia/historia-e-qualidade-producao-da-vacina-contra-febre-amarela-na-fiocruz>. Acesso em: 16 dez. 2022.
- PREFEITURA DA CIDADE DO RIO DE JANEIRO. Prefeitura anuncia calendário de vacinação até o fim de março. Confira as datas. Rio de Janeiro. 2021. Disponível em: <https://prefeitura.rio/noticias/prefeitura-anuncia-calendario-de-vacinacao-ate-o-fim-de-marco-confira-as-datas/>. Acesso em: 23 abr. 2023.
- PREFEITURA DA CIDADE DE SÃO PAULO. Secretaria Municipal da Saúde. https://www.prefeitura.sp.gov.br/cidade/secretarias/saude/vigilancia_em_saude/index.php?p=307599: vacinação contra covid-19 no município de São Paulo. Vacinação contra covid-19 no município de São Paulo. São Paulo .2023. Vacina Sampa. Disponível em: https://www.prefeitura.sp.gov.br/cidade/secretarias/saude/vigilancia_em_saude/index.php?p=307599. Acesso em: 23 abr. 2023.
- RAGHUVAMSI, P.; TULSIAN, N; SAMSUDIN, F.; QIAN, X.; PURUSHOTORMAN, K.; YUE, G.; KOZMA, M.; HWA, W.; LESCAR, J.; BOND, P. SARS-CoV-2 S protein: ACE-2 interaction reveals novel allosteric targets. *Elife*, [S.L.], v. 10, 8 fev. 2021. *ELife Sciences Publications, Ltd*. <http://dx.doi.org/10.7554/elife.63646>.
- RESTELLI, V.; WANG, M.; HUZEL, N.; ETHIER, M.; PERREAULT, H.; BUTLER, M. The effect of dissolved oxygen on the production and the glycosylation profile of recombinant human erythropoietin produced from CHO cells. *Biotechnology And Bioengineering*, [S.L.], v. 94, n. 3, p. 481-494, 20 jun. 2006. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.20875>.
- RIEDEL, L. Shaken, not stirred – How to transfer suspension cultures between differently operated shaking platforms. 2020. Disponível em: <https://www.xell.ag/shaken-not-stirred-how-to-transfer-suspension-cultures-between-differently-operated-shaking-platforms/technical-notes/>. Acesso em: 06 maio 2023.
- RIOU, J.; ALTHAUS, C. Pattern of early human-to-human transmission of Wuhan 2019 novel coronavirus (2019-nCoV), December 2019 to January 2020. *Eurosurveillance*, [S.L.], v. 25, n. 4, 30 jan. 2020. European Centre for Disease Control and Prevention (ECDC). <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.es.2020.25.4.2000058>.

- ROMÁN, R.; FARRÀS, M.; CAMPS, M.; MARTÍNEZ-MONGE, I.; COMAS, P.; MARTÍNEZ-ESPELT, M.; LECINA, M.; CASABLANCAS, A.; CAIRÓ, J. Effect of continuous feeding of CO₂ and pH in cell concentration and product titers in hIFN γ producing HEK293 cells: induced metabolic shift for concomitant consumption of glucose and lactate. *Journal Of Biotechnology*, [S.L.], v. 287, p. 68-73, dez. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.10.005>.
- ROSENBERG, E.; DORABAWILA, V.; EASTON, D.; BAUER, U.; KUMAR, J.; HOEN, R.; HOEFER, D.; WU, M.; LUTTERLOH, E.; CONROY, M. Covid-19 Vaccine Effectiveness in New York State. *New England Journal Of Medicine*, [S.L.], v. 386, n. 2, p. 116-127, 13 jan. 2022. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa2116063>.
- SACHS, J.; KARIM, S.; AKNIN, L.; ALLEN, J.; BROSBØL, K.; COLOMBO, F.; BARRON, G.; ESPINOSA, M.; GASPAR, V.; GAVIRIA, A. The Lancet Commission on lessons for the future from the COVID-19 pandemic. *The Lancet*, [S.L.], v. 400, n. 10359, p. 1224-1280, out. 2022. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(22\)01585-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(22)01585-9).
- SAGONOWSKY, E. Pfizer expects higher COVID-19 vaccine prices and yearly boosters, CFO says. And that means big sales long-term. Estados Unidos. 2021. Disponível em: <https://www.fiercepharma.com/pharma/pfizer-sees-need-for-annual-revaccinations-and-rationale-for-higher-prices-after-pandemic#:~:text=Pharma-,Pfizer%20expects%20higher%20COVID%2D19%20vaccine%20prices%20and%20y,early%20boosters,means%20big%20sales%20long%2Dterm&text=Pfizer%20made%20headlines%20last%20month,prices%20after%20the%20pandemic%20waned..> Acesso em: 15 jan. 2023.
- SANDBRINK, J.; SHATTOCK, R. RNA Vaccines: a suitable platform for tackling emerging pandemics?. *Frontiers In Immunology*, [S.L.], v. 11, 22 dez. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2020.608460>.
- SARTORI, R.; LEME, J.; CARICATI, C.; TONSO, A.; NÖÑEZ, E. Model Comparison To Describe Bhk-21 Cell Growth And Metabolism In Stirred Tank Bioreactors Operated In Batch Mode. *Brazilian Journal Of Chemical Engineering*, [S.L.], v. 35, n. 2, p. 441-458, jun. 2018. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0104-6632.20180352s20160592>.
- SHAJAHAN, A.; PEPI, L.; KUMAR, B.; MURRAY, N.; AZADI, P. Site specific N- and O-glycosylation mapping of the spike proteins of SARS-CoV-2 variants of concern. *Scientific Reports*, [S.L.], v. 13, n. 1, 21 jun. 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-023-33088-0>.
- SHEARER, F.; MOYES, C.; PIGOTT, D.; BRADY, O.; MARINHO, F.; DESHPANDE, A.; LONGBOTTOM, J.; BROWNE, A.; KRAEMER, M.; O'REILLY, K. Global yellow fever vaccination coverage from 1970 to 2016: an adjusted retrospective analysis.: an adjusted retrospective analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, [s.l.], v. 17, n. 11, p. 1209-1217, nov. 2017. Elsevier BV.

[http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099\(17\)30419-x](http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099(17)30419-x).

- SILVA, L. Discurso do presidente do Brasil, Luiz Inácio Lula da Silva, no Parlatório. 2023. Disponível em: <https://lula.com.br/discurso-do-presidente-do-brasil-luiz-inacio-lula-da-silva-no-parlatorio/>. Acesso em: 02 jan. 2023.
- STUIBLE, M.; GERVAIS, C.; LORD-DUFOUR, S.; PERRET, S.; L'ABBÉ, D.; SCHRAG, J.; ST-LAURENT, G.; DUROCHER, Y. Rapid, high-yield production of full-length SARS-CoV-2 spike ectodomain by transient gene expression in CHO cells. *Journal Of Biotechnology*, [S.L.], v. 326, p. 21-27, jan. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.12.005>.
- SUVARNA V. Phase IV of Drug Development. *Perspect Clin Res*. 2010 Apr;1(2):57-60. PMID: 21829783; PMCID: PMC3148611.
- TAI, W.; HE, L.; ZHANG, X.; PU, J.; VORONIN, D.; JIANG, S.; ZHOU, Y.; DU, L. Characterization of the receptor-binding domain (RBD) of 2019 novel coronavirus: implication for development of rbd protein as a viral attachment inhibitor and vaccine. *Cellular & Molecular Immunology*, [S.L.], v. 17, n. 6, p. 613-620, 19 mar. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41423-020-0400-4>.
- THERMOFISHER SCIENTIFIC. Overview of Affinity Purification. Estados Unidos 2023. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-affinity-purification.html>. Acesso em: 01 maio 2023.
- TORRES, M.; ALTAMIRANO, C.; DICKSON, A. Process and metabolic engineering perspectives of lactate production in mammalian cell cultures. *Current Opinion in Chemical Engineering*, [S.L.], v. 22, p. 184-190, dez. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coche.2018.10.004>.
- TORRES-SAAVEDRA, P.; WINTER, K. An Overview of Phase 2 Clinical Trial Designs. *International Journal Of Radiation Oncology*Biography*Physics*, [S.L.], v. 112, n. 1, p. 22-29, jan. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijrobp.2021.07.1700>.
- UNICEF. COVID-19 Market Dashboard: an interactive tool for partners, manufacturers and countries to follow up-to-date information on the covid-19 vaccine and therapeutics market. An interactive tool for partners, manufacturers and countries to follow up-to-date information on the COVID-19 vaccine and therapeutics market. Estados Unidos. 2023. Disponível em: <https://www.unicef.org/supply/covid-19-market-dashboard>. Acesso em: 07 jan. 2023.
- UNITED NATIONS DEVELOPMENT PROGRAMME. Organização das Nações Unidas. Global Dashboard for Vaccine Equity: how accessible are vaccines globally?. How accessible are vaccines globally?. Estados Unidos. 2022. Disponível em: <https://data.undp.org/vaccine-equity/>. Acesso em: 22 dez. 2022.
- VILLADSEN, J.; NIELSEN, J.; LIDÉN, G. *Bioreaction Engineering Principles*. 3. ed. Nova Iorque: Springer, 2011. 561 p. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9688-6>.
- VON GROLL, Andrea. Lipídios Catiônicos Anfífilos Como Neutralizadores da Carga Elétrica do DNA Para Transfecção in vitro de Células Eucarióticas. 2003. 102 f.

Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

- WALLS, A.; PARK, Y.; TORTORICI, M.; WALL, A.; MCGUIRE, A.; VEESLER, D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*, [S.L.], v. 181, n. 2, p. 281-292, abr. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058>.
- WRAPP D., WANG N., CORBETT K., GOLDSMITH J., HSIEH C., ABIONA O., GRAHAM B., MCLELLAN J. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*. 2020 Mar 13;367(6483):1260-1263. doi: 10.1126/science.abb2507. Epub 2020 Feb 19. PMID: 32075877; PMCID: PMC7164637.
- YAHIA, B.; GOUREVITCH, B.; MALPHETTES, L.; HEINZLE, E. Segmented linear modeling of CHO fed-batch culture and its application to large scale production. *Biotechnology And Bioengineering*, [S.L.], v. 114, n. 4, p. 785-797, 21 nov. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.26214>.
- YAHIA, B.; MALPHETTES, L.; HEINZLE, E. Macroscopic modeling of mammalian cell growth and metabolism. *Applied Microbiology and Biotechnology*, [S.L.], v. 99, n. 17, p. 7009-7024, 22 jul. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-015-6743-6>.
- YAHIA, B.; MALPHETTES, L.; HEINZLE, E. Predictive macroscopic modeling of cell growth, metabolism and monoclonal antibody production: case study of a cho fed-batch production. *Metabolic Engineering*, [S.L.], v. 66, p. 204-216, jul. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2021.04.004>.
- YAN, R.; ZHANG, Y.; LI, Y.; XIA, L.; GUO, Y.; ZHOU, Q. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE-2. *Science*, [S.L.], v. 367, n. 6485, p. 1444-1448, 27 mar. 2020. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.abb2762>.
- YI, A. Principles and Case Studies of Fed-batch Fermentation and Continuous Fermentation. *Journal Of Clinical And Nursing Research*, [S.L.], v. 6, n. 2, p. 99-104, 15 mar. 2022. Bio-Byword Scientific Publishing, Pty. Ltd. <http://dx.doi.org/10.26689/jcnr.v6i2.3712>.
- YONG, C.; ONG, H.; YEAP, S.; HO, K.; TAN, W. Recent Advances in the Vaccine Development Against Middle East Respiratory Syndrome-Coronavirus. *Frontiers In Microbiology*, [S.L.], v. 10, 2 ago. 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2019.01781>.
- ZHANG, T.; WU, Q.; ZHANG, Z. Probable Pangolin Origin of SARS-CoV-2 Associated with the COVID-19 Outbreak. *Current Biology*, [S.L.], v. 30, n. 7, p. 1346-1351, abr. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2020.03.022>.
- ZHOU, P.; YANG, X.; WANG, X.; HU, B.; ZHANG, L.; ZHANG, W.; SI, H.; ZHU, Y.; LI, B.; HUANG, C. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of

probable bat origin. *Nature*, [S.L.], v. 579, n. 7798, p. 270-273, 3 fev. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>.

- ZHU, Na; ZHANG, Dingyu; WANG, Wenling; LI, Xingwang; YANG, Bo; SONG, Jingdong; ZHAO, Xiang; HUANG, Baoying; SHI, Weifeng; LU, Roujian. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *New England Journal Of Medicine*, [S.L.], v. 382, n. 8, p. 727-733, 20 fev. 2020. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa2001017>.

8. APÊNDICE

8.1 Anexo 1 – Visão geral de doses de vacina para COVID-19 entregues por fornecedor

País/território	Acordos bilaterais/multilaterais	Doações	COVAX	AVAT	Desconhecido	Doses totais entregues
Afeganistão	N / D	3.700.000	16.332.050	N / D	N / D	20.032.050
Albânia	1.764.852	390.975	331,8	N / D	840.677	3.328.304
Argélia	15.810.000	200	16.149.600	N / D	N / D	32.159.600
Andorra	N / D	N / D	28.74	N / D	141.064	169.804
Angola	3.040.000	1.620.000	25.008.690	921,6	217.172	30.807.462
Anguila	N / D	N / D	N / D	N / D	26.925	26.925
Antígua e Barbuda	N / D	156,39	60	38.4	N / D	254,79
Argentina	139.763.396	3.900.000	7.066.000	N / D	270.222	150.999.618
Armênia	779,62	1.624.340	386,4	N / D	189.059	2.979.419
Aruba	N / D	12.285	N / D	N / D	179.284	191.569
Austrália	81.866.410	N / D	513,63	N / D	N / D	82.380.040
Áustria	49.140.243	N / D	N / D	N / D	N / D	49.140.243
Azerbaijão	430	150	2.022.390	N / D	12.640.434	15.242.824
Bahamas	N / D	318,35	202.29	38.4	30.388	589.428
Bahrein	700	100	107,82	N / D	2.916.476	3.824.296
Bangladesh	168.114.495	35.309.610	250.300.190	N / D	N / D	453.724.295
Barbados	30	372,4	114,84	N / D	N / D	517,24
Bielorrússia	5.250.000	5.260.000	N / D	N / D	9.448.790	19.958.790
Bélgica	26.738.495	N / D	N / D	N / D	N / D	26.738.495
Belize	N / D	630,95	182,82	148,8	100	962,67
Benim	103	1.200.000	4.819.590	734,4	N / D	6.856.990
Bermudas	N / D	N / D	9.6	N / D	135.647	145.247
Butão	198,9	1.282.500	980,62	N / D	22.277	2.484.297
Bolívia (Estado Plurinacional da)	11.138.900	4.650.000	8.649.260	N / D	N / D	24.438.160
Bósnia e Herzegovina	22	2.421.840	332,64	N / D	110.02	2.886.500
Botsuana	100	280,4	1.643.040	1.346.400	238.628	3.608.468
Brasil	607.679.160	5.216.600	13.881.600	N / D	106.311	626.883.671
Ilhas Virgens Britânicas	N / D	N / D	N / D	N / D	45,6	45,6
Brunei Darussalam	351.09	352	100,8	N / D	607.842	1.411.732
Bulgária	14.434.990	N / D	N / D	N / D	N / D	14.434.990
Burkina Faso	N / D	1.000.000	7.101.880	756	N / D	8.857.880
Burundi	N / D	500	N / D	302.4	N / D	802.4
Cabo Verde	N / D	584,15	548,24	N / D	N / D	1.132.390
Camboja	24.510.000	18.735.800	5.926.490	N / D	528,31	49.700.600
Camarões	N / D	200	1.577.510	4.089.600	N / D	5.867.110
Canadá	103.516.198	1.000.000	972	N / D	5.670.808	111.159.006
Ilhas Cayman	N / D	59,6	N / D	N / D	105,54	165,14
República	N / D	150	2.973.080	453,6	6.554	3.583.234

País/território	Acordos bilaterais/multilaterais	Doações	COVAX	AVAT	Desconhecido	Doses totais entregues
Centro-Africana						
Chade	N / D	200	8.730.460	2.116.800	N / D	11.047.260
Chile	68.095.259	N / D	2.307.800	N / D	N / D	70.403.059
China	11.5	5.000.000	N / D	N / D	3.824.199.600	3.829.211.100
China, RAE de Hong Kong	23.144.000	N / D	N / D	N / D	54.17	23.198.170
China, RAE de Macau	200	N / D	N / D	N / D	1.767.886	1.967.886
Colômbia	106.759.582	8.016.000	30.131.880	N / D	N / D	144.907.462
Comores	N / D	400	250,38	N / D	301.757	952.137
Congo (RDC)	20	2.580.000	13.723.750	15.783.800	N / D	32.107.550
Ilhas Cook	N / D	N / D	N / D	N / D	44,86	44,86
Costa Rica	10.009.865	2.139.130	2.559.930	N / D	328.322	15.037.247
Costa do Marfim	1.000.000	375	20.668.910	3.000.000	1.326.094	26.370.004
Croácia	9.760.010	N / D	N / D	N / D	N / D	9.760.010
Cuba	N / D	N / D	N / D	N / D	47.022.054	47.022.054
Chipre	2.914.583	196	N / D	N / D	N / D	3.110.583
Tcheca	35.148.920	135,62	N / D	N / D	N / D	35.284.540
Dinamarca	14.164.552	N / D	N / D	N / D	N / D	14.164.552
Djibuti	100	1.500.000	458,88	N / D	N / D	2.058.880
Dominica	N / D	122.2	118,96	N / D	N / D	241.16
República Dominicana	14.718.050	80	463.2	N / D	2.530.229	17.791.479
Equador	41.198.796	9.168.470	6.083.250	N / D	N / D	56.450.516
Egito	15.335.000	16.137.240	69.127.560	4.567.200	13.152.937	118.319.937
El Salvador	8.528.950	850,8	4.089.250	N / D	30.868	13.499.868
Guiné Equatorial	N / D	300	60	N / D	227,99	587,99
Estônia	4.495.270	N / D	N / D	N / D	N / D	4.495.270
Em Swat	N / D	44.07	596.04	N / D	264.828	904.938
Etiópia	N / D	13.900.000	50.860.610	8.536.800	N / D	73.297.410
Fiji	N / D	1.249.500	569,48	N / D	538	1.819.518
Finlândia	20.286.315	N / D	N / D	N / D	N / D	20.286.315
França	237.345.530	N / D	N / D	N / D	N / D	237.345.530
Polinésia Francesa	N / D	N / D	N / D	N / D	546.888	546.888
Gabão	N / D	770	688,83	698,4	N / D	2.157.230
Gâmbia	N / D	130,6	729.09	204	22.403	1.086.093
Geórgia	2.628.000	809,57	160.02	N / D	N / D	3.597.590
Alemanha	239.442.721	N / D	N / D	N / D	N / D	239.442.721
Gana	23	3.010.000	23.255.550	5.865.600	210.533	32.364.683
Gibraltar	5	N / D	N / D	N / D	141.095	146.095
Grécia	29.529.860	N / D	N / D	N / D	N / D	29.529.860
Groenlândia	N / D	N / D	N / D	N / D	87.713	87.713
Granada	N / D	91.1	129,51	N / D	8.092	228.702
Guatemala	5.068.400	10.652.000	6.541.300	N / D	251.396	22.513.096

País/território	Acordos bilaterais/ multilaterais	Doações	COVAX	AVAT	Desconhecido	Doses totais entregues
Guiné	380	418	8.790.570	108	430,42	10.126.990
Guiné-Bissau	N / D	522,07	597,6	324	N / D	1.443.670
Guiana	410.537	427,65	410,76	31,2	N / D	1.280.147
Haiti	N / D	N / D	1.124.700	N / D	N / D	1.124.700
Honduras	6.133.480	588,1	8.155.110	N / D	3.591.018	18.467.708
Hong Kong SAR e Macau	1.343.000	N / D	N / D	N / D	N / D	1.343.000
Tampão Humanitário	N / D	N / D	2.451.600	N / D	N / D	2.451.600
Hungria	33.126.296	N / D	N / D	N / D	N / D	33.126.296
Islândia	1.596.290	N / D	N / D	N / D	N / D	1.596.290
Índia	1.165.176.072	N / D	240.000.000	N / D	1.016.157.500	2.421.333.572
Indonésia	231.546.640	20.825.330	110.399.350	N / D	125.386.635	488.157.955
Irã (Republic Islâmica do Irã)	109.200.600	12.065.420	16.006.810	N / D	32.977.549	170.250.379
Iraque	4.130.950	750	9.348.720	N / D	7.278.611	21.508.281
Irlanda	16.347.750	N / D	N / D	N / D	N / D	16.347.750
Israel	9.120.000	N / D	N / D	N / D	11.352.133	20.472.133
Itália	156.623.565	N / D	N / D	N / D	N / D	156.623.565
Jamaica	100	1.617.760	1.852.870	216	650	3.787.280
Japão	381.409.678	N / D	N / D	N / D	N / D	381.409.678
Jordânia	1.150.000	1.200.000	477,75	N / D	8.236.022	11.063.772
Cazaquistão	7.547.760	360	N / D	N / D	15.312.789	23.220.549
Quênia	N / D	5.459.500	25.620.360	1.804.800	150.705	33.035.365
Kiribati	N / D	103	189,5	N / D	N / D	292,5
Kosovo	N / D	197,58	1.473.510	N / D	1.017.627	2.688.717
Kuwait	738	N / D	35,1	N / D	8.307.826	9.080.926
Quirguistão	2.470.000	2.270.200	1.629.420	N / D	4.051	6.373.671
República Democrática Popular do Laos	N / D	11.388.740	6.858.360	N / D	N / D	18.247.100
Letônia	5.194.335	201,24	N / D	N / D	N / D	5.395.575
Líbano	672,35	1.924.190	1.626.390	N / D	2.173.239	6.396.169
Lesoto	N / D	263,34	1.249.200	1.000.800	N / D	2.513.340
Libéria	N / D	27	4.036.200	780	63.535	4.906.735
Líbia	3.360.000	1.031.250	2.414.070	N / D	N / D	6.805.320
Liechtenstein	135,6	N / D	N / D	N / D	N / D	135,6
Lituânia	9.288.558	N / D	N / D	N / D	N / D	9.288.558
Luxemburgo	2.608.340	N / D	N / D	N / D	N / D	2.608.340
Madagáscar	N / D	300	5.155.280	1.927.200	N / D	7.382.480
Malauí	N / D	152	7.738.550	1.893.600	N / D	9.784.150
Malásia	78.620.909	6.415.000	1.387.200	N / D	N / D	86.423.109
Maldivas	100	400	882,64	N / D	132,2	1.514.840
Eles tinham	N / D	1.900.000	4.319.050	N / D	N / D	6.219.050
Malta	1.411.704	N / D	N / D	N / D	N / D	1.411.704
Mauritânia	N / D	1.335.000	4.037.670	352,8	307.939	6.033.409

País/território	Acordos bilaterais/multilaterais	Doações	COVAX	AVAT	Desconhecido	Doses totais entregues
maurício	420	405	488.07	439.2	1.121.733	2.874.003
México	223.083.785	16.986.900	34.618.440	N / D	N / D	274.689.125
Mônaco	10	N / D	N / D	N / D	61.655	71.655
Mongólia	3.026.060	450	1.629.660	N / D	1.240.868	6.346.588
Montenegro	451.2	560	48	N / D	N / D	1.059.200
Montserrat	N / D	N / D	N / D	N / D	5.082	5.082
Marrocos	27.507.000	458	5.789.580	N / D	27.138.674	60.893.254
Moçambique	1.500.000	2.357.200	31.435.440	4.285.500	569.506	40.147.646
Mianmar	36.400.000	23.036.000	2.242.800	N / D	9.544.322	71.223.122
Namíbia	250	581,6	574,5	650,4	N / D	2.056.500
Nauru	N / D	22.85	20.07	N / D	3.356	46.276
Nepal	2.800.000	9.142.000	41.814.790	N / D	12.766.327	66.523.117
Holanda	52.981.426	N / D	N / D	N / D	N / D	52.981.426
Nova Caledônia	N / D	N / D	N / D	N / D	525.939	525.939
Nova Zelândia	1.628.000	N / D	100,62	N / D	11.888.352	13.616.972
Nicarágua	1.200.000	1.650.000	6.465.470	N / D	4.792.378	14.107.848
Níger	N / D	625	8.112.660	N / D	N / D	8.737.660
Nigéria	N / D	1.004.800	90.567.730	47.441.000	N / D	139.013.530
Niue	N / D	N / D	N / D	N / D	5.413	5.413
Macedônia do Norte	734.08	569,44	552,42	N / D	379.641	2.235.581
Noruega	21.906.035	N / D	N / D	N / D	N / D	21.906.035
Meu próprio	252,6	200	529,86	N / D	6.812.195	7.794.655
Paquistão	125.465.439	3.220.000	129.951.550	N / D	90.151.987	348.788.976
Palau	N / D	6.2	N / D	N / D	N / D	6.2
Panamá	7.579.728	503.1	484,32	N / D	1.205.273	9.772.421
Papua Nova Guiné	N / D	218,48	1.105.200	N / D	12.896	1.336.576
Paraguai	2.643.570	3.382.000	2.437.170	N / D	2.194.868	10.657.608
Peru	50.325.173	3.035.100	8.261.670	N / D	33.756.698	95.378.641
Filipinas	145.397.420	31.715.850	74.228.930	N / D	N / D	251.342.200
Polônia	105.449.730	N / D	N / D	N / D	N / D	105.449.730
Portugal	35.536.190	N / D	N / D	N / D	N / D	35.536.190
Catar	N / D	N / D	122.4	N / D	8.239.106	8.361.506
República da Coreia	166.786.030	1.413.000	2.516.580	N / D	6.419.930	177.135.540
República da Moldávia	455,68	956,72	1.087.200	N / D	7.566	2.507.166
Romênia	26.901.835	N / D	N / D	N / D	N / D	26.901.835
Federação Russa	N / D	N / D	N / D	N / D	202.283.641	202.283.641
Ruanda	4.000.000	3.582.690	18.050.180	561,6	5.033.654	31.228.124
Santa Helena	N / D	N / D	N / D	N / D	8.682	8.682
São Cristóvão e Nevis	N / D	43	21.6	N / D	6.127	70.727
Santa Lúcia	N / D	111,65	207.27	N / D	N / D	318,92
São Vicente e Granadinas	N / D	145.1	137,76	N / D	N / D	282,86
Samoa	N / D	50	260,83	N / D	268.624	579.454

País/território	Acordos bilaterais/ multilaterais	Doações	COVAX	AVAT	Desconhecido	Doses totais entregues
San Marino	14h38	N / D	N / D	N / D	64.772	79.152
São Tomé e Príncipe	N / D	86	237.12	79.2	22.721	425.041
Arábia Saudita	3.500.000	N / D	1.772.430	N / D	69.690.818	74.963.248
Senegal	200	325	5.325.180	460,8	407.446	6.718.426
Sérvia	5.983.650	463,27	797,28	N / D	2.143.957	9.388.157
Seychelles	N / D	126	124,26	N / D	46.923	297.183
Serra Leoa	N / D	610	4.838.910	2.054.400	N / D	7.503.310
Cingapura	301	N / D	1.244.400	N / D	14.758.143	16.303.543
Eslováquia	10.975.770	15	N / D	N / D	N / D	10.990.770
Eslovênia	6.909.990	N / D	N / D	N / D	N / D	6.909.990
Ilhas Salomão	N / D	350,8	406.61	N / D	N / D	757,41
Somália	N / D	1.140.400	10.620.140	N / D	N / D	11.760.540
África do Sul	11.020.720	N / D	9.269.910	N / D	21.565.043	41.855.673
Sudão do Sul	N / D	59	3.481.370	2.500.800	N / D	6.041.170
Espanha	197.799.059	N / D	N / D	N / D	N / D	197.799.059
Sri Lanka	18.312.650	3.500.000	5.128.210	N / D	17.187.389	44.128.249
Sudão	N / D	529.2	20.922.440	3.076.800	N / D	24.528.440
Suriname	N / D	668,2	144	N / D	3.495	815.695
Suécia	43.609.575	N / D	N / D	N / D	N / D	43.609.575
Suíça	18.549.597	N / D	N / D	N / D	N / D	18.549.597
República Árabe da Síria	N / D	2.055.000	11.478.540	N / D	N / D	13.533.540
Taiwan	39.907.640	24.299.000	2.028.000	N / D	8.047.261	74.281.901
Tadjiquistão	N / D	540	12.581.680	N / D	7.636.597	20.758.277
tailândia	52.781.250	11.029.490	N / D	N / D	96.087.776	159.898.516
República do Congo	163	400	1.882.710	523.2	N / D	2.968.910
Timor lido	N / D	412	604,83	N / D	1.158.573	2.175.403
Ir	N / D	867,4	3.977.000	1.651.200	N / D	6.495.600
Toquelau	N / D	720	N / D	N / D	5.192	5.912
Chegado	N / D	50,6	88,8	N / D	89.12	228,52
Trindade e Tobago	1.000.000	944.08	184,8	259.2	N / D	2.388.080
Tunísia	720.048	7.188.200	5.681.370	1.036.800	2.971.956	17.598.374
Peru	29.500.000	N / D	N / D	N / D	138.297.676	167.797.676
Turquemenistão	1.100.000	N / D	N / D	N / D	13.765.400	14.865.400
Ilhas Turcas e Caicos	N / D	N / D	N / D	N / D	80.121	80.121
Tuvalu	N / D	7	18.96	N / D	11h55	37.51
Uganda	N / D	6.589.400	42.249.820	8.980.800	N / D	57.820.020
Ucrânia	38.035.832	3.342.200	13.031.990	N / D	N / D	54.410.022
Emirados Árabes Unidos	3.200.000	N / D	N / D	N / D	24.214.261	27.414.261
Reino Unido da Grã-Bretanha e Irlanda do Norte	173.759.700	N / D	539,37	N / D	42.404.730	216.703.800
República Unida da	N / D	5.500.000	41.799.270	N / D	N / D	47.299.270

País/território	Acordos bilaterais/ multilaterais	Doações	COVAX	AVAT	Desconhecido	Doses totais entregues
Tanzânia						
Estados Unidos da América	930.506.125	N / D	N / D	N / D	N / D	930.506.125
Uruguai	8.291.682	500	148,8	N / D	775.358	9.715.840
Uzbequistão	39.849.503	652	25.450.450	N / D	16.091.386	82.043.339
Vanuatu	N / D	330	141,55	N / D	N / D	471,55
Venezuela (República Bolivariana da)	15.131.000	500	16.756.800	N / D	14.882.744	47.270.544
Vietnã	30.418.930	39.563.360	70.443.870	N / D	151.199.541	291.625.701
Wallis e Futuna	N / D	N / D	N / D	N / D	19.755	19.755
Cisjordânia e Gaza	693	2.173.700	2.063.450	N / D	1.407.450	6.337.600
Iémen	N / D	80	2.516.000	N / D	N / D	2.596.000
Zâmbia	N / D	1.150.000	17.146.660	2.068.800	N / D	20.365.460
Zimbábue	8.800.000	5.200.000	3.990.000	N / D	21.01	18.011.010

Fonte: Adaptado de UNICEF, 2023

8.2 Anexo 2 – Visão geral das vacinas candidatas/produzidas para COVID-19 por plataforma, estágio clínico, desenvolvedor e país

Desenvolvedor da vacina	País/território	Vacina/candidato	Vacina	Plataforma	Estágio de desenvolvimento
Vacinas AJ	Dinamarca	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
CONICET	Argentina	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
Universidade de Queensland	Austrália	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
Universidade de San Martín	Argentina	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
VIDO-InterVac/Universidade de Saskatchewan	Canadá/Canadá	VIDO Intervac - COVAC-2	COVID-19	Subunidade de proteína	Fase II
Universidade de Sydney/Bharat Biotech/ExcellGene	Austrália/Índia/Suíça	N / D	Covid-19 Multivariante	Subunidade de proteína	Descoberta
Bharat Biotech/Universidade de Wisconsin Madison/FluGen	Índia/Estados Unidos da América/Estados Unidos da América	N / D	COVID-19	Replicando o vetor viral	pré-clínico
Griffith University/Olymvax Biopharmaceuticals	Austrália/China	N / D	COVID-19	Desconhecido	Descoberta
vaxart	Estados Unidos da América	VXA-CoV2-1	COVID-19	Vetor viral não replicante	Fase II
Vaxil Bioterapêutica	Canadá	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
Vaxas	Austrália	VXS-1223	COVID-19	Subunidade de proteína	Fase I
Instituto Peter Doherty	Austrália	N / D	COVID-19	Partícula semelhante a vírus	pré-clínico
Conselho Nacional de Pesquisa do Canadá/VBI Vacinas	Canadá/Estados Unidos da América	VBI-2902	COVID-19	Partícula semelhante a vírus	Fase I/II

Desenvolvedor da vacina	País/território	Vacina/candidato	Vacina	Plataforma	Estágio de desenvolvimento
Universidade de Melbourne	Austrália	MIPSCo-mRNA-RBD-1	COVID-19	mRNA	Fase I
Viravaxx	Áustria	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	Descoberta
Instituto de Pesquisa do Exército Walter Reed	Estados Unidos da América	SpFN	COVID-19	Subunidade de proteína	Fase I
Instituto Monash de Ciências Farmacêuticas	Austrália	N / D	COVID-19	mRNA	pré-clínico
Xiamen Innovax/GSK	China/Reino Unido da Grã-Bretanha e Irlanda do Norte	XWG-03	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
EnGeneIC	Austrália	N / D	COVID-19	Desconhecido	Fase I
Griffith University/Indian Immunologicals	Austrália/Índia	N / D	COVID-19	Vivo atenuado	pré-clínico
Universidade de Melbourne	Austrália	DoCo-Pro-RBD-1 + MF59®	COVID-19	Subunidade de proteína	Fase I
Saudi Vax/King Abdulaziz University	Arábia Saudita/Arábia Saudita	N / D	COVID-19	Desconhecido	Descoberta
MedUni	Áustria	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
Universidade de Waterloo	Canadá	N / D	COVID-19	DNA	pré-clínico
NIBIOHN/Universidade de Osaka/BIKEN	Japão/Japão/Japão	N / D	COVID-19	inativado	pré-clínico
Globo Biotech Limitada	Bangladesh	N / D	COVID-19	mRNA	pré-clínico
DZIF - Centro Alemão de Pesquisa de Infecções/IDT Biologika	Alemanha/Alemanha	N / D	COVID-19	Vetor viral não replicante	Fase I
Globo Biotech Limitada	Bangladesh	N / D	COVID-19	Vetor viral não replicante	pré-clínico

Desenvolvedor da vacina	País/território	Vacina/candidato	Vacina	Plataforma	Estágio de desenvolvimento
Centro Nacional Biotecnologia (CNB-CSIC)	Espanha	N / D	COVID-19	Vetor viral não replicante	pré-clínico
Globo Biotech Limitada	Bangladesh	N / D	COVID-19	DNA	pré-clínico
BioNet- Asia	tailândia	COVIGEN	COVID-19	DNA	Fase I
KU Leuven	Bélgica	N / D	COVID-19	Replicando o vetor viral	pré-clínico
Universidade de Manitoba	Canadá	N / D	COVID-19	Partícula semelhante a vírus	pré-clínico
Imunoterapias com eTheRNA/Univercells/Afrigen	Bélgica/Bélgica/África do Sul	N / D	COVID-19	mRNA	pré-clínico
Institutos Nacionais de Inovação Biomédica/Universidade de Osaka/BIKEN	Japão/Japão/Japão	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
Ziphius Terapêutica	Bélgica	CEP-1642	COVID-19	mRNA	pré-clínico
Universidade da Geórgia/EpiVax	Estados Unidos da América/Estados Unidos da América	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
MyNeo	Bélgica	N / D	Covid-19 Multivariante	Subunidade de proteína	pré-clínico
Heat Biologics/Universidade de Miami	Estados Unidos da América/Estados Unidos da América	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
Univercells/LEUKOCARE/ReiThera	Bélgica/Alemanha/Itália	GRAd-COV2	COVID-19	Vetor viral não replicante	Fase II/III
OncoGen	Romênia	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
Instituto Butantan	Brasil	N / D	COVID-19	Partícula semelhante a	pré-clínico

Desenvolvedor da vacina	País/território	Vacina/candidato	Vacina	Plataforma	Estágio de desenvolvimento
				vírus	
Instituto do Coração/Faculty of Medicine, University of São Paulo	Brasil/Brasil	N / D	COVID-19	Partícula semelhante a vírus	pré-clínico
Universidade do Oeste de Ontário	Canadá	N / D	COVID-19	Replicando o vetor viral	pré-clínico
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo	Brasil	Vacina de proteína recombinante	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
Universidade Federal do Paraná	Brasil	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
IEM/BIOCAD	Federação Russa/Federação Russa	N / D	COVID-19	Replicando o vetor viral	pré-clínico
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo	Brasil	N / D	COVID-19	DNA	pré-clínico
Saiba	Suíça	N / D	COVID-19	Partícula semelhante a vírus	pré-clínico
Federal University of Rio de Janeiro	Brasil	N / D	COVID-19	mRNA	pré-clínico
Instituto Butantan	Brasil	N / D	COVID-19	Vesícula de membrana externa	pré-clínico
Bio-Manguinhos/Fundação Oswaldo Cruz	Brasil/Brasil	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
Mynvax/Instituto Indiano de Ciências	indiano/indiano	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo	Brasil	N / D	COVID-19	Replicando o vetor viral	pré-clínico

Desenvolvedor da vacina	País/território	Vacina/candidato	Vacina	Plataforma	Estágio de desenvolvimento
Bio Farma/Instituto Eijkman	indonésio/indonésio	Vacina vermelha e branca	COVID-19	inativado	Fase III
Farmacore Biotecnologia	Brasil	convocado	COVID-19	Subunidade de proteína	Fase I/II
Hester Biosciences/Instituto Indiano de Tecnologia Guwahati	indiano/indiano	N / D	COVID-19	Replicando o vetor viral	Descoberta
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo	Brasil	Vacina de nanopartículas	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
Monte Sinai/Universidade de Montana	Estados Unidos da América/Estados Unidos da América	N / D	COVID-19	Desconhecido	pré-clínico
Federal University of Viçosa	Brasil	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
Universidade de Pittsburgh	Estados Unidos da América	PittCoVacc	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Vacinas/Instituto René Rachou	Brasil/Brasil	N / D	COVID-19	Replicando o vetor viral	pré-clínico
Boryung	República da Coreia	N / D	COVID-19	Desconhecido	Descoberta
Instituto Butantan	Brasil	ButanVac	COVID-19	Subunidade de proteína	Fase II/III
Bioprocessamento de Kentucky	Estados Unidos da América	KPB - KBP-COVID-19	COVID-19	Subunidade de proteína	Fase I/II
Federal University of Minas Gerais	Brasil	N / D	COVID-19	DNA	pré-clínico
UMN Pharma (Shionogi)	Japão	Shionogi - Recombinante	COVID-19	Subunidade de proteína	Fase III

Desenvolvedor da vacina	País/território	Vacina/candidato	Vacina	Plataforma	Estágio de desenvolvimento
Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo	Brasil	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
CHU de Quebec	Canadá	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	Descoberta
Universidade McMaster	Canadá	Ad5-triCoV-Mac/ChAd-triCoV-Mac	COVID-19	Vetor viral não replicante	Fase I
Universidade de Ottawa	Canadá	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	Descoberta
Mediphage Bioceuticals	Canadá	N / D	COVID-19	DNA	Descoberta
Universidade Laval	Canadá	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
Universidade de Alberta	Canadá	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
BioVaxis	Canadá	BVX-0320	COVID-19	Desconhecido	pré-clínico
ARTES Biotecnologia	Alemanha	N / D	COVID-19	Partícula semelhante a vírus	pré-clínico
Precision NanoSystems/Tianjin CanSino	Canadá/China	Vacina mRNA	COVID-19	mRNA	Fase II
AveXis/Mass General Brigham/Massachusetts Eye and Ear	Estados Unidos da América/Estados Unidos da América/Estados Unidos da América	AAVCOVID	COVID-19	Vetor viral não replicante	pré-clínico
Universidade de Tóquio/Daiichi Sankyo	Japão/Japão	DS-5670	COVID-19	mRNA	Fase II/III
Aegis Life/Entos Pharmaceuticals	Canadá/Canadá	Covigenix VAX-001	COVID-19	DNA	Fase II
Vacina Eyam e Imunoterapêutica	Canadá	N / D	COVID-19	mRNA	pré-clínico

Desenvolvedor da vacina	País/território	Vacina/candidato	Vacina	Plataforma	Estágio de desenvolvimento
Scancell	Reino Unido da Grã-Bretanha e Irlanda do Norte	SCOV1/SCOV2	COVID-19	DNA	Fase I
Imunoprecise/Litevax	Canadá/Holanda	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
Sinovac/Dynavax	China/Estados Unidos da América	N / D	COVID-19	inativado	pré-clínico
NantKwest/ImmunityBio	Estados Unidos da América/Estados Unidos da América	hAd5-S-Fusion+N-ETSD	COVID-19	Vetor viral não replicante	Fase II
IMV	Canadá	DPX-COVID-19	COVID-19	Subunidade de proteína	Fase I
Valo Terapêutica	Finlândia	N / D	COVID-19	Vetor viral não replicante	pré-clínico
FBRI SRC VB VECTOR, Rospotrebnadzor, Koltsovo	Federação Russa	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
Tecnologia AnyGo	China	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
Yisheng Biopharma	China	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	Fase II/III
Universidade de Manitoba	Canadá	N / D	COVID-19	Vetor viral não replicante	Descoberta
Universidade da Califórnia - San Diego	Estados Unidos da América	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
Generex/EpiVax	Canadá/Estados Unidos da América	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
Zydus Cadila	Índia	N / D	COVID-19	Replicando o vetor viral	pré-clínico
VIDO-InterVac/ZYUS Ciências da Vida	Canadá/Canadá	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	Descoberta
FBRI SRC VB VECTOR, Rospotrebnadzor, Koltsovo	Federação Russa	VETOR-MV	COVID-19	Replicando o vetor viral	pré-clínico

Desenvolvedor da vacina	País/território	Vacina/candidato	Vacina	Plataforma	Estágio de desenvolvimento
DZIF - Centro Alemão de Pesquisa de Infecções	Alemanha	N / D	COVID-19	Replicando o vetor viral	pré-clínico
Terapêutica de Defesa	Canadá	AccuVAC-IN002	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
FBRI SRC VB VECTOR, Rospotrebnadzor, Koltsovo	Federação Russa	N / D	COVID-19	Replicando o vetor viral	pré-clínico
Universidade Shanghai JiaoTong/RNACure Biopharma/Universidade Fudan	China/China/China	S-RBD	COVID-19	mRNA	pré-clínico
Symvivo	Canadá	N / D	COVID-19	DNA	Fase I
Centro Nacional Biotecnologia (CNB-CSIC)	Espanha	N / D	COVID-19	mRNA	pré-clínico
Providência Terapêutica RNAImune	Canadá Estados Unidos da América	PTX-COVID19-B N / D	COVID-19 COVID-19	mRNA mRNA	Fase II pré-clínico
BioVaxys/Universidade Estadual de Ohio	Canadá/Estados Unidos da América	BVX-0320	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
FBRI SRC VB VECTOR, Rospotrebnadzor, Koltsovo	Federação Russa	N / D	COVID-19	mRNA	pré-clínico
Tianjin Can Sino	China	N / D	COVID-19	Vetor viral não replicante	Fase II
GeneOne LifeScience	República da Coreia	GeneOne - GLS-5310	COVID-19	DNA	Fase I/II
Shenzhen Genius Biotech	China	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	Descoberta
Sinovac	China	N / D	Covid-19 (P.1)	inativado	pré-clínico
OSIVAX	França	N / D	COVID-19	Partícula semelhante a vírus	pré-clínico
Jiangsu RecBio	China	RH109	COVID-19	mRNA	Fase I

Desenvolvedor da vacina	País/território	Vacina/candidato	Vacina	Plataforma	Estágio de desenvolvimento
expressão	Dinamarca	ABNCoV2	COVID-19	Partícula semelhante a vírus	Fase I/II
Sinovac	China	N / D	Covid-19 (Ômicron)	inativado	Fase I
Instituto Indiano de Tecnologia - Kanpur	Índia	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	Descoberta
Xangai Zerun Biotecnologia	China	N / D	Covid-19 Multivariante	Subunidade de proteína	pré-clínico
Instituto Indiano de Tecnologia - Kanpur	Índia	N / D	COVID-19	Replicando o vetor viral	Descoberta
Universidade de Sichuan/Hospital da China Ocidental	China/China	Sichuan Univ - Recombinante	COVID-19	Subunidade de proteína	Fase III
HDT bio	Estados Unidos da América	HDT-301	COVID-19	mRNA	Fase I/II
Clover Biofarmacêuticos/Dynavax	China/Estados Unidos da América	Trevo - SCB-2019	COVID-19	Subunidade de proteína	Fase II/III
Jiangsu RecBio	China	R520A	Covid-19 (Ômicron)	mRNA	Fase I
Suzhou Abogen/Walvax	China/China	ARCoV	COVID-19	mRNA	Fase III
Instituto de Biotecnologia Aplicada Inc.	Estados Unidos da América	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
Instituto de Biotecnologia/Academia de Ciências Médicas Militares/PLA da China	China/China/China	N / D	COVID-19	Vetor viral não replicante	Fase I
Suzhou Abogen	China	ABO1009-DP	Covid-19 (Ômicron)	mRNA	Fase I
Universidade de Tel Aviv/Neovii	Israel/Suíça	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico

Desenvolvedor da vacina	País/território	Vacina/candidato	Vacina	Plataforma	Estágio de desenvolvimento
Biológica de Pequim WANTAI/Universidade de Hong Kong/Universidade de Xiamen	China/China/China	Pequim Wantai - Del-NS1-2019-nCOV	COVID-19	Replicando o vetor viral	Fase III
Intravacc/EpiVax	Holanda/Estados Unidos da América	Peptídeo OMV	COVID-19	Vesícula de membrana externa	pré-clínico
Intravacc/Universidade de Utrecht/Wageningen Pesquisa Bioveterinária	Holanda/Holanda/Holanda	N / D	COVID-19	Replicando o vetor viral	pré-clínico
Instituto de Produtos Biológicos de Pequim (CNBG)	China	Variante BIBP-Ômicron	Covid-19 (Ômicron)	inativado	Fase III
Universidade de Lancaster	Reino Unido da Grã-Bretanha e Irlanda do Norte	N / D	COVID-19	Replicando o vetor viral	pré-clínico
Instituto Médico GenoImmune de Shenzhen	China	Shenzhen - LV-SMENP-DC	COVID-19	Vetor viral não replicante	Fase I/II
Greenlight Biociências	Estados Unidos da América	N / D	COVID-19	mRNA	pré-clínico
Instituto Wuhan de Produtos Biológicos (CNBG)	China	Variante WIBP-Ômicron	Covid-19 (Ômicron)	inativado	Fase I
Biofarmacêuticos Olymvax	China	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	Descoberta
LakePharma	Estados Unidos da América	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
Instituto Quadram	Reino Unido da Grã-Bretanha e Irlanda do Norte	N / D	COVID-19	Vesícula de membrana externa	pré-clínico
BiOMVis	Itália	N / D	COVID-19	Vesícula de membrana externa	pré-clínico

Desenvolvedor da vacina	País/território	Vacina/candidato	Vacina	Plataforma	Estágio de desenvolvimento
Chengdu Kanghua Produtos Biológicos	China	N / D	COVID-19	Vetor viral não replicante	pré-clínico
FBRI SRC VB VECTOR, Rospotrebnadzor, Koltsovo	Federação Russa	VETOR-VSV	COVID-19	Replicando o vetor viral	pré-clínico
Epivax/Intravacc	Holanda/Holanda	Subunidade OMV	COVID-19	Vesícula de membrana externa	pré-clínico
Universidade de Pequim	China	circRNA	COVID-19	mRNA	pré-clínico
Vacina AIM	China	N / D	Covid-19 (B.1.617.2)	inativado	pré-clínico
Universidade de CaroGen/Yale	Estados Unidos da América/Estados Unidos da América	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	Descoberta
Instituto Nacional de Vacinas e Soros	China	NVSI-06-08	COVID-19	Subunidade de proteína	Fase I/II
Universidade de Yale	Estados Unidos da América	N / D	COVID-19	Replicando o vetor viral	Descoberta
Abnova	Taiwan	N / D	COVID-19	mRNA	pré-clínico
Xangai Zerun Biotecnologia	China	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	Fase I/II
sinocelltech	China	SCTV01C	Covid-19 Multivariante	Subunidade de proteína	Fase II/III
RNACure Biopharma/Shanghai JiaoTong University/Fudan University	China/China/China	VLP	COVID-19	mRNA	pré-clínico
Sinovac	China	N / D	Covid-19 (B.1.617.2)	inativado	pré-clínico
Lomonosov Universidade Estadual de Moscou	Federação Russa	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
Imprensa Biotech/Akers Biosciences	Índia/Estados Unidos da América	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico

Desenvolvedor da vacina	País/território	Vacina/candidato	Vacina	Plataforma	Estágio de desenvolvimento
Cantão RiboBio	China	N / D	COVID-19	mRNA	pré-clínico
Quimera Bio	Estados Unidos da América	CB-106	COVID-19	mRNA	pré-clínico
IDIBAPS- Clínica Hospitalar	Espanha	N / D	COVID-19	Vetor viral não replicante	pré-clínico
Instituto de Produtos Biológicos de Pequim (CNBG)	China	NVSI-06-08	Covid-19 Multivariante	inativado	Fase II
GPO/Universidade Chulalongkorn	Tailândia/Tailândia	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
StemiRNA Therapeutics/Tongji University	China/China	mRNACOVID-19	COVID-19	mRNA	Fase I
IDIBAPS- Clínica Hospitalar	Espanha	N / D	COVID-19	mRNA	pré-clínico
Pequim CC-Pharming/iBio	China/Estados Unidos da América	IBIO-200	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
Universidade GPO/Mahidol	Tailândia/Tailândia	N / D	COVID-19	Partícula semelhante a vírus	pré-clínico
Navarrabiomed	Espanha	N / D	COVID-19	Partícula semelhante a vírus	pré-clínico
sinocelltech	China	SCTV01E	Covid-19 Multivariante	Subunidade de proteína	Fase III
Codiak BioSciences/Ragon Institute	Estados Unidos da América/Estados Unidos da América	N / D	Covid-19 Multivariante	Desconhecido	Descoberta
RNACure Biopharma/Walvax	China/China	RQ3013	COVID-19	mRNA	Fase I
iBio	Estados Unidos da América	IBIO-201	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
Rongan Biológica	China	N / D	COVID-19	inativado	pré-clínico

Desenvolvedor da vacina	País/território	Vacina/candidato	Vacina	Plataforma	Estágio de desenvolvimento
Instituto de Pesquisa da Gripe Smorodintsev	Federação Russa	N / D	COVID-19	Replicando o vetor viral	Descoberta
BravoVax/GeoVax	China/Estados Unidos da América	N / D	COVID-19	Vetor viral não replicante	pré-clínico
Instituto de Medicina Experimental	Federação Russa	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
nanolek	Federação Russa	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	Descoberta
Liverna Therapeutics/AIM Vaccine	China/China	LVRNA009	COVID-19	mRNA	Fase II
oragênicos	Estados Unidos da América	TerraCoV2	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
Guanhao Biotech	China	Z-VaccirNA	COVID-19	mRNA	Descoberta
Esco Aster/Vivaldi Biosciences	Singapura/Estados Unidos da América	Delta-19	Covid-19 e gripe	Vetor viral não replicante	pré-clínico
UCLA	Estados Unidos da América	N / D	COVID-19	Vivo atenuado	Descoberta
AbVision	Estados Unidos da América	AVI-205	COVID-19	Desconhecido	pré-clínico
Clover Biofarmacêuticos	China	SCB-2020S	Covid-19 (B.1.351)	Subunidade de proteína	Fase II
Universidade de Hong Kong	China	N / D	COVID-19	DNA	Fase I
Universidade de Pittsburgh/Arrival Biotech	Estados Unidos da América/Estados Unidos da América	N / D	COVID-19	mRNA	Descoberta
Grupo Farmacêutico CSPC	China	SYS6006	COVID-19	mRNA	Fase I
Instituto Médico GenoImmune de Shenzhen	China	Covid-19/aAPC	COVID-19	Replicando o vetor viral	Fase I
Vacina AIM	China	N / D	Covid-19 Multivariante	Subunidade de proteína	pré-clínico
Spicona	Estados Unidos da América	N / D	COVID-19	Partícula semelhante a vírus	Descoberta

Desenvolvedor da vacina	País/território	Vacina/candidato	Vacina	Plataforma	Estágio de desenvolvimento
Vacina AIM	China	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
Centro de Pesquisa de Vacinas de Chula	tailândia	N / D	COVID-19	DNA	pré-clínico
Livzon Pharmaceutical	China	V-01	COVID-19	Subunidade de proteína	Fase III
Baiya Phytopharm	tailândia	Baiya SARS-CoV-2 Vax 1	COVID-19	Subunidade de proteína	Fase II
Jiangsu RecBio	China	ReCOV	COVID-19	Subunidade de proteína	Fase II/III
BioNet- Asia/Chula Vaccine Research Center	Tailândia/Tailândia	ChulaCov19	COVID-19	mRNA	Fase I/II
Yantai Patronus Biotech	China	LYB001	COVID-19	Partícula semelhante a vírus	Fase II/III
Sysvax	China	N / D	COVID-19	Partícula semelhante a vírus	pré-clínico
IRTACReSA/Grifols/Barcelona Supercomputing Centre/IrsiCaixa AIDS Research	Espanha/Espanha/Espanha/Espanha	N / D	COVID-19	Partícula semelhante a vírus	pré-clínico
Finlay	Cuba	Soberana 1	COVID-19	Subunidade de proteína	Fase I/II
Universidade da Flórida	Estados Unidos da América	N / D	COVID-19	Vetor viral não replicante	pré-clínico
Centro Nacional de Pesquisa	Egito	N / D	COVID-19	DNA	pré-clínico
Centro Nacional de Pesquisa	Egito	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
Laboratório Helix Biogen Consult/Trinity Imonoeficiente	Nigéria/Nigéria	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico

Desenvolvedor da vacina	País/território	Vacina/candidato	Vacina	Plataforma	Estágio de desenvolvimento
Centro de Engenharia Genética e Biotecnologia	Cuba	CIGB - CIGB-669	COVID-19	Subunidade de proteína	Fase I/II
Centro Nacional de Pesquisa/Vale da Vacina	Egito/Egito	Covi Vax	COVID-19	inativado	Fase I
Universidade Adeleke	Nigéria	N / D	COVID-19	Desconhecido	pré-clínico
Bávaro Nórdico/AdaptVac	Dinamarca/Dinamarca	ABNCoV2	Reforço Covid-19	Subunidade de proteína	Fase III
Instituto de Biotecnologia da UNAM	México	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	Descoberta
Avimex	México	Pertence a	COVID-19	Subunidade de proteína	Fase I
Instituto Estadual do Soro	Dinamarca	CoVAXIX	COVID-19	DNA	pré-clínico
Tecnológico de Monterrey/Autonomous University of Baja California	México/México	N / D	COVID-19	DNA	pré-clínico
Universidade Autônoma de Querétaro	México	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	Descoberta
Em nós Vacinas	Estados Unidos da América	MV-014-210	COVID-19	Vivo atenuado	Fase I
Eva Pharma	Egito	OneVax	COVID-19	inativado	Fase I
Universidade de Ege	Peru	N / D	COVID-19	DNA	pré-clínico
Universidade de Tampere	Finlândia	N / D	COVID-19	Partícula semelhante a vírus	pré-clínico
KM Biologics	Japão	KD-414	COVID-19	inativado	Fase III
Universidade de Helsinque/Universidade da Finlândia Oriental	Finlândia/Finlândia	N / D	COVID-19	Vetor viral não replicante	pré-clínico
Universidade de Selcuk	Peru	N / D	COVID-19	inativado	Fase I
Universidade de Tampere	Finlândia	N / D	COVID-19	Subunidade de	pré-clínico

Desenvolvedor da vacina	País/território	Vacina/candidato	Vacina	Plataforma	Estágio de desenvolvimento
Acibadem Labmed Health Services A.S./Mehmet Ali Aydinlar University	Turquia/Turquia	N / D	COVID-19	proteína Vivo atenuado	pré-clínico
ID Pharma	Japão	N / D	COVID-19	Vetor viral não replicante	pré-clínico
Universidade de Ancara	Peru	N / D	COVID-19	Vetor viral não replicante	pré-clínico
AltraBio/TheREx	França França	N / D	COVID-19	Vetor bacteriano vivo atenuado	pré-clínico
Centro de Biomedicina e Genoma de Izmir	Peru	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
Universidade de Bogazici	Peru	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
Universidade Sorbonne	França	N / D	COVID-19	Vetor viral não replicante	pré-clínico
Universidade da Virgínia	Estados Unidos da América	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
CNRS/CEA	França França	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
Universidade de Selcuk	Peru	N / D	COVID-19	mRNA	pré-clínico
VRI/LinkinVax	França França	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
Serum Institute of India/Codagenix	Índia/Estados Unidos da América	CoviLiv	COVID-19	Vivo atenuado	Fase II
Vaginano/INRAE/CEA	França/França/França	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
Universidade Técnica do Oriente Médio	Peru	N / D	COVID-19	Partícula semelhante a vírus	pré-clínico
Instituto Pasteur de Lille	França	N / D	COVID-19	Vetor bacteriano vivo	pré-clínico

Desenvolvedor da vacina	País/território	Vacina/candidato	Vacina	Plataforma	Estágio de desenvolvimento
				atenuado	
inserir	França	N / D	COVID-19	DNA	pré-clínico
Universidade Bezmialem Vakif	Peru	N / D	COVID-19	Partícula semelhante a vírus	pré-clínico
AIOVA	França	N / D	COVID-19	Vetor viral não replicante	pré-clínico
Aurobindo	Índia	N / D	COVID-19	Replicando o vetor viral	pré-clínico
instituto pastor	França	N / D	COVID-19	DNA	pré-clínico
Universidade de Erciyes	Peru	N / D	COVID-19	Vetor viral não replicante	pré-clínico
TheraVectys/Institut Pasteur	França França	N / D	COVID-19	Vetor viral não replicante	pré-clínico
BioComo/Mie University/MediciNova	Japão/Japão/Estados Unidos da América	N / D	COVID-19	Vetor viral não replicante	pré-clínico
O	França	N / D	COVID-19	mRNA	pré-clínico
universidade de Washington	Estados Unidos da América	N / D	COVID-19	mRNA	pré-clínico
EuBiologics	República da Coreia	EUBiológicos - EuCorVac-19	COVID-19	Subunidade de proteína	Fase III
Sanofi/GSK	França/Reino Unido da Grã-Bretanha e Irlanda do Norte	Sanofi GSK - Vidprevtyn	COVID-19	Subunidade de proteína	Revisão regulatória
Metaclipse Terapêutica	Estados Unidos da América	N / D	COVID-19	Partícula semelhante a vírus	pré-clínico
Instituto Max Planck de Bioquímica	Alemanha	N / D	COVID-19	mRNA	pré-clínico
PDS Biotech	Estados Unidos da América	convocado	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico

Desenvolvedor da vacina	País/território	Vacina/candidato	Vacina	Plataforma	Estágio de desenvolvimento
CureVac/GSK	Alemanha/Reino Unido da Grã-Bretanha e Irlanda do Norte	CV2CoV	Covid-19 Multivariante	mRNA	Fase I
adimune	Taiwan	Vacina AdimrSC-2f (COVID-19 S-protein)	COVID-19	Subunidade de proteína	Fase II
CureVac/GSK	Alemanha/Reino Unido da Grã-Bretanha e Irlanda do Norte	CV0501	Reforço Covid-19	mRNA	Fase I
Hospital Universitário Tuebingen	Alemanha	IMP CoVac-1	COVID-19	Subunidade de proteína	Fase I/II
Instituto Max Planck para Dinâmica de Sistemas Técnicos Complexos	Alemanha	N / D	COVID-19	Partícula semelhante a vírus	pré-clínico
Max-Planck-Instituto de Colóides e Interfaces	Alemanha	N / D	COVID-19	mRNA	pré-clínico
Terapêutica de Fagos Adaptativos	Estados Unidos da América	N / D	COVID-19	Desconhecido	pré-clínico
Elício Terapêutico	Estados Unidos da América	ELI-005	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
TechnoVax	Estados Unidos da América	N / D	COVID-19	Partícula semelhante a vírus	Descoberta
Julius-Maximilians-Universidade Wuerzburg/Aeterna Zentaris	Alemanha/Estados Unidos da América	N / D	COVID-19	Vetor bacteriano vivo atenuado	pré-clínico
Max-Planck-Instituto de Colóides e Interfaces	Alemanha	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
BioNTech/Pfizer	Alemanha/Estados Unidos da América	comunidade	Covid-19 (Ômicron)	mRNA	Fase I

Desenvolvedor da vacina	País/território	Vacina/candidato	Vacina	Plataforma	Estágio de desenvolvimento
Bharat Biotech/Washington University em St. Louis/Precision Virolomics	Índia/Estados Unidos da América/Estados Unidos da América	BBV154	COVID-19	Vetor viral não replicante	Fase III
Vaxinidade	Taiwan	Vaxinity - UB-612	COVID-19	Subunidade de proteína	Fase III
Universidade de Cambridge/DIOSynVax	Reino Unido da Grã-Bretanha e Irlanda do Norte/Reino Unido da Grã-Bretanha e Irlanda do Norte	GOD-CoVax2	COVID-19	DNA	Fase I
Instituto Translacional de Ciência e Tecnologia em Saúde/Panacea	indiano/indiano	N / D	Covid-19 Multivariante	Subunidade de proteína	pré-clínico
Terapêutica Elixigen	Estados Unidos da América	EXG-5003	COVID-19	mRNA	Fase I/II
Terapêutica VLP	Japão	VLPCOV-01	COVID-19	mRNA	Fase I
Neo7LogixGenericName	Estados Unidos da América	SOLVx-COVID-19	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
Centro Científico Nacional para Infecções Especialmente Perigosas/Kazakh National Agrarian University	Cazaquistão/Cazaquistão	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
Faculdade de Medicina Cristã - Vellore	Índia	N / D	COVID-19	mRNA	pré-clínico
Universidade de Harvard/Instituto Wyss	Estados Unidos da América/Estados Unidos da América	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
Instituto Nacional de Genômica Biomédica	Índia	N / D	COVID-19	Partícula semelhante a vírus	pré-clínico
Terapêutica Voltron	Estados Unidos da América	HelloVax	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico

Desenvolvedor da vacina	País/território	Vacina/candidato	Vacina	Plataforma	Estágio de desenvolvimento
Intas Farmacêutica	Índia	N / D	COVID-19	Vetor viral não replicante	pré-clínico
Serum Institute of India/SpyBiotech	Índia/Reino Unido da Grã-Bretanha e Irlanda do Norte	SII - RBD SARS-CoV-2-HBsAG VLP	COVID-19	Partícula semelhante a vírus	Fase I/II
Bharat Biotech/Thomas Jefferson University	Índia/Estados Unidos da América	Coravax	COVID-19	Vetor viral não replicante	pré-clínico
Égide Vida	Estados Unidos da América	N / D	COVID-19	DNA	pré-clínico
Seagull BioSolutions	Índia	N / D	COVID-19	Desconhecido	Descoberta
Instituto Nacional de Imunologia	Índia	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
Reliance Ciências da Vida	Índia	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	Fase I
Kazakh National Agrarian University/Ohio State University	Cazaquistão/Estados Unidos da América	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
Instituto de Tecnologia Química - Mumbai	Índia	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
Escola de Medicina Icahn no Monte Sinai	Estados Unidos da América	NDV-HXP-S	COVID-19	Replicando o vetor viral	Fase I
Instituto de Pesquisa de Doenças Infecciosas/Amyris, Inc.	Estados Unidos da América/Estados Unidos da América	N / D	COVID-19	mRNA	pré-clínico
Miméticos	Suíça	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
Instituto de Vacinas e Medicamentos Biológicos	Vietnã	COVIVAC	COVID-19	Subunidade de proteína	Fase II
Genique Life Sciences	Índia	N / D	COVID-19	Partícula semelhante a vírus	pré-clínico

Desenvolvedor da vacina	País/território	Vacina/candidato	Vacina	Plataforma	Estágio de desenvolvimento
Instituto Translacional de Ciências e Tecnologia em Saúde	Índia	N / D	COVID-19	mRNA	pré-clínico
EpiVax/Terapêutica imunológica	Estados Unidos da América/Estados Unidos da América	N / D	COVID-19	DNA	pré-clínico
Biological E/Ohio State University's College of Veterinary Medicine	Índia/Estados Unidos da América	N / D	COVID-19	Replicando o vetor viral	pré-clínico
Instituto Nacional de Química	Eslovênia	N / D	COVID-19	DNA	pré-clínico
Fazenda Bio	Indonésia	Vacina SOE	COVID-19	Subunidade de proteína	Fase III
diádico	Estados Unidos da América	DYAI-100	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
Biotis Pharmaceutical/Universidade de Airlangga	indonésio/indonésio	vermelho e branco	COVID-19	inativado	Fase I/II
Universidade de Purdue	Estados Unidos da América	N / D	COVID-19	Vetor viral não replicante	Descoberta
Instituto Pasteur do Irã	Irã (Republic Islâmica do Irã)	Vetor de adenovírus recombinante (tipo 5)	COVID-19	Vetor viral não replicante	pré-clínico
Engraçado Farma	Peru	Vacina COVID-19 adjuvante inativa Koçak-19	COVID-19	inativado	Fase I
Zist Salak	Irã (Republic Islâmica do Irã)	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
Cell Tech Pharmed	Irã (Republic Islâmica do Irã)	N / D	COVID-19	Celular	pré-clínico
Rahpouyan Fanavar Sadegh	Irã (Republic Islâmica do Irã)	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
Início Iman Zist Fanavar	Irã (Republic Islâmica do Irã)	N / D	COVID-19	Vetor viral não replicante	pré-clínico

Desenvolvedor da vacina	País/território	Vacina/candidato	Vacina	Plataforma	Estágio de desenvolvimento
Instituto de Pesquisa de Soro e Vacina Razi	Irã (Republic Islâmica do Irã)	Razi Cov Pars	COVID-19	Subunidade de proteína	Fase III
Biosun Pharmed	Irã (Republic Islâmica do Irã)	N / D	COVID-19	DNA	pré-clínico
Cell Tech Pharmed	Irã (Republic Islâmica do Irã)	N / D	COVID-19	mRNA	pré-clínico
Universidade de Iowa/Iowa State University	Estados Unidos da América/Estados Unidos da América	N / D	COVID-19	Desconhecido	Descoberta
empresa farmacêutica Osve	Irã (Republic Islâmica do Irã)	Osivd-19	COVID-19	inativado	Fase I
RocketVax	Suíça	N / D	COVID-19	DNA	Descoberta
Universidade de Shiraz	Irã (Republic Islâmica do Irã)	N / D	COVID-19	Partícula semelhante a vírus	pré-clínico
Capricor Terapêutica	Estados Unidos da América	N / D	COVID-19	mRNA	pré-clínico
Biosun Pharmed	Irã (Republic Islâmica do Irã)	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
Biológicos Medigen/BlueWillow	Taiwan/Estados Unidos da América	S-2P-NE-01	COVID-19	Subunidade de proteína	Fase I
Zista Kian Azma Co.	Irã (Republic Islâmica do Irã)	N / D	COVID-19	inativado	pré-clínico
Sanária	Estados Unidos da América	OraCOV	COVID-19	Desconhecido	Descoberta
Instituto Pasteur do Irã	Irã (Republic Islâmica do Irã)	Vetor de adenovírus recombinante (ChAdOx1)	COVID-19	Vetor viral não replicante	pré-clínico
ReNAP Co.	Irã (Republic Islâmica do Irã)	N / D	COVID-19	mRNA	pré-clínico
Oravax	Israel	N / D	COVID-19	Partícula semelhante a vírus	Fase I
MIGAL – Instituto de Investigação da Galileia	Israel	MigVax-101	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
Takis/Rottapharm Biotech	Itália/Itália	COVID-eVax	COVID-19	DNA	Fase I/II
AnGes Biofármaco	Japão	AnGes - AG301	COVID-19	DNA	Fase II/III

Desenvolvedor da vacina	País/território	Vacina/candidato	Vacina	Plataforma	Estágio de desenvolvimento
SK Biociência	República da Coreia	NBP2001	COVID-19	Subunidade de proteína	Fase I
cidade da esperança	Estados Unidos da América	COH04S1	COVID-19	Vetor viral não replicante	Fase II
NEC Oncoimunidade	Japão	N / D	Covid-19 Multivariante	mRNA	Descoberta
Cellid Co/LG Chem	República da Coreia/República da Coreia	Celídeo - AdCLD-CoV19	COVID-19	Replicando o vetor viral	Fase I/II
Instituto de Pesquisa para Problemas de Segurança Biológica	Cazaquistão	QazCoVac-P	COVID-19	Subunidade de proteína	Fase I/II
Flow Pharma	Estados Unidos da América	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
Aivita Biomédica	Estados Unidos da América	Aivita - AV-COVID-19	COVID-19	Replicando o vetor viral	Fase II
Nykode Therapeutics	Noruega	VB10.2129	COVID-19	DNA	Fase I/II
Universidade Radboud	Holanda	ABNCoV2	COVID-19	Partícula semelhante a vírus	Fase III
Intravacc/Leiden University Medical Center	Holanda/Holanda	NANOVAC	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
Akston Biosciences	Estados Unidos da América	Axton - AKS-452	COVID-19	Subunidade de proteína	Fase II/III
Nykode Therapeutics	Noruega	VB10.2210	COVID-19	DNA	Fase I/II
ConserV Bioscience/Lawrence Livermore National Laboratory	Reino Unido da Grã-Bretanha e Irlanda do Norte/Estados Unidos da América	N / D	COVID-19	mRNA	pré-clínico
Universidade de Oxford	Reino Unido da Grã-Bretanha e Irlanda do Norte	RBD-SpyVLP	COVID-19	Partícula semelhante a vírus	pré-clínico
Gritstone	Estados Unidos da América	GRT-R910	Covid-19 Multivariante	mRNA	Fase I

Desenvolvedor da vacina	País/território	Vacina/candidato	Vacina	Plataforma	Estágio de desenvolvimento
Universidade de Stanford	Estados Unidos da América	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
Chumakov	Federação Russa	N / D	COVID-19	Partícula semelhante a vírus	Descoberta
G+FLAS Ciências da Vida	República da Coreia	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
BIOCAD	Federação Russa	N / D	COVID-19	mRNA	Descoberta
GI-Célula	República da Coreia	GIC-1114/1114m	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
Medigen/Vaxess	Taiwan/Estados Unidos da América	N / D	COVID-19	mRNA	pré-clínico
Universidade Estadual do Arizona	Estados Unidos da América	M20-234L	COVID-19	Partícula semelhante a vírus	pré-clínico
Universidade Estadual do Arizona	Estados Unidos da América	N / D	COVID-19	Partícula semelhante a vírus	pré-clínico
Instituto de Pesquisa Científica de Vacinas e Soros de São Petersburgo	Federação Russa	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	Fase I/II
Universidade Estadual do Arizona	Estados Unidos da América	NYVAC-KC	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
Universidade de Hacettepe	Peru	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
Universidade de Mármara	Peru	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
Universidade Técnica de Yildiz	Peru	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
BIOCAD	Federação Russa	BCD-250	COVID-19	Vetor viral não replicante	Fase I/II
Universidade de Akdeniz	Peru	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
Universidade Ataturk	Peru	N / D	COVID-19	Subunidade de	pré-clínico

Desenvolvedor da vacina	País/território	Vacina/candidato	Vacina	Plataforma	Estágio de desenvolvimento
Betuvax	Federação Russa	Betuvax-CoV-2	COVID-19	proteína Subunidade de proteína	Fase I/II
Moderno	Estados Unidos da América	mRNA-1273.351	Covid-19 (B.1.351)	mRNA	Fase II
Universidade GPO/Mahidol	Tailândia/Tailândia	NDV-HXP-S	COVID-19	Replicando o vetor viral	Fase I/II
GSK	Reino Unido da Grã-Bretanha e Irlanda do Norte	CoV2 SAM (LNP)	COVID-19	mRNA	Fase I
SK Biociência	República da Coreia	GBP510 (variável)	Covid-19 Multivariante	Subunidade de proteína	pré-clínico
Vacinas VBI	Estados Unidos da América	VBI-2905	Covid-19 Multivariante	Partícula semelhante a vírus	Fase I
Universidade Imam Abdulrahman Bin Faisal	Arábia Saudita	Almansour-001	COVID-19	DNA	Fase I
Moderno	Estados Unidos da América	mRNA-1273.211	Covid-19 Multivariante	mRNA	Fase II/III
Medicamentos RVAC	Cingapura	RVM-V001	Reforço Covid-19	mRNA	Fase I
Emerx	Reino Unido da Grã-Bretanha e Irlanda do Norte	PepGNP-SARSCoV2	COVID-19	célula T	Fase I
ACM Biolabs	Cingapura	ACM-001	Reforço Covid-19	Subunidade de proteína	Fase I
africano	África do Sul	Vacina Hub de mRNA de OMS	COVID-19	mRNA	pré-clínico
GC Pharma/MOGAM Instituto de Pesquisa Biomédica	República da Coreia/República da Coreia	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
Huvet Biografia	República da Coreia	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico

Desenvolvedor da vacina	País/território	Vacina/candidato	Vacina	Plataforma	Estágio de desenvolvimento
HK inno.N Corporation	República da Coreia	IN-B009	COVID-19	Subunidade de proteína	Fase I
Bionote/EuBiologics	República da Coreia/República da Coreia	N / D	Covid-19 Multivariante	Desconhecido	Descoberta
SK Biociência	República da Coreia	GBP510 (à prova de variantes)	Covid-19 Multivariante	Subunidade de proteína	Descoberta
Biocologias Celltrion/TriLink	República da Coreia/Estados Unidos da América	N / D	Covid-19 Multivariante	mRNA	Descoberta
Instituto Internacional de Vacinas/Sumagen/LG Chem	República da Coreia/República da Coreia	N / D	COVID-19	Vetor viral não replicante	pré-clínico
Farma Farmacêutica	Peru	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
EyeGene	República da Coreia	EG-Covid	COVID-19	mRNA	Fase I/II
Regulação do sistema imunológico	Suécia	N / D	COVID-19	Desconhecido	Descoberta
Farmacêutica OliX	República da Coreia	N / D	COVID-19	mRNA	Descoberta
Universidade Bilikent/Universidade Técnica do Oriente Médio	Turquia/Turquia	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	Fase II
Greffex	Estados Unidos da América	N / D	COVID-19	Vetor viral não replicante	pré-clínico
Centro de Genômica e Bioinformática da Academia de Ciências	Uzbequistão	N / D	COVID-19	DNA	pré-clínico
EuBiologics	República da Coreia	N / D	Covid-19 (Ômicron)	Subunidade de proteína	pré-clínico
Certest Biotec	Espanha	N / D	COVID-19	mRNA	pré-clínico
Nano Curas	Estados Unidos da América	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	Fase I/II
Axônio Neurociência	Espanha	ACvac1	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
CyanVac	Estados Unidos da América	CVXGA1	COVID-19	Vetor viral não replicante	Fase I

Desenvolvedor da vacina	País/território	Vacina/candidato	Vacina	Plataforma	Estágio de desenvolvimento
Hospital Clínic de Barcelona/HIPRA	Espanha/Espanha	N / D	COVID-19	mRNA	pré-clínico
Farmacêutica Tetherex	Estados Unidos da América	SC-Ad6-1	COVID-19	Vetor viral não replicante	Fase I
HIPER	Espanha	PHH-1V	COVID-19	Subunidade de proteína	Revisão regulatória
Moderno	Estados Unidos da América	mRNA-1283	COVID-19	mRNA	Fase II
Produção da Fábrica de Vacinas Sueca	Suécia	N / D	COVID-19	DNA	pré-clínico
Inovio Farmacêutica	Estados Unidos da América	INO-4802	Covid-19 Multivariante	DNA	pré-clínico
Instituto Karolinska	Suécia	N / D	COVID-19	DNA	pré-clínico
VaxForm	Estados Unidos da América	CoV2-OGEN1	COVID-19	Subunidade de proteína	Fase I
Berna Biotech	Suíça	N / D	COVID-19	Partícula semelhante a vírus	pré-clínico
Instituto Nacional de Doenças Infecciosas e Vacinologia	Taiwan	N / D	COVID-19	DNA	pré-clínico
Vacino Biotech	Taiwan	N / D	Covid-19 Multivariante	Subunidade de proteína	pré-clínico
Universidade da Carolina do Norte em Chapel Hill	Estados Unidos da América	N / D	Covid-19 Multivariante	mRNA	pré-clínico
BioNet- Asia	tailândia	N / D	Covid-19 Multivariante	mRNA	pré-clínico
HelloVax	Estados Unidos da América	N / D	COVID-19	Desconhecido	pré-clínico
Arcturus Therapeutics/Vinbiocare	Estados Unidos da América/Vietnã	ARCT-154	Covid-19 Multivariante	mRNA	Fase II/III
Centro Nacional de Engenharia Genética e Biotecnologia	tailândia	N / D	COVID-19	Vetor viral não replicante	pré-clínico

Desenvolvedor da vacina	País/território	Vacina/candidato	Vacina	Plataforma	Estágio de desenvolvimento
Centro Nacional de Engenharia Genética e Biotecnologia	tailândia	N / D	COVID-19	Replicando o vetor viral	pré-clínico
Terapêutica Sorrento	Estados Unidos da América	N / D	Covid-19 Multivariante	mRNA	pré-clínico
Baiya Phytopharm	tailândia	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
Moderno	Estados Unidos da América	mRNA-1073	Covid-19 e gripe	mRNA	Fase I/II
Novavax	Estados Unidos da América	Vacina Combinada COVID-NanoFlu	Covid-19 e gripe	Subunidade de proteína	Fase I/II
AuraVax Therapeutics/Universidade de Houston	Estados Unidos da América/Estados Unidos da América	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
Novavax	Estados Unidos da América	N / D	Covid-19 (B.1.351)	Subunidade de proteína	Fase I/II
Novavax	Estados Unidos da América	N / D	Covid-19 (B.1.351 + B.1.617.2)	Subunidade de proteína	Fase I/II
Novavax	Estados Unidos da América	N / D	Covid-19 (B.1.617.2)	Subunidade de proteína	Fase I/II
Celsius	Estados Unidos da América	PLACINA	Covid-19 Multivariante	DNA	pré-clínico
Arcturus Terapêutica	Estados Unidos da América	ARCT-165	Covid-19 Multivariante	mRNA	Fase I/II
Vacinas VBI	Estados Unidos da América	VBI-2901	Covid-19 Multivariante	Partícula semelhante a vírus	pré-clínico
Stabilitech Biopharma	Reino Unido da Grã-Bretanha e Irlanda do Norte	OraPro-COVID-19	COVID-19	Vetor viral não replicante	pré-clínico

Desenvolvedor da vacina	País/território	Vacina/candidato	Vacina	Plataforma	Estágio de desenvolvimento
DIOSynVax	Reino Unido da Grã-Bretanha e Irlanda do Norte	N / D	Covid-19 Multivariante	mRNA	pré-clínico
CPI/Universidade de Oxford/Caltech	Reino Unido da Grã-Bretanha e Irlanda do Norte/Estados Unidos da América/Estados Unidos da América	N / D	Covid-19 Multivariante	Subunidade de proteína	Descoberta
Centro Max Planck da Universidade Imoporon/Bristol	Reino Unido da Grã-Bretanha e Irlanda do Norte/Reino Unido da Grã-Bretanha e Irlanda do Norte	N / D	COVID-19	Partícula semelhante a vírus	pré-clínico
Colégio Imperial de Londres	Reino Unido da Grã-Bretanha e Irlanda do Norte	LNP-nCoVsaRNA	COVID-19	mRNA	Descoberta
Ainos Inc	Estados Unidos da América	N / D	Covid-19 (B.1.617.2)	mRNA	Descoberta
Uvax Bio	Estados Unidos da América	Uvax-2129	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
Phylex Biociências	Estados Unidos da América	N / D	Covid-19 Multivariante	mRNA	pré-clínico
ImmunityBio	Estados Unidos da América	AAHI-SC2/3	Reforço Covid-19	mRNA	Fase I/II
Arcturus Terapêutica	Estados Unidos da América	Arcturus - ARCT-021	COVID-19	mRNA	Fase I/II
Affinivax	Estados Unidos da América	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	Descoberta
Moderno	Estados Unidos da América	mRNA-1273.529	Covid-19 (Ômicron)	mRNA	Fase II/III

Desenvolvedor da vacina	País/território	Vacina/candidato	Vacina	Plataforma	Estágio de desenvolvimento
BTG Specialty Pharmaceuticals/Soligenix/Universidade do Havai em Manoa	Estados Unidos da América/Estados Unidos da América/Estados Unidos da América	CiVax	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
alvea	Estados Unidos da América	alveavax	Covid-19 (Ômicron)	DNA	pré-clínico
Inovio Farmacêutica	Estados Unidos da América	Inóvio - INO-4800	COVID-19	DNA	Fase III
ExcepGen	Estados Unidos da América	N / D	COVID-19	Partícula semelhante a vírus	pré-clínico
Ufovox	Estados Unidos da América	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
Universidade da Virgínia Ocidental	Estados Unidos da América	BReC-CoV-2	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
Centro de Genômica e Bioinformática	Uzbequistão	TOMAVAC	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
Speransa Terapêutica	Estados Unidos da América	PRIME-2-CoV_Beta	Covid-19 Multivariante	Subunidade de proteína	Fase I
Novavax	Estados Unidos da América	NVX-CoV2515	Covid-19 (Ômicron)	Subunidade de proteína	Fase III
Tonix Pharmaceuticals	Estados Unidos da América	TNX-2300	COVID-19	Replicando o vetor viral	pré-clínico
Gritstone	Estados Unidos da América	GRT-R918	Covid-19 (Ômicron)	mRNA	Fase I
Pfizer	Estados Unidos da América	BNT162b5	Covid-19 (Ancestral + Ômicron)	mRNA	Fase II
Universidade da Geórgia/Universidade de Iowa	Estados Unidos da América/Estados Unidos da América	N / D	COVID-19	Vetor viral não replicante	pré-clínico
Moderno	Estados Unidos da América	mRNA-1273.222	Covid-19 Multivariante	mRNA	Fase III
Inovio Farmacêutica	Estados Unidos da América	Impulsionador INO-4800	Reforço Covid-19	DNA	Fase II

Desenvolvedor da vacina	País/território	Vacina/candidato	Vacina	Plataforma	Estágio de desenvolvimento
Greenlight Biociências	Estados Unidos da América	N / D	COVID-19	mRNA	pré-clínico
Nanogen	Vietnã	Nanogen - Nano Covax	COVID-19	Subunidade de proteína	Fase III
VABIOTECH	Vietnã	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico
POLYVAC	Vietnã	N / D	COVID-19	Subunidade de proteína	pré-clínico

Fonte: Adaptado de UNICEF, 2023

8.3 Anexo 3 – Preço reportado por dose de vacina para COVID-19

País/território/grupo	Fabricante	Nome da vacina	Preço por dose (USD)
União Africana	Janssen Pharmaceuticals	Ad26.COV 2.S	\$ 10,00
União Africana	Pfizer/BioNTech	comunidade	\$ 6,75
União Africana	Instituto de Soro da Índia	Covishield	\$ 3,00
Argentina	Instituto de Soro da Índia	Covishield	\$ 4,10
Argentina	AstraZeneca	Vaxzevria	\$ 4,00
Argentina	CanSino Biologicals	Ad5-nCOV	\$ 17,00
Argentina	Gamaleya Research Institute/Laboratorios Richmond	Sputnik V	\$ 9,95
Argentina	Laboratórios Richmond	Sputnik V	\$ 12,61
Argentina	Moderno	mRNA-1273	\$ 21,50
Argentina	Pfizer/BioNTech	comunidade	\$ 12,00
Argentina	Sinopharm (Pequim)	BBIBP-CorV	\$ 9,00
Argentina	Sinopharm (Pequim)	BBIBP-CorV	\$ 15,00
Argentina	Sinopharm (Pequim)	BBIBP-CorV	\$ 20,00
Bangladesh	Instituto de Soro da Índia	Covishield	\$ 4,00
Bangladesh	Sinopharm (Pequim)	BBIBP-CorV	\$ 10,00
mercado privado de Bangladesh	Instituto de Soro da Índia	Covishield	\$ 13,27
Botsuana	Bharat Biotech	Covaxina	\$ 16,00
Botsuana	Moderno	Spikevax	\$ 28,88
Botsuana	Sinovac	coronavac	\$ 15,00
Brasil	Fiocruz	Vaxzevria	\$ 3,16
Brasil	Bharat Biotech	Covaxina	\$ 15,00
Brasil	Pfizer/BioNTech	comunidade	\$ 10,00
Brasil	Instituto de Soro da Índia	Covishield	\$ 5,00
Brasil	Sinovac	CoronaVac	\$ 10,30
Camboja	Sinovac	CoronaVac	\$ 10,00
China	Sinopharm (Pequim)	BBIBP-CorV	\$ 29,75
China	Sinovac	CoronaVac	\$ 29,75
Colômbia	AstraZeneca	Vaxzevria	\$ 6,00
Colômbia	Pfizer/BioNTech	comunidade	\$ 12,00
Costa Rica	Pfizer/BioNTech	comunidade	\$ 12,00
COVAX AMC	Instituto de Soro da Índia	Covishield	\$ 3,00
COVAX AMC	Moderno	Spikevax	\$ 10,00
COVAX AMC	Moderno	Spikevax	\$ 10,00
COVAX AMC	Instituto de Soro da Índia	Covovax	\$ 3,00
Dinamarca	Novavax	NVXCoV-2373	\$ 20,90
Comissão Europeia	AstraZeneca	Vaxzevria	\$ 3,50
Comissão Europeia	AstraZeneca	Vaxzevria	\$ 2,19
Comissão Europeia	Janssen Pharmaceuticals	Ad26.COV 2.S	\$ 8,50
Comissão Europeia	Moderno	mRNA-1273	\$ 25,50
Comissão Europeia	Moderno	mRNA-1273	\$ 18,00
Comissão Europeia	Pfizer/BioNTech	comunidade	\$ 23,15
Comissão Europeia	Pfizer/BioNTech	comunidade	\$ 14,70
Comissão Europeia	Pfizer/BioNTech	comunidade	\$ 18,90

País/território/grupo	Fabricante	Nome da vacina	Preço por dose (USD)
Comissão Europeia	Sanofi/GSK	Vidprevtyn	\$ 9,30
Gana	Instituto de Pesquisa Gamaleya	Sputnik V	\$ 19,00
Global (excl. Rússia)	Instituto de Pesquisa Gamaleya	Sputnik V	\$ 10,00
Guiana	Sinopharm (Pequim)	BBIBP-CorV	\$ 15,00
HICs	Moderno	mRNA-1273	\$ 32,00
HICs	Moderno	mRNA-1273	\$ 37,00
Hungria	Instituto de Pesquisa Gamaleya	Sputnik V	\$ 19,90
Hungria	Sinopharm (Pequim)	BBIBP-CorV	\$ 36,00
Índia	Instituto de Soro da Índia	Covishield	\$ 4,05
Índia	Instituto de Soro da Índia	Covishield	\$ 2,88
Índia	Bharat Biotech	COVAXINA	\$ 3,02
Índia	Bharat Biotech	COVAXINA	\$ 5,45
Índia	Biológico E	Corbevax	\$ 1,92
Índia	Instituto de Pesquisa Gamaleya	Sputnik V	\$ 13,58
Índia	Zydus Cadila	ZyCov-D	\$ 3,57
Índia mercado privado	Instituto de Soro da Índia	Covishield	\$ 7,95
Indonésia	Sinovac	CoronaVac	\$ 17,00
Indonésia	Sinovac	CoronaVac	\$ 13,60
Israel	Pfizer/BioNTech	comunidade	\$ 28,00
Cazaquistão	Instituto de Pesquisa Gamaleya	Sputnik V	\$ 13,00
Cazaquistão	Indústrias Farmacêuticas do Golfo	BBIBP-CorV	\$ 31,10
Kuwait	Moderno	Spikevax	\$ 40,00
América latina	AstraZeneca	Vaxzevria	\$ 4,00
América latina	Uniao Quimica Farmaceutica Nacional	Sputnik V	\$ 3,00
Líbano	Pfizer/BioNTech	comunidade	\$ 18,00
Líbano mercado privado	Instituto de Pesquisa Gamaleya	Sputnik V	\$ 19,00
Maldivas	Instituto de Soro da Índia	Covishield	\$ 5,25
México	Instituto de Soro da Índia	Covishield	\$ 4,00
Mongólia	Sinopharm (Pequim)	BBIBP-CorV	\$ 15,00
Nepal	Instituto de Soro da Índia	Covishield	\$ 4,00
Mercado Privado do Nepal	Bharat Biotech	Covaxina	\$ 35,00
mercado privado paquistanês	CanSino Biologicals	Ad5-nCOV	\$ 27,15
mercado privado paquistanês	Instituto de Pesquisa Gamaleya	Sputnik V	\$ 27,15
Filipinas	Sinovac	CoronaVac	\$ 14,49
Arábia Saudita	Instituto de Soro da Índia	Covishield	\$ 5,25
Senegal	Sinopharm (Pequim)	BBIBP-CorV	\$ 18,60
África do Sul	Instituto de Soro da Índia	Covishield	\$ 5,25
África do Sul	Janssen Pharmaceuticals	Ad26.COV 2.S	\$ 10,00
África do Sul	Pfizer/BioNTech	comunidade	\$ 10,00
Sri Lanka	Instituto de Soro da Índia	Covishield	\$ 5,25
Sri Lanka	Sinopharm (Pequim)	BBIBP-CorV	\$ 15,00
mercado privado tailandês	Sinovac	CoronaVac	\$ 32,52
Tunísia	Pfizer/BioNTech	comunidade	\$ 7,00
Ucrânia	Sinovac	coronovac	\$ 18,00
Estados Unidos da América	AstraZeneca	Vaxzevria	\$ 4,00
Estados Unidos da América	Janssen Pharmaceuticals	Ad26.COV 2.S	\$ 10,00

País/território/grupo	Fabricante	Nome da vacina	Preço por dose (USD)
Estados Unidos da América	Moderno	mRNA-1273	\$ 15,00
Estados Unidos da América	Pfizer/BioNTech	comunidade	\$ 19,50
Estados Unidos da América	Sanofi/GSK	Vidprevtyn	\$ 10,50
Vietnã	Nanogen	Nano Covax	\$ 5,19

Fonte: Adaptado de UNICEF, 2023

8.4 Anexo 4 – Capacidade mundial de produção de vacinas para COVID-19 por plataforma

Período de tempo	Plataforma	Capacidade
2022	vacina de DNA	496676000
2023	vacina de DNA	496676000
2022	Vacina Inativada	5652000000
2023	Vacina Inativada	5652000000
H1-2021	Vacina Inativada	390204701
H2-2021	Vacina Inativada	1064861551
quarto trimestre de 2020	Vacina Inativada	6152000
2022	Vacina Viva Atenuada	80000000
2023	Vacina Viva Atenuada	80000000
2022	Vacina mRNA	7270000000
2023	Vacina mRNA	7730000000
H1-2021	Vacina mRNA	867302512
H2-2021	Vacina mRNA	1700662090
quarto trimestre de 2020	Vacina mRNA	5727120
2022	Vacina de vetor viral não replicante	10557000000
2023	Vacina de vetor viral não replicante	10305000000
H1-2021	Vacina de vetor viral não replicante	967666972
H2-2021	Vacina de vetor viral não replicante	2041761108
quarto trimestre de 2020	Vacina de vetor viral não replicante	300151
2022	Vacina de Subunidade de Proteína	15675000000
2023	Vacina de Subunidade de Proteína	16425000000
H1-2021	Vacina de Subunidade de Proteína	5778761
H2-2021	Vacina de Subunidade de Proteína	28418208
quarto trimestre de 2020	Vacina de Subunidade de Proteína	0
2022	Vacina de vetor viral replicante	280000000
2023	Vacina de vetor viral replicante	570000000
2022	Desconhecido	0
2023	Desconhecido	0
H1-2021	Desconhecido	1371680460
H2-2021	Desconhecido	2752654799
quarto trimestre de 2020	Desconhecido	6162874
2022	Vacina VLP	100000000
2023	Vacina VLP	1000000000

Fonte: Adaptado de UNICEF, 2023

8.5 Anexo 5 – Capacidade mundial de produção de vacinas para COVID-19 por estágio de desenvolvimento clínico

Período de tempo	Estágio de desenvolvimento	Capacidade
2022	Aprovado para uso	2610000000
2023	Aprovado para uso	2684800000
H1-2021	Aprovado para uso	3602633406
H2-2021	Aprovado para uso	7588357756
quarto trimestre de 2020	Aprovado para uso	18342145
2022	Descoberta	5270000000
2023	Descoberta	5360000000
2022	Fase I	200000000
2023	Fase I	200000000
2022	Fase I/II	300000000
2023	Fase I/II	510000000
2022	Fase II	896676000
2023	Fase II	296676000
2022	Fase II/III	4080000000
2023	Fase II/III	4080000000
H1-2021	Fase II/III	0
2022	Fase III	1059000000
2023	Fase III	1659000000
2022	pré-clínico	1105000000
2023	pré-clínico	1305000000
2022	Revisão regulatória	1100000000
2023	Revisão regulatória	2000000000
H1-2021	Revisão regulatória	0
quarto trimestre de 2020	Revisão regulatória	0

Fonte: Adaptado de UNICEF, 2023.