



# **As Tecnologias no Desenvolvimento da Vacina para SARS-CoV-2**

**Prof. Marco Antonio Stephano - [stephano@usp.br](mailto:stephano@usp.br)**

**Dr. Marcos Knirsch - [marcos.knirsch@alumni.usp.br](mailto:marcos.knirsch@alumni.usp.br)**



## **A Biotecnologia no Desenvolvimento da vacina para SARS-CoV-2)**

### **Situação das vacinas para Sars-Cov-2 em 28/08/2021**

63 vacinas em estudo clínico

343 em estudos pré-clínicos

> 3000 projetos no mundo

### **Situação atual da COVID-19**

#### **Mundial**

Casos: 676.609.955

Mortes: 6.881.955

#### **Brasil**

Casos: 37.085.675

Mortes: 699.310

### **Total de doses de vacina administradas:**

13.338.833.198



<https://vaccines.alliedacademies.com/2017/events-list/advanced-vaccine-technology-and-engineering>

<https://gisanddata.maps.arcgis.com/apps/dashboards/bda7594740fd40299423467b48e9ecf6>



## A Biotecnologia no Desenvolvimento da vacina para SARS-CoV-2)

### Principais Tecnologias

Vetorial Não replicante

Vetorial replicante

DNA

RNA

Subunidade de proteína

Viva atenuada

Inativada

VLP (Virus Like Particle)



Stephano, MA

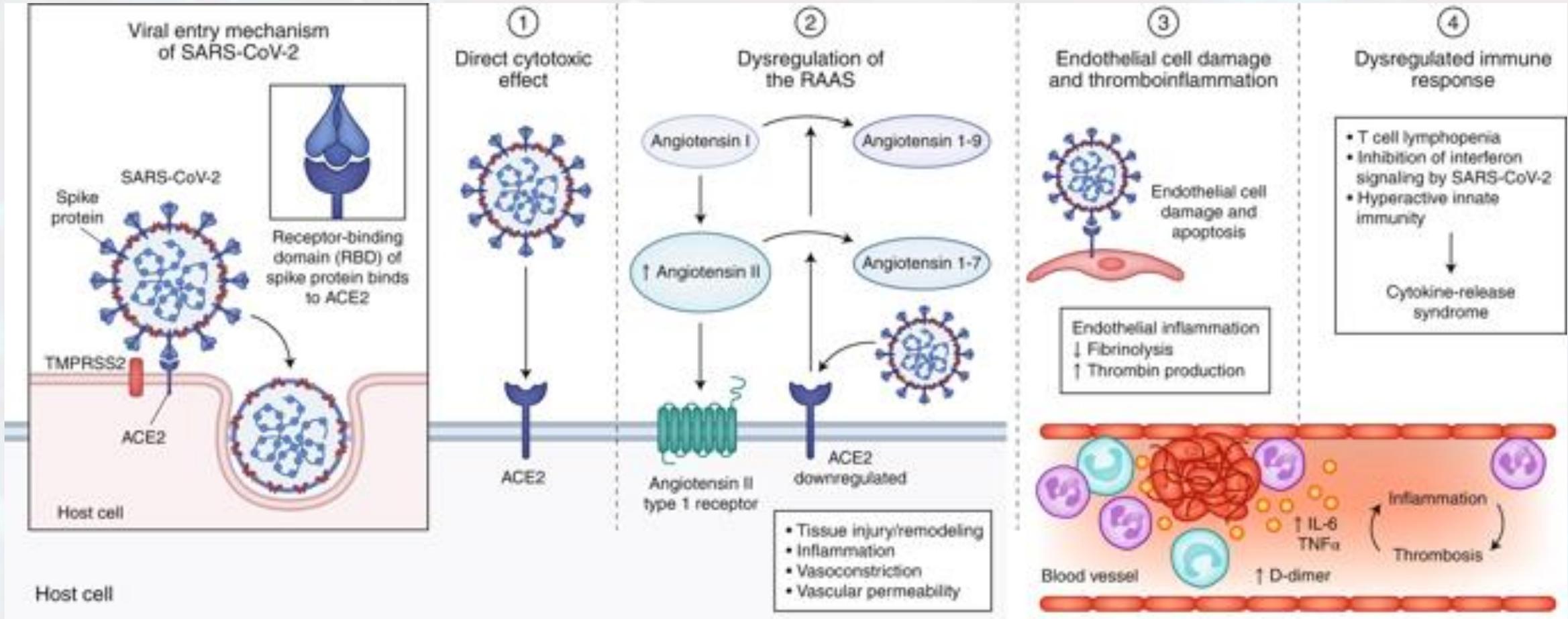
### Estratégias para o desenvolvimento de vacinas:

- Escolha do antígeno (Biological API)
- Escolha da rota de imunização
- Escolha do adjuvante
- Formulação



## A Biotecnologia no Desenvolvimento da vacina para SARS-CoV-2)

### Escolha do antígeno

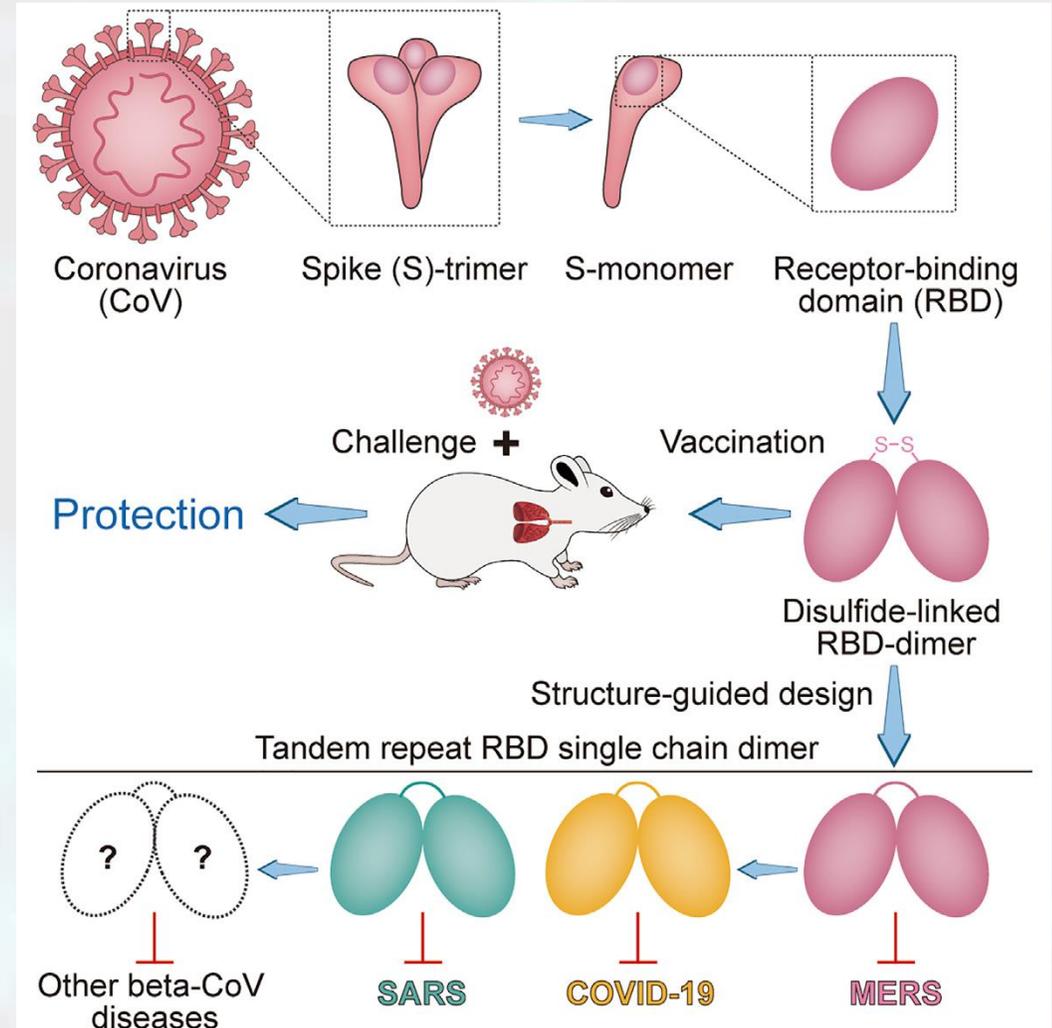
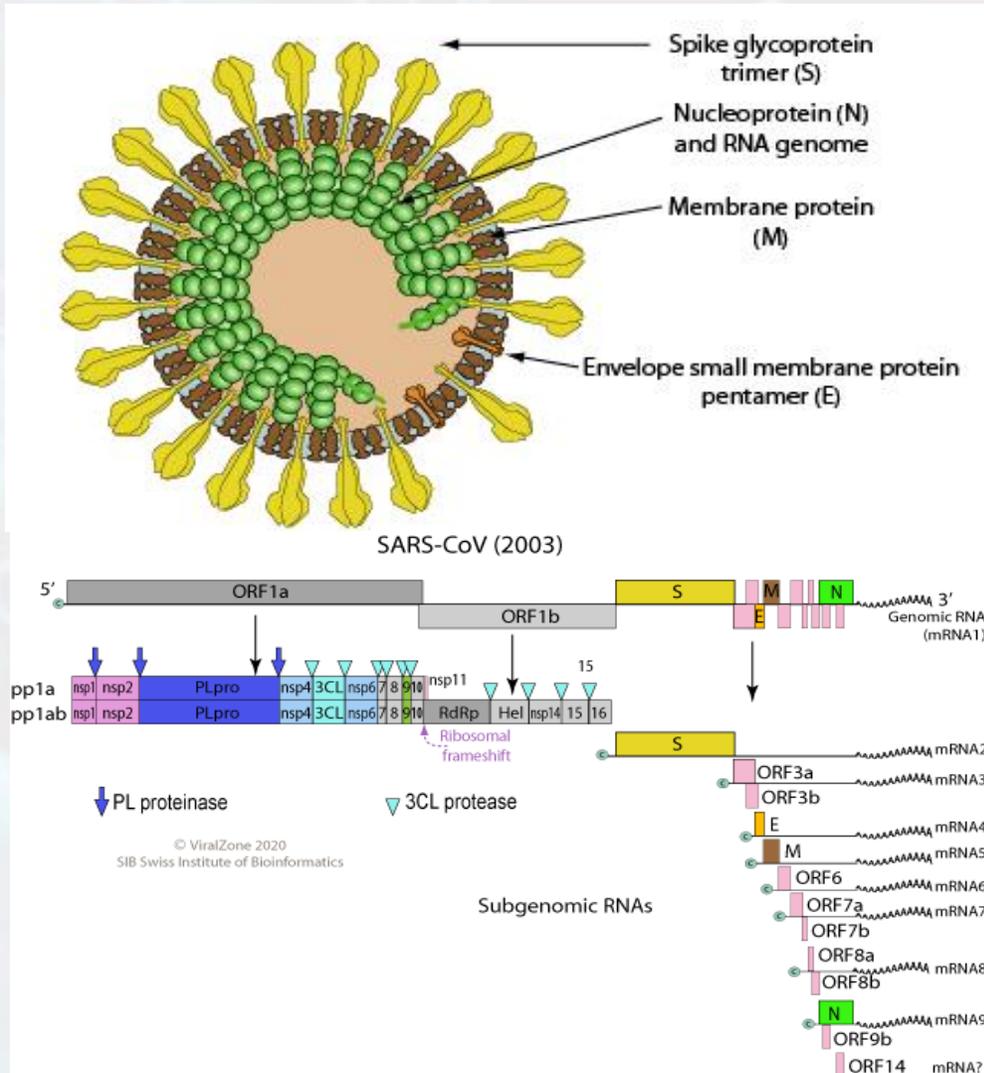




## A Biotecnologia no Desenvolvimento da vacina para SARS-CoV-2)

### Escolha do antígeno

doi: 10.1016/j.jsb.2010.11.021



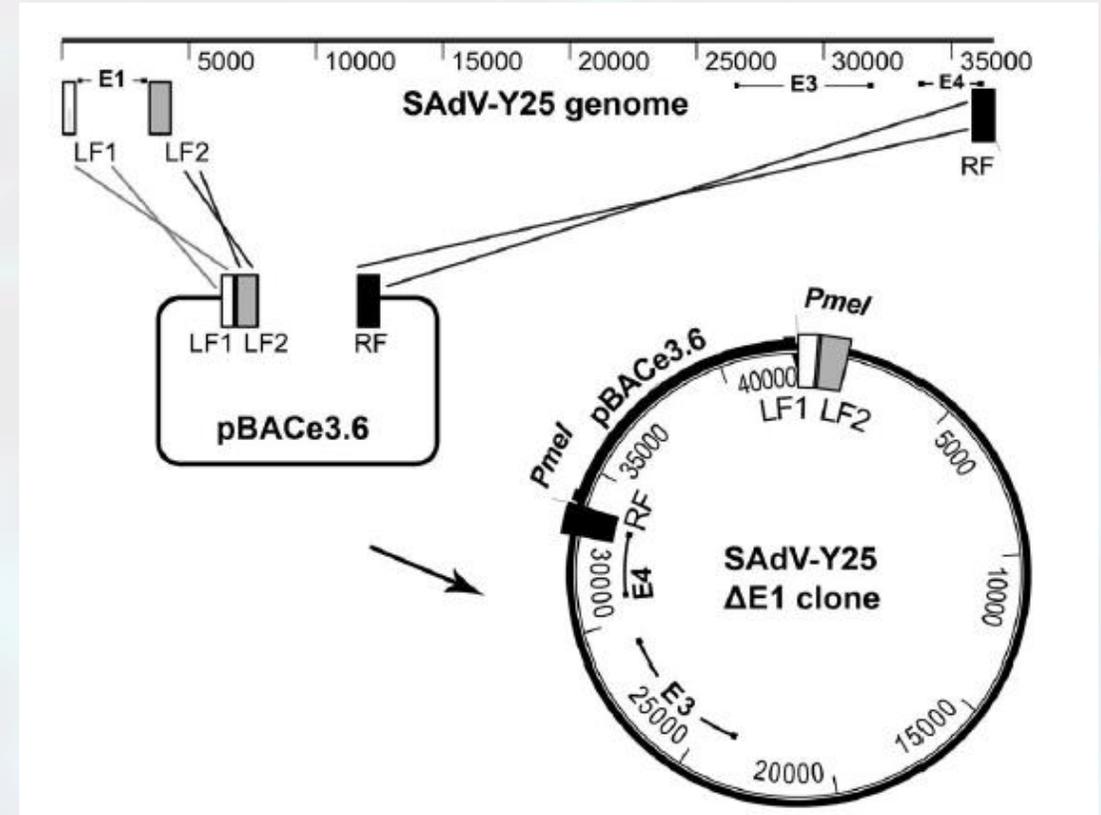
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.06.035>



## A Biotecnologia no Desenvolvimento da vacina para SARS-CoV-2)

### Tecnologia de vacinas Vetoriais Não replicante

- A) Consiste em obter uma cepa viral com deficiência na replicação. Esta deficiência é obtida por manipulação gênica. Ex: Adenovirus Humano (vários sorotipos); Adenovirus de Primatas não humanos (7 sorotipos); retrovírus; lentivirus; vaccínia vírus; influenza vírus; citomegalovírus; vírus sendai
- B) Inserção do gene de interesse no genoma do vetor (spike proteín).
- C) Inserção do genoma do vetor viral em uma célula humana (HEK293).



doi:10.1371/journal.pone.0040385



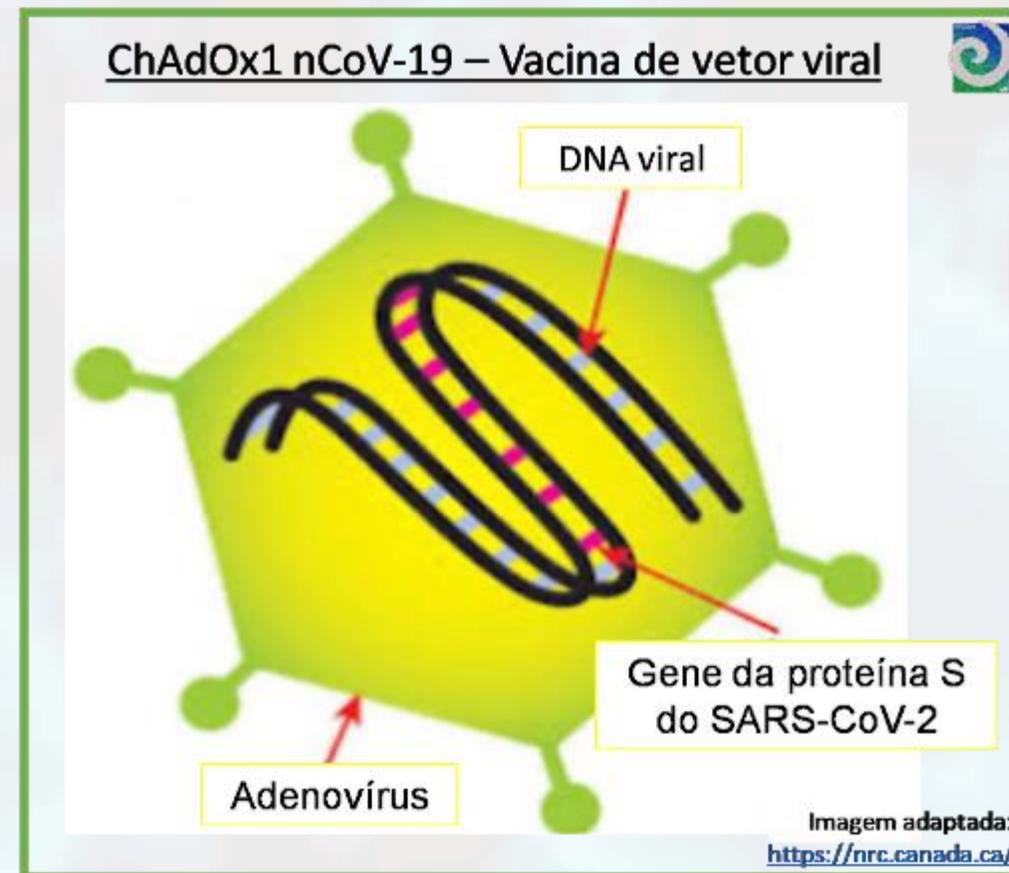
## A Biotecnologia no Desenvolvimento da vacina para SARS-CoV-2)

### Tecnologia de vacinas Vetoriais Não replicante

- A) Oxford/Astrazenica – duas doses com intervalo de 4 semanas. Eficácia 62%
- B) Sputnik-V – duas doses com intervalo de 21 dias. Eficácia 91,4%
- C) Johnson & Johnson – uma dose, eficácia (72% nos EUA; 66% (Am. Lat.) e 57% África do Sul
- D) CanSino Biological – sem especificação de eficácia.

Mitos: vacina vetorial não replicante modifica o DNA da célula; tem chip de código genético representando o 666.

Verdades: não poderá ter outra vacina na mesma plataforma.

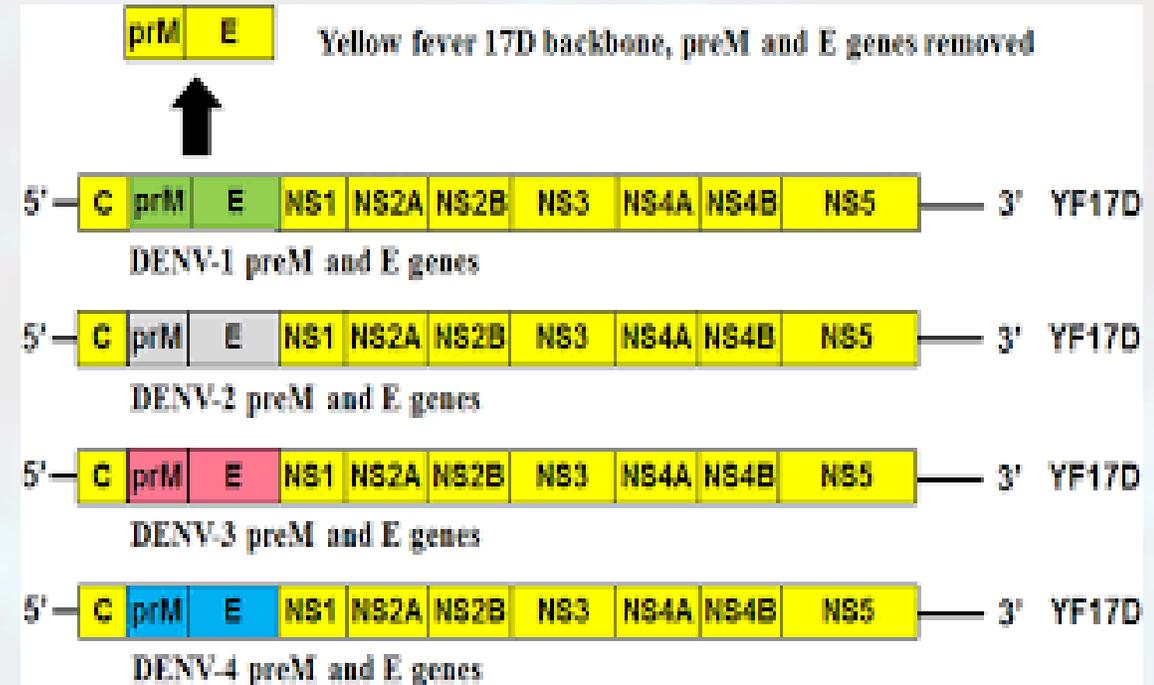




## A Biotecnologia no Desenvolvimento da vacina para SARS-CoV-2)

### Tecnologia de Vacinas Vetoriais Replicante

- A) Consiste na escolha de um vírus patogênico atenuado ou não, com modificação gênica para expressão da proteína de interesse;
- B) O vírus modificado geneticamente tem capacidade de replicação em cultivo celular e moderada capacidade de replicação no organismo hospedeiro;
- C) A intenção é criar dois tipos de anticorpos, um para o vetor viral e outro para a proteína de interesse a ser expressa na célula do hospedeiro.
- D) Ex: vacina da Dengue – vetor – vírus da febre amarela; Ebola – vetor – vírus da estomatite vesicular



doi: 10.1111/nyas.12413



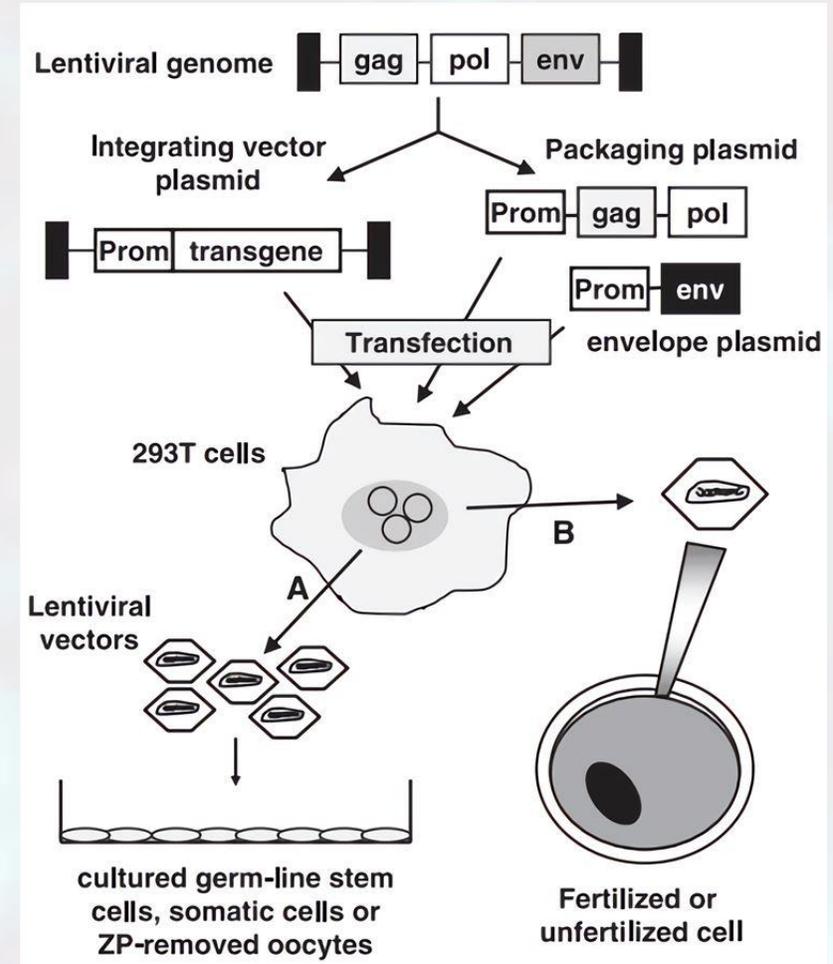
## A Biotecnologia no Desenvolvimento da vacina para SARS-CoV-2)

### Tecnologia de Vacinas Vetoriais Replicante

Institute Pasteur/Themis/Univ. of Pittsburg  
CVR/Merck Sharp & Dohme, vetor baseado no vírus do sarampo, duas imunizações com intervalo de 28 dias. Estudo de fase I em andamento.

Mitos – Leva a modificação genética da célula, tornado se um ser geneticamente modificado.

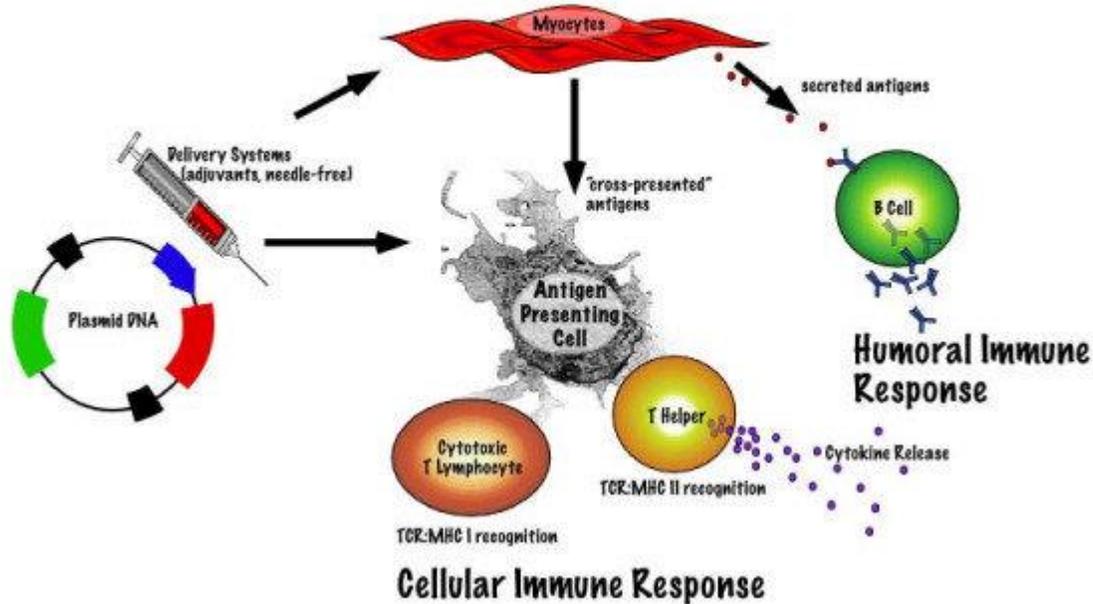
Verdades – imuniza contra duas doenças, sarampo e covid; não pode ser aplicada em gestantes e imunocomprometidos.





## A Biotecnologia no Desenvolvimento da vacina para SARS-CoV-2)

### Mechanisms of Action of DNA Vaccines



doi:10.1186/1476-8518-7-3

### Tecnologia de Vacinas de DNA

Malone & Felgner da Vical Incorporated e Wolf e col. da Universidade de Wincosin demonstraram que mRNA obtidos por DNA circular dupla fita injetados em tecido muscular resultavam na expressão e produção de proteínas.

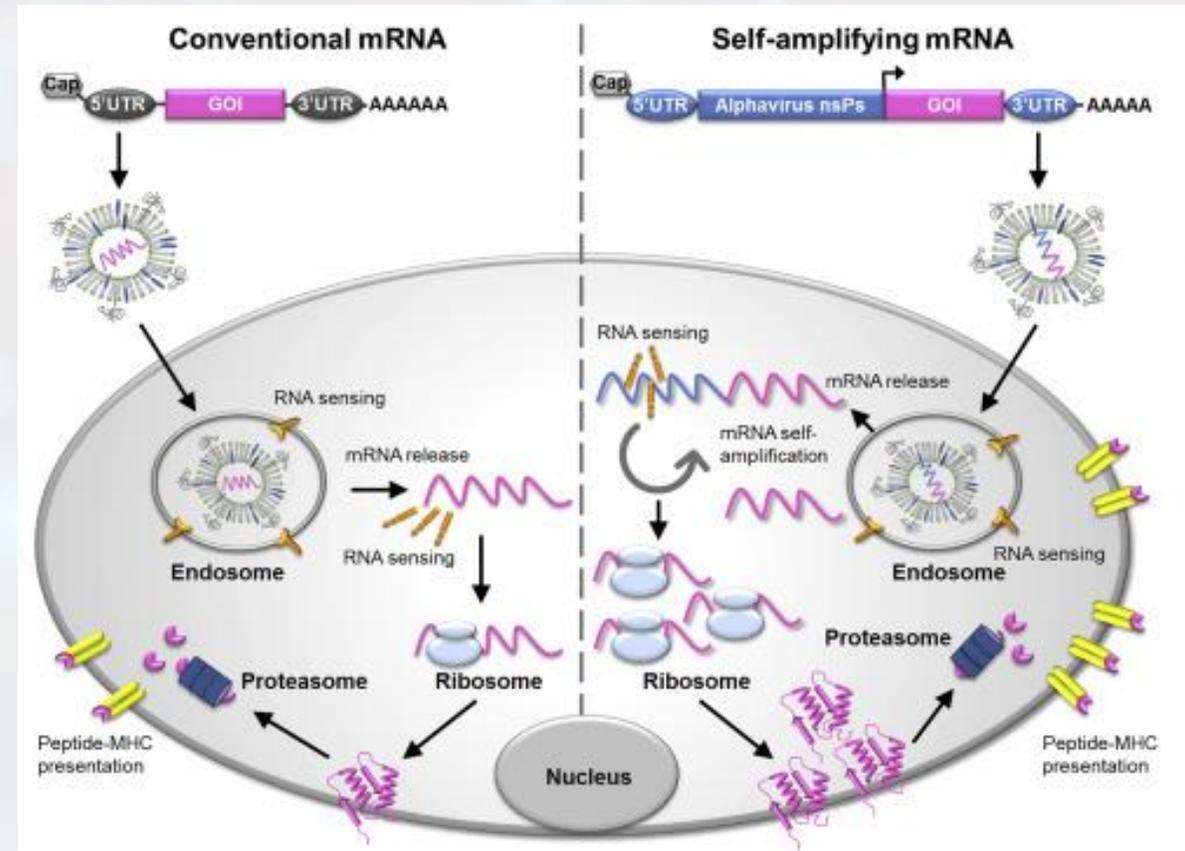
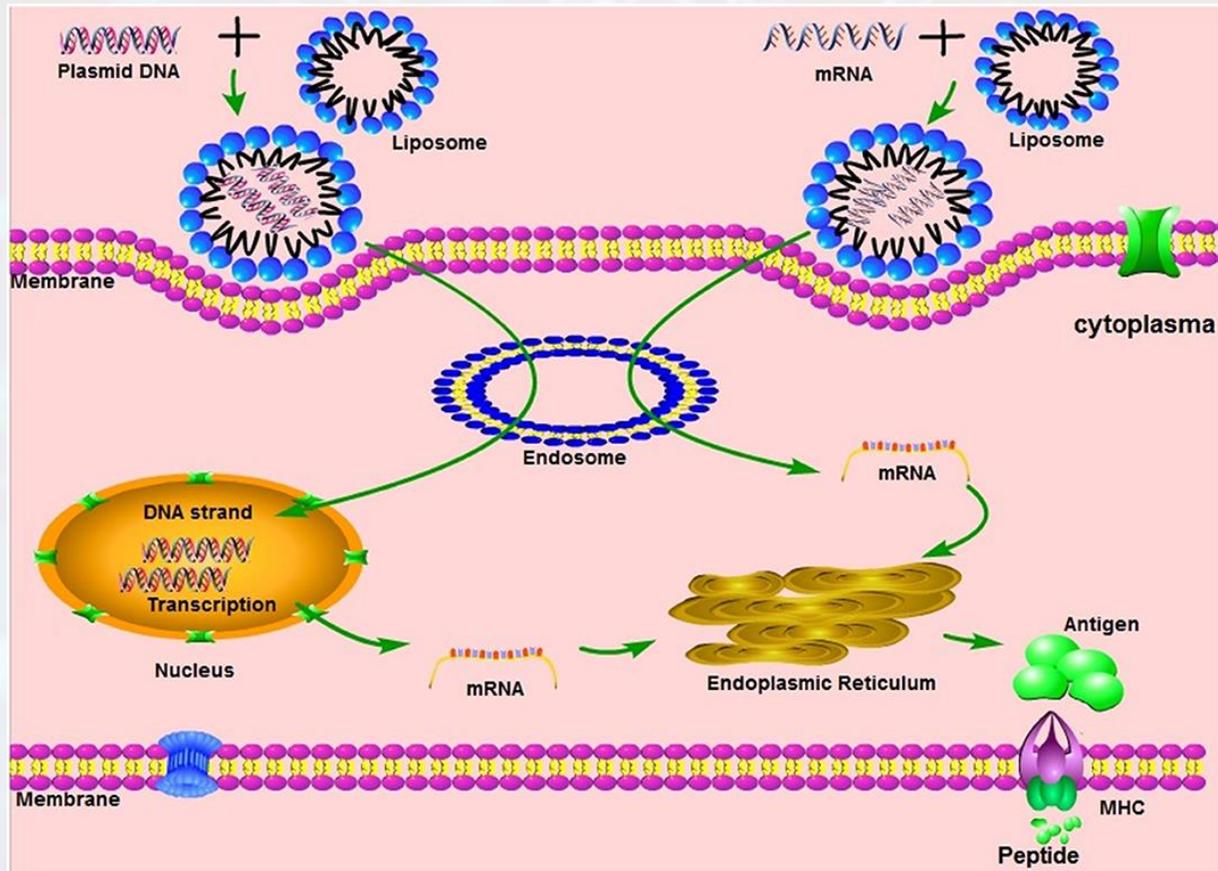
Mais de 20 grupos comprovaram que a inoculação de DNA circular leva a expressão de antígeno e consequentemente a uma resposta imunológica.

As vacinas de DNA requerem estratégias para uma boa produtividade e resposta imune, sendo elas: a) escolha do promotor (geralmente um promotor viral seguida por uma sequência Kozak – sitio de ligação ribossomal); b) melhoria de códons e c) formulação e adjuvante.



## A Biotecnologia no Desenvolvimento da vacina para SARS-CoV-2)

### Tecnologia de Vacinas de RNA



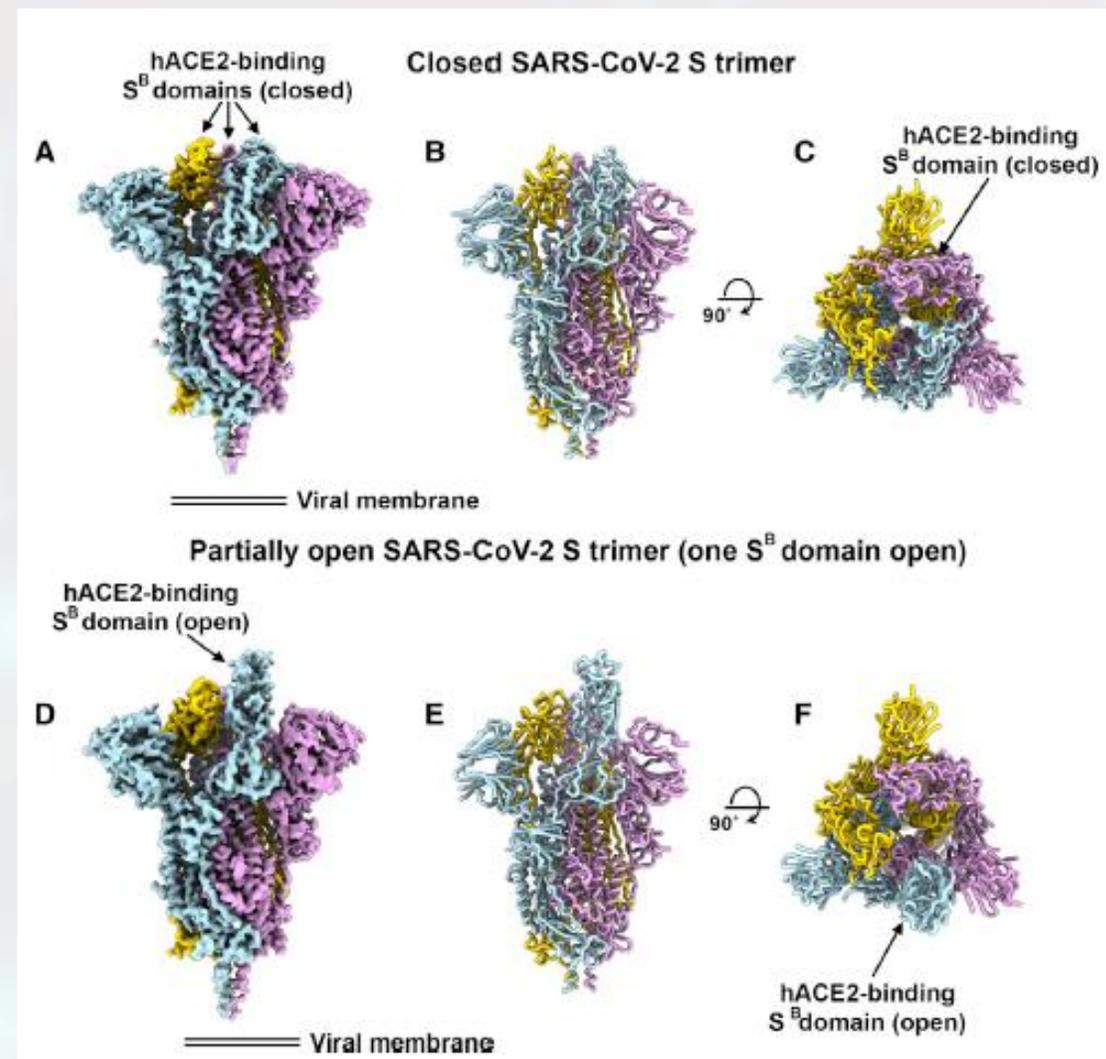
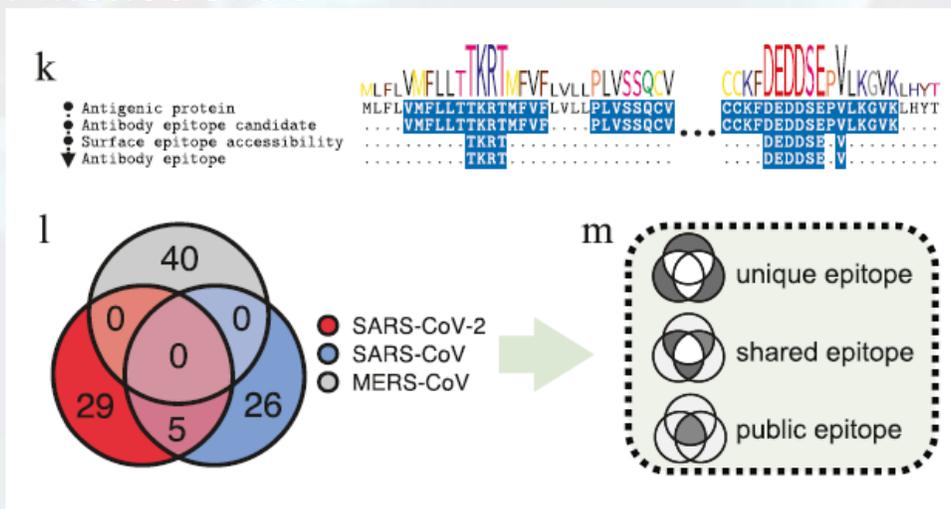


## A Biotecnologia no Desenvolvimento da vacina para SARS-CoV-2)

### Tecnologia de Vacinas por Subunidade de Proteína

Existem muitas tecnologias para expressão de proteínas para o SARS-CoV-2, mas todos os trabalhos estão baseados em três tipos de produto:

- Proteína S (Spike protein);
- RDB (receptor binding-domain)
- Peptídeos sintéticos de epítomos reconhecidos por monoclonais.





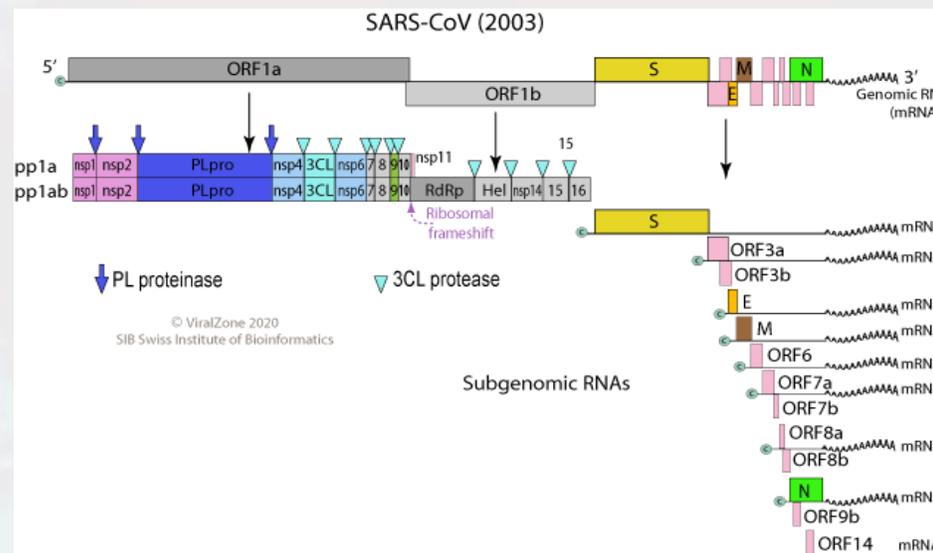
## A Biotecnologia no Desenvolvimento da vacina para SARS-CoV-2

### Tecnologia de vacinas Vivas atenuadas

Uma vacina viva atenuada é uma vacina desenvolvida pela redução da virulência de um patógeno, mas ainda mantendo se viável.

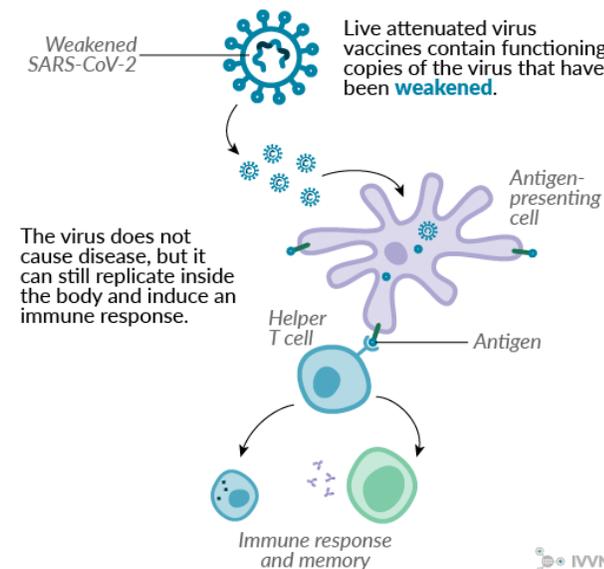
As proteínas CoV E compartilham várias características com proteínas de outros vírus que funcionam como canais iônicos.

Em contraste, a proteína E do CoV é crítica, mas não essencial para a replicação do vírus, porque um mutante do CoV no qual o gene E foi deletado cresce em cultura de células em títulos que são pelo menos 3 ordens de magnitude mais baixos do que os vírus do tipo selvagem recombinante .



doi: 10.1016/j.jsb.2010.11.021

### Live attenuated virus vaccines





## A Biotecnologia no Desenvolvimento da vacina para SARS-CoV-2)

### Tecnologia de vacinas inativadas

É a tecnologia mais simples de produção de vacina.

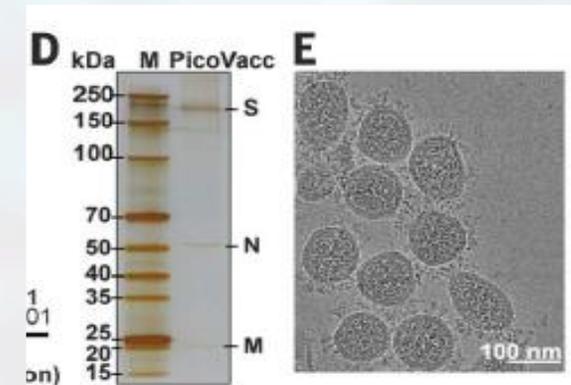
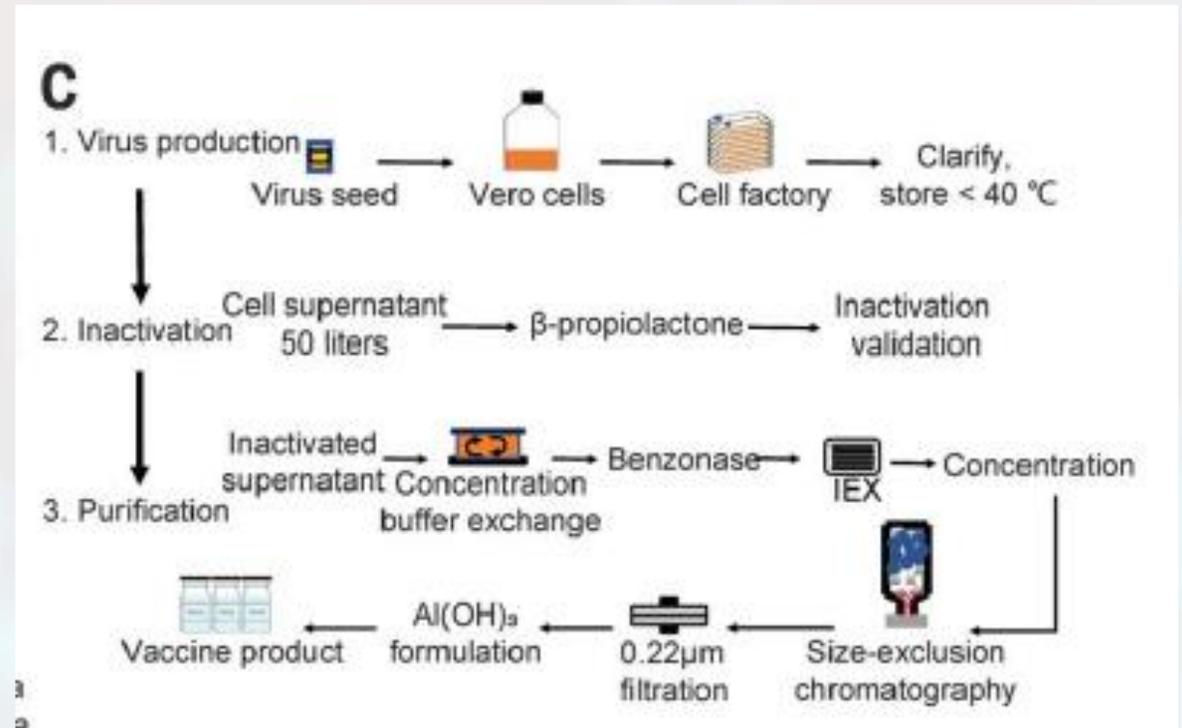
Consiste em cultivar o vírus em um sistema celular (célula de linhagem).

Para o SARS-CoV-2 a célula de escolha é a VERO E6, que apresenta grande quantidade de receptor ACE2 (<https://doi.org/10.1101/2020.04.20.049924>).

É a mesma tecnologia para a vacina de raiva inativada, Influenza e ou Hepatite A.

A inativação pode ser feita com  $\beta$ -propilactona ou com formaldeído.

É necessário a adição de adjuvantes.





## A Biotecnologia no Desenvolvimento da vacina para SARS-CoV-2)

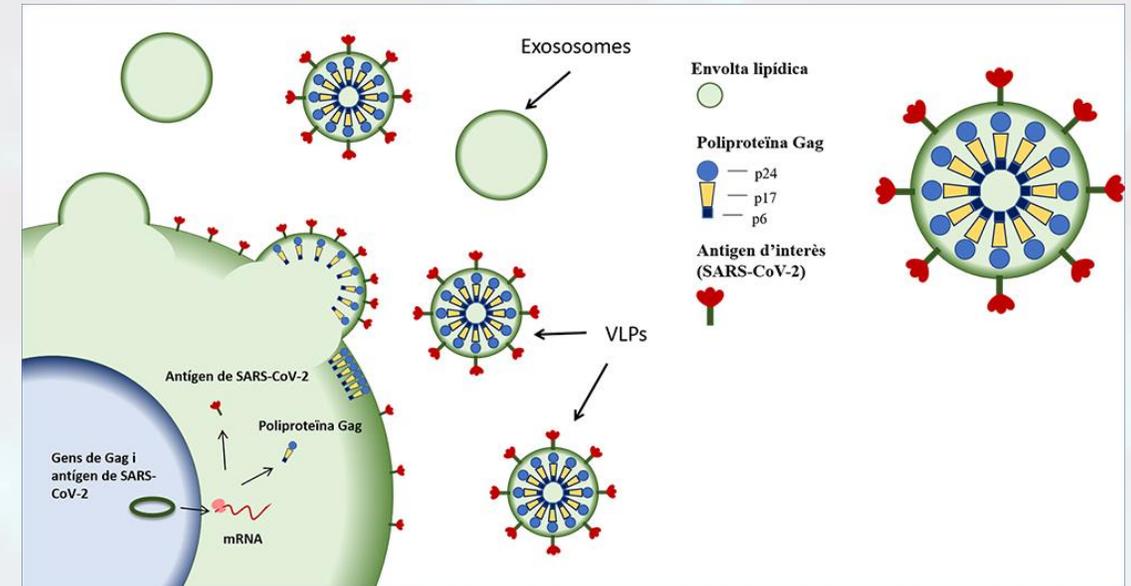
### Tecnologia de Vacinas em VLP (Virus Like Particle)

VLPs são moléculas muito semelhantes a vírus, mas não são infecciosas porque não contêm material genético viral. Eles podem ocorrer naturalmente ou ser sintetizados por meio da expressão individual de proteínas estruturais virais, que podem então se auto montar na estrutura semelhante a vírus

Podem ser estruturadas em uma matriz extracelular (liposofo-lipídica) que ancora peptídeos ou proteína do SARS-CoV-2.

Deve ter ação semelhante a vacina inativada.

O alvo celular são as células apresentadoras de antígenos.



<https://www.nanbiosis.es/a-recombinant-sars-cov-2-vaccine/>

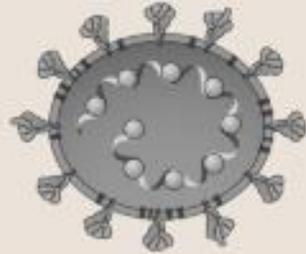


## A Biotecnologia no Desenvolvimento da vacina para SARS-CoV-2)

### Classical platforms

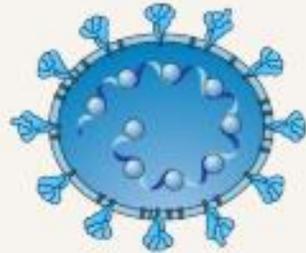
#### Whole-inactivated virus

Example: Polio vaccine  
COVID-19:  
PiCoVacc in phase 1  
clinical trials



#### Live-attenuated virus

Example: MMR vaccine  
COVID-19:  
in preclinical stage



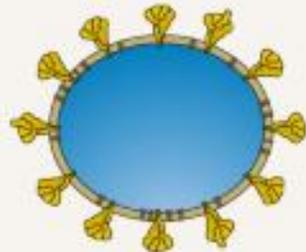
#### Protein subunit

Example: Seasonal  
influenza vaccine  
COVID-19:  
NVX-CoV2373 in  
phase 1/2 clinical trials



#### Virus-like particle

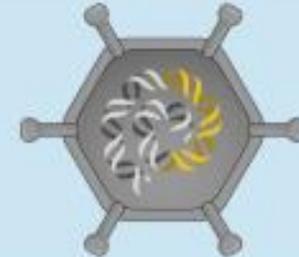
Example: Human  
papillomavirus vaccine  
COVID-19:  
in preclinical stage



### Next-generation platforms

#### Viral vector

Example:  
VSV-Ebola vaccine  
COVID-19:  
AZD1222, Ad5-nCoV  
in phase 1/2/3 clinical trials



#### DNA

Example:  
Not currently licensed  
COVID-19:  
INO-4800 in phase 1  
clinical trials



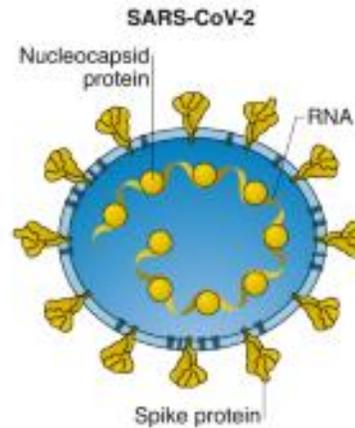
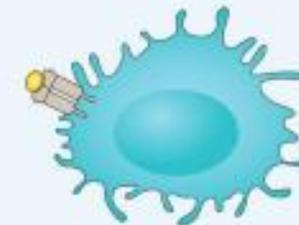
#### RNA

Example:  
Not currently licensed  
COVID-19:  
mRNA-1273, BNT162  
in phase 1/2 clinical trials



#### Antigen-presenting cells

Example:  
Not currently licensed  
COVID-19:  
LV-SMENP-DC,  
COVID-19/aAPC  
in phase 1/2 clinical trials

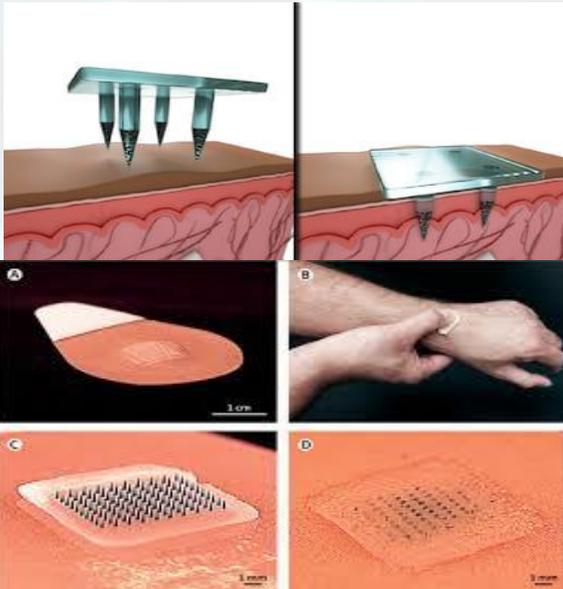




## A Biotecnologia no Desenvolvimento da vacina para SARS-CoV-2)

### Quanto a via de Inoculação

- a) Parenteral
  - Injetável
  - Subcutânea
  - Intradérmica
- b) Oral
- c) Nasal
- d) Ocular

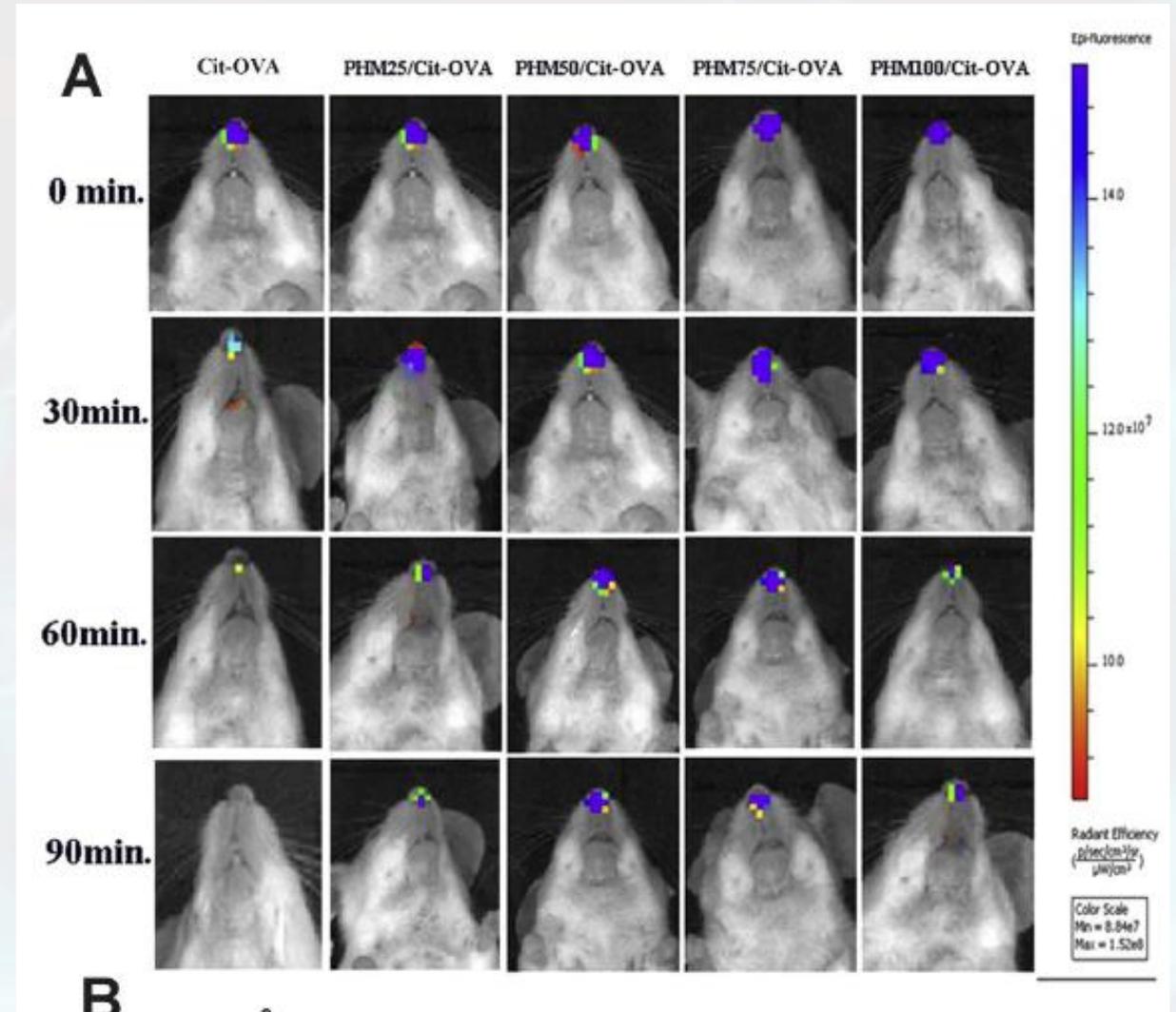




## A Biotecnologia no Desenvolvimento da vacina para SARS-CoV-2)

A Imunização Nasal requer duas características importante:

- 1ª Alta concentração de antígeno (5 a 10 X mais que injetável)
- 2ª Tempo de residência na cavidade nasal superior a 90 min.





## A Biotecnologia no Desenvolvimento da vacina para SARS-CoV-2)

É importante conhecer a capacidade volumétrica da cavidade nasal, bem como a área de superfície.

TABLE 1

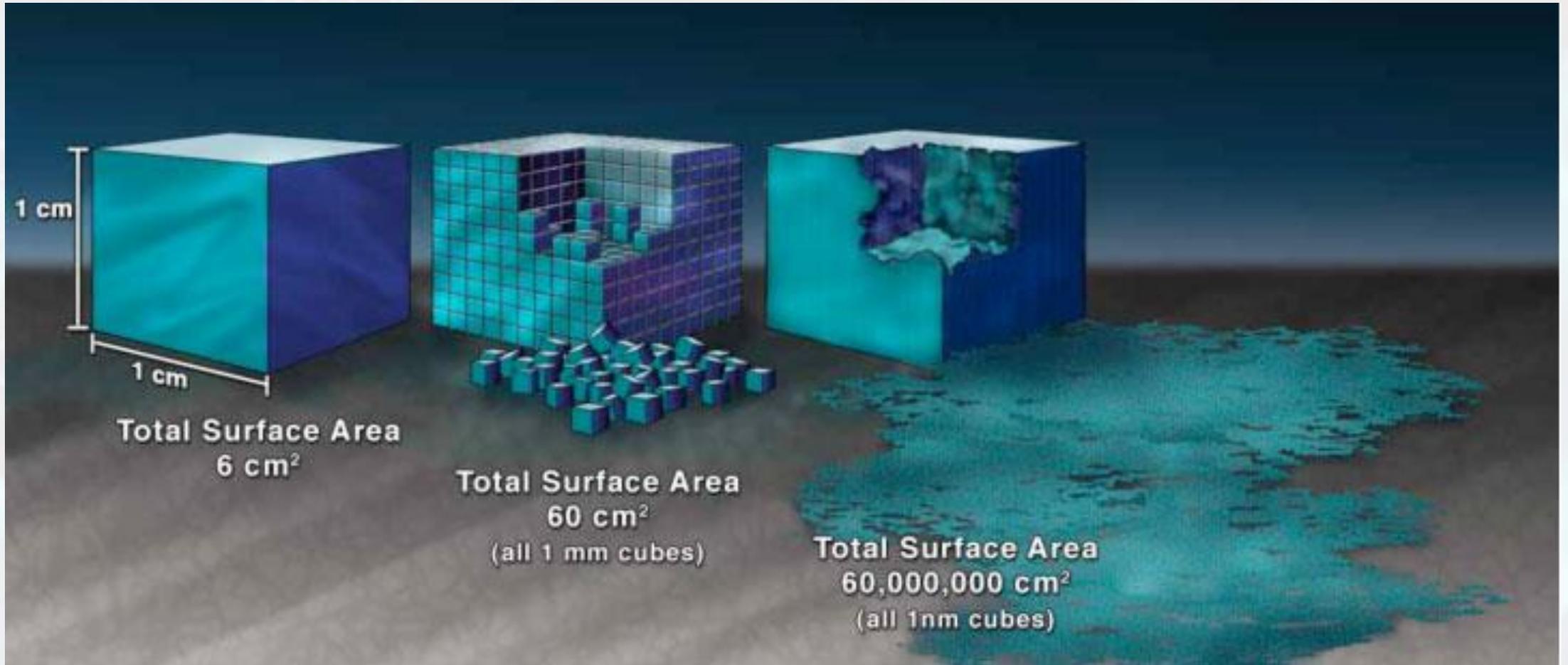
Species	Bodyweight (kg)	Nasal Cavity Volume (NCV) (cm <sup>3</sup> )	Nasal Cavity Surface Area (NCSA) (cm <sup>2</sup> )	Relative Surface Area (NCSA/NCV) (cm <sup>-1</sup> )	Olfactory Epithelium (% of NCSA)	Olfactory Epithelium (cm <sup>2</sup> )
Mouse	0.03	0.03	25	96.3	47	1.37
Rat	0.25	0.26	13.4	51.5	50	6.75
Rabbit	3	6	61	10.2	10	6
Human	70	25	160	6.4	8	12.5

**Nasal Cavity Differences Among Species**



## A Biotecnologia no Desenvolvimento da vacina para SARS-CoV-2)

### Por que usar a Nanotecnologia?

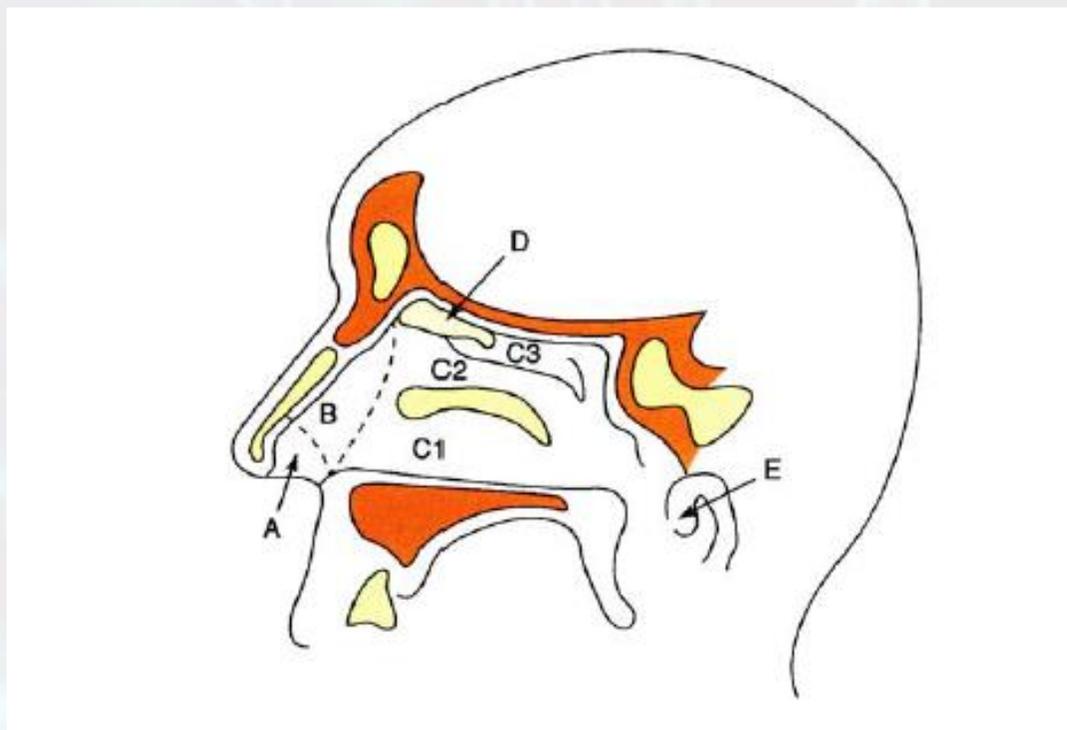




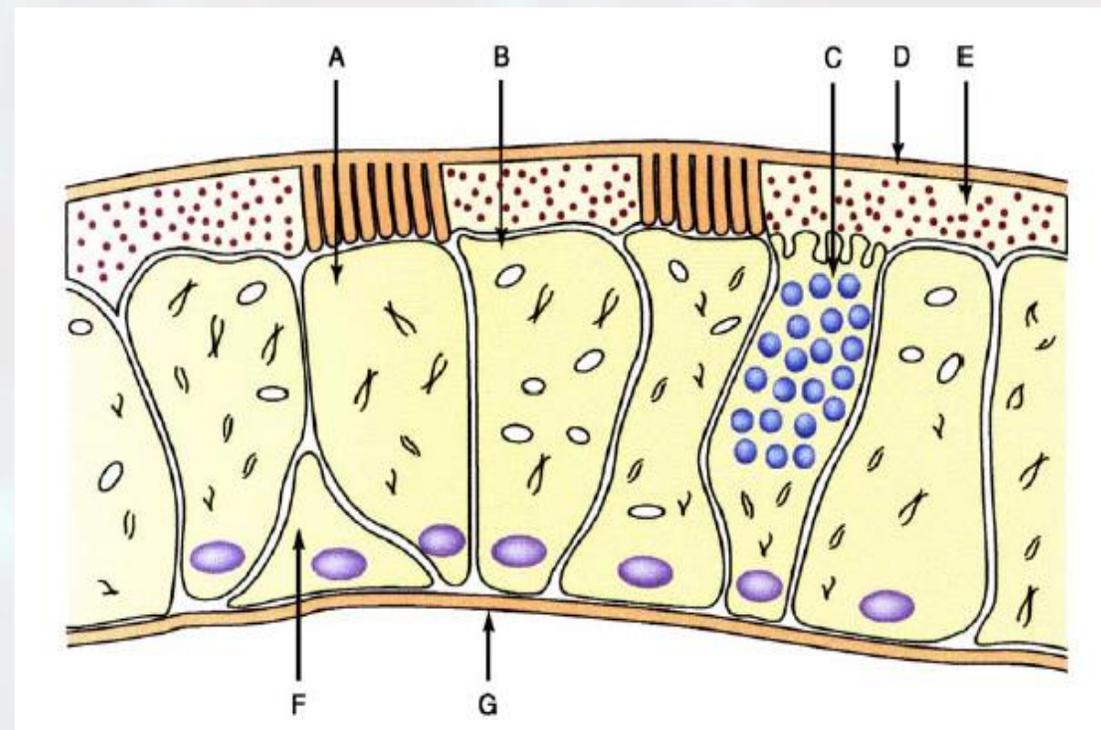
## A Biotecnologia no Desenvolvimento da vacina para SARS-CoV-2)

### É possível uma vacina de Spray Nasal?

Sim é possível, temos um sistema imunológico bem desenvolvido no nariz.



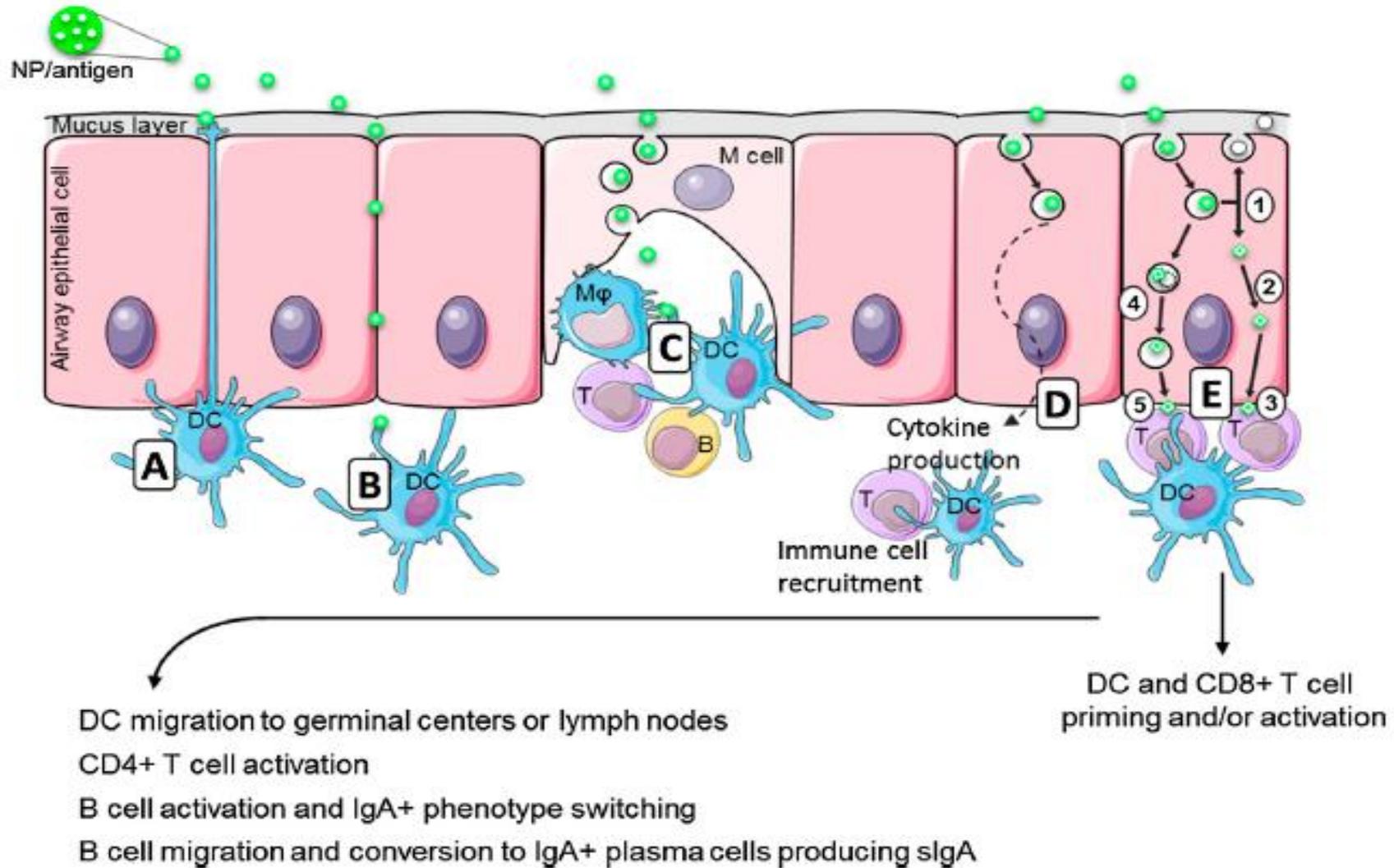
A - Vestibulo Nasal; B- Atrium; C Região Respiratória (C1 – Concha Inferior. C2 Concha Média; C3 – Concha superior); D – região ofatória; E Nasofaringe.



A – Célula ciliada; B – célula não ciliada, C - células de globet; D - camada de gel mucoso; E - camada sol; F – células basais; G membrana basal.

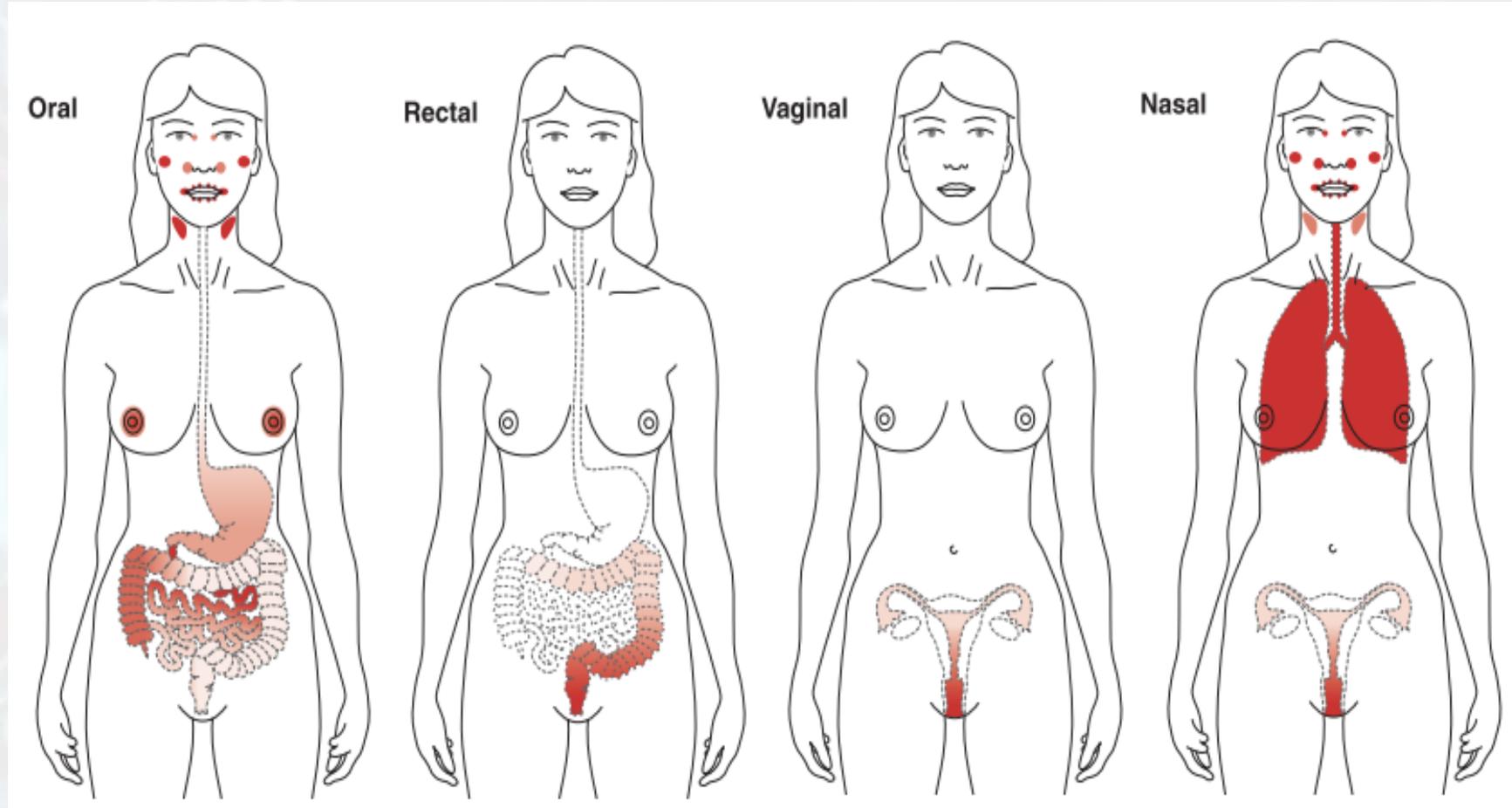


## A Biotecnologia no Desenvolvimento da vacina para SARS-CoV-2)

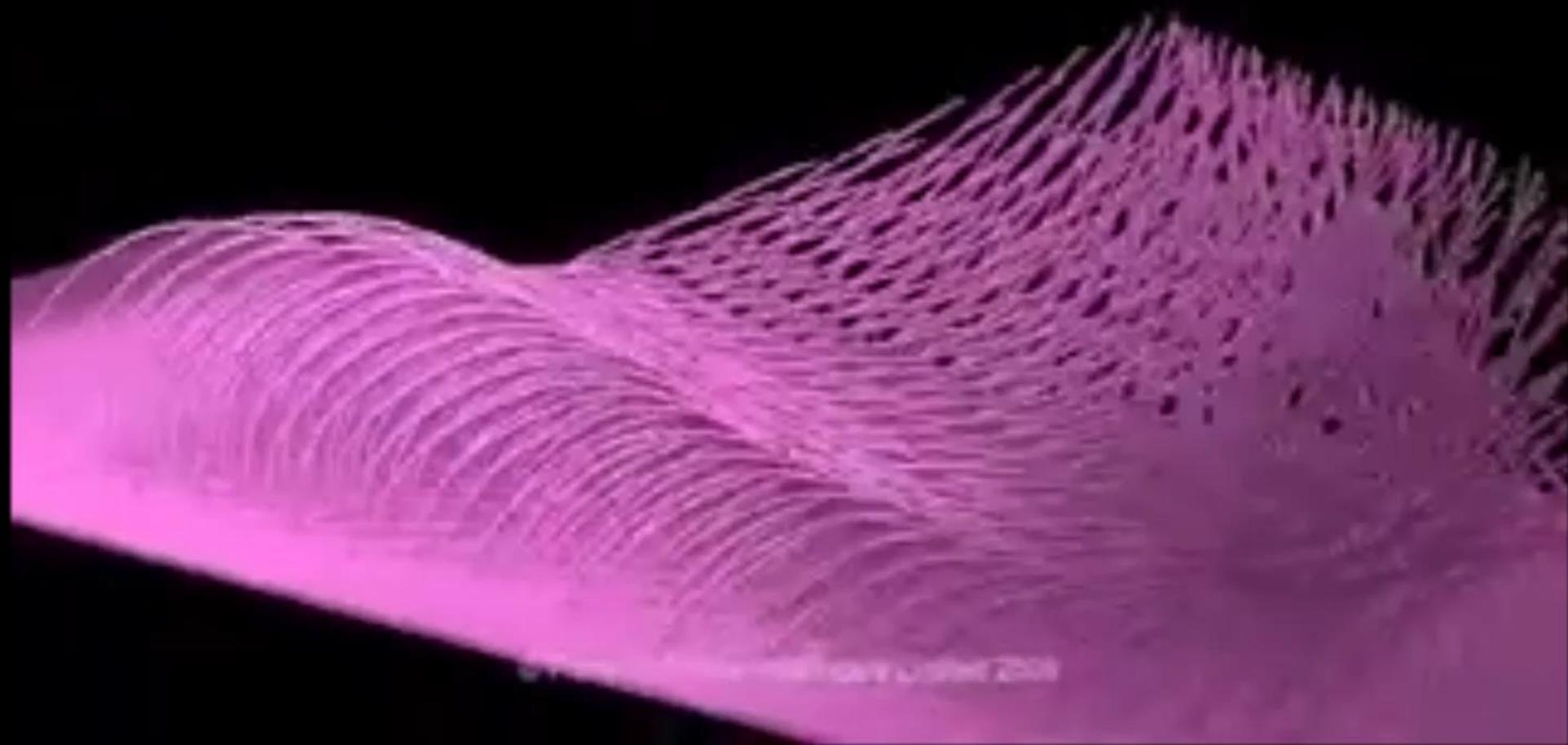




## A Biotecnologia no Desenvolvimento da vacina para SARS-CoV-2)

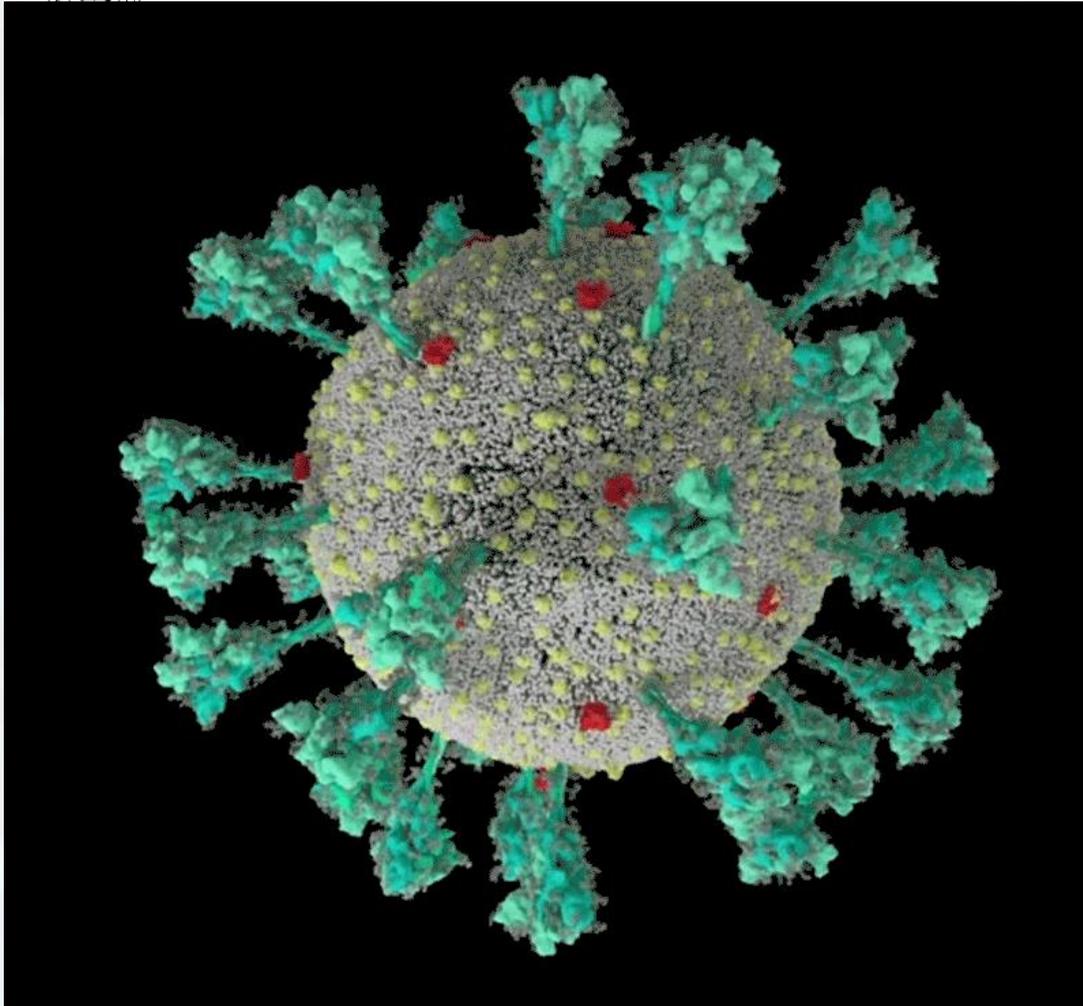


<https://doi.org/10.1038/nm1213>



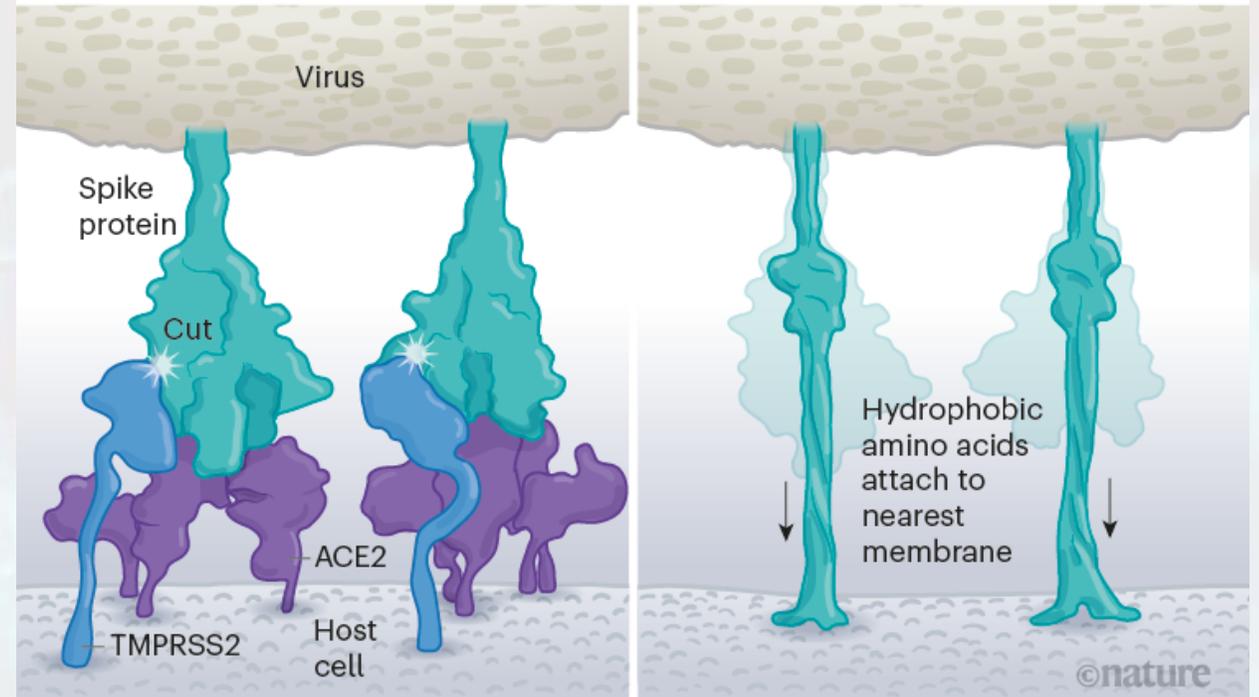


## A Biotecnologia no Desenvolvimento da vacina para SARS-CoV-2)



### VIRAL ENTRY UP CLOSE

Virus and host-cell membranes fuse after the TMPRSS2 enzyme cuts a SARS-CoV-2 spike protein. This exposes hydrophobic amino acids in the spike that rapidly embed themselves into the nearest membrane — that of the host cell.





## A Biotecnologia no Desenvolvimento da vacina para SARS-CoV-2)

### LIFE CYCLE OF THE PANDEMIC CORONAVIRUS

A simplified account of how SARS-CoV-2 enters and exits cells.

#### Stage 1: Viral entry

The virus's spike protein binds to a receptor on the host cell called ACE2. Then, the host molecule TMPRSS2 cleaves the spike protein, exposing parts that fuse the viral membrane with that of the host.



TMPRSS2

ACE2

TMPRSS2 cuts the spike protein

#### Stage 2: Inside the cell

Viral RNA is translated into non-structural proteins (NSPs) that quickly suppress the translation of host messenger RNAs in favour of those belonging to the virus.

Endoplasmic reticulum (ER)

Viral proteins (NSPs)

NSPs

Ribosome

ER remodelling

DMVs

Viral RNA

The spikes unravel and pull the membrane of the virus and host cell together

#### Stage 3: Remodelling the cell

The virus transforms the cell's ER — an internal membrane network — into bubble-like structures called double-membrane vesicles (DMVs). These might provide a safe haven for more viral RNA to be replicated and translated.

Golgi apparatus

Furin cut

#### Stage 4: Exit

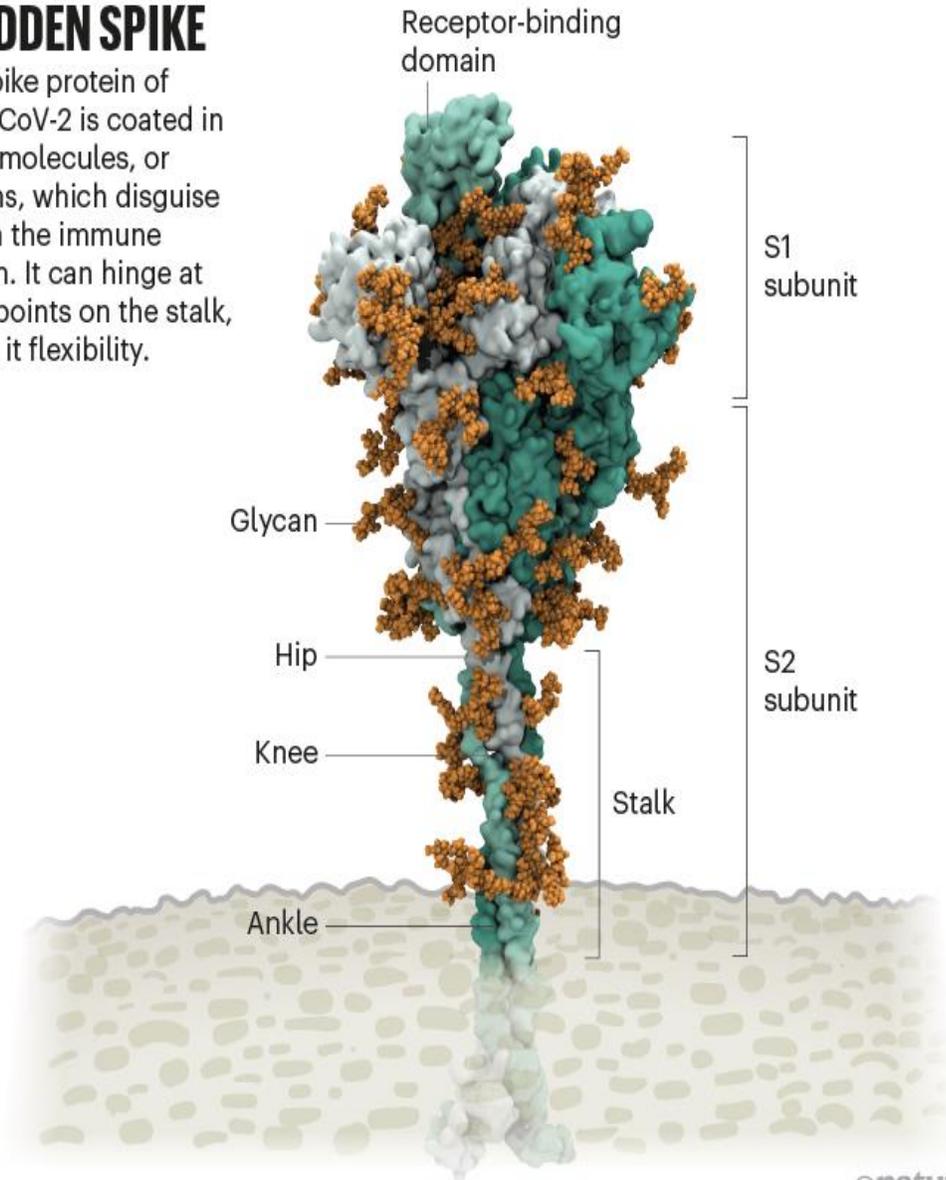
Once the newly made molecules assemble into a complete virus particle, this leaves the cell through an organelle called the Golgi apparatus, or perhaps through lysosomes, which are cellular rubbish bins.

#### Stage 5: The last slice

A host enzyme named furin makes a crucial cut at a site of five amino acids on the spike protein. This prepares the virus to strike another cell. Variants have a higher proportion of snipped spike proteins, helping them to infect cells more efficiently.

### A HIDDEN SPIKE

The spike protein of SARS-CoV-2 is coated in sugar molecules, or glycans, which disguise it from the immune system. It can hinge at three points on the stalk, giving it flexibility.





## A Biotecnologia no Desenvolvimento da vacina para SARS-CoV-2)

CD4+ and  
CD8+ T cell  
epitopes  
( several  
versions –  
different  
numbers of  
epitopes, WT  
or mutant T  
cell epitopes'

# Vaccinal antigens Covid- Incor

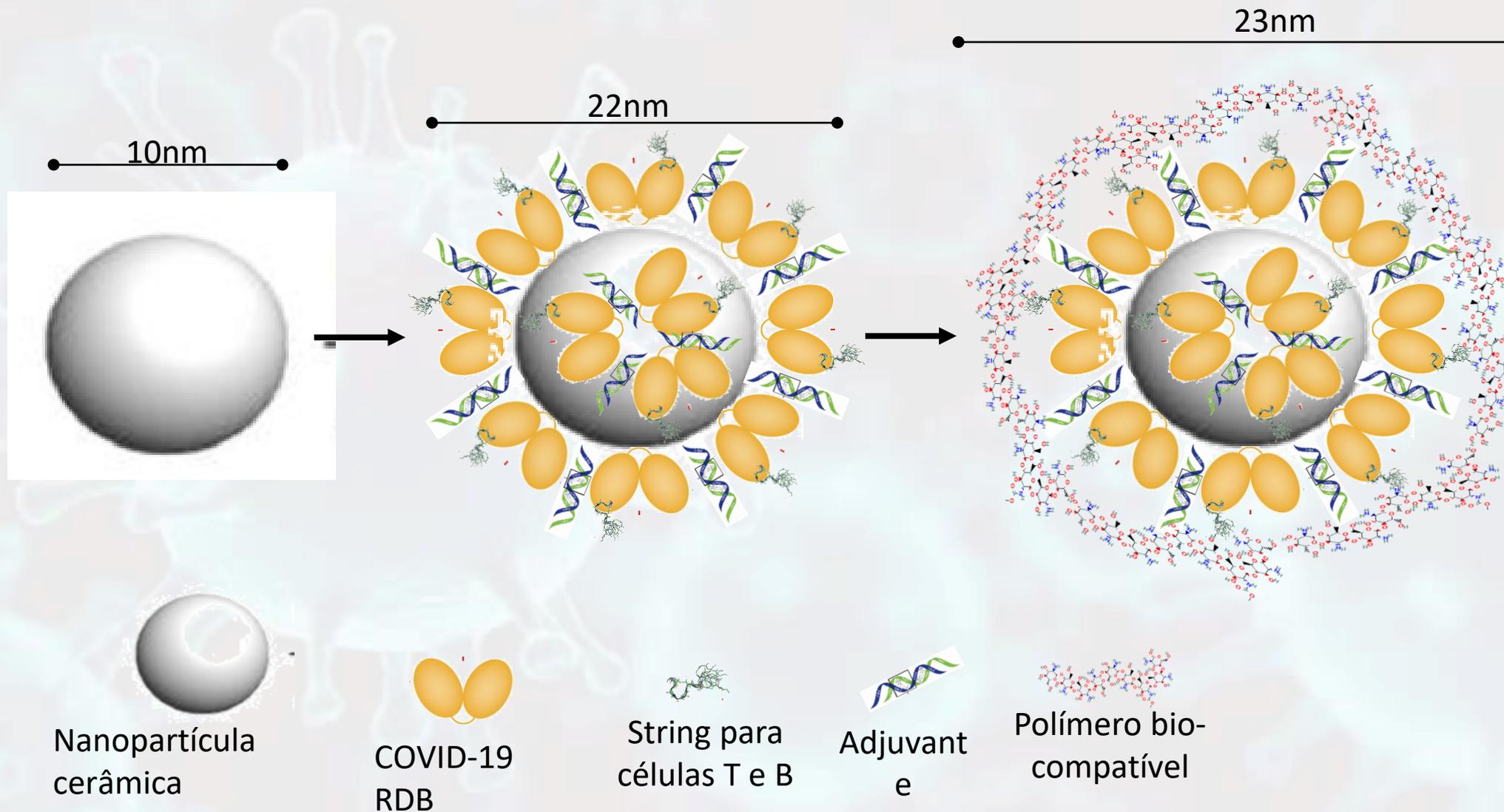
Inserts Encoded in pCDNA3 plasmids



RBD dimer with/without variants



## A Biotecnologia no Desenvolvimento da vacina para SARS-CoV-2)





**A Biotecnologia no Desenvolvimento da vacina para SARS-CoV-2)**  
Desenvolvimento Farmacêutico    Transferência de Tecnologia    Produção Comercial    Descontinuação do Produto

**BPF**

**Gerenciamento das Responsabilidades**

**Elementos de PQS (Pharmaceutical Quality System)**  
Desempenho do produto, Monitoramento do Sistema de Qualidade do Produto; Sistemas de: Ação de Correção/Ação de Prevenção (CA/PA); Sistema de Gerenciamento de Mudança e Revisão do Gerenciamento.

**Facilitadores**  
Gerenciamento do Conhecimento  
Gerenciamento da Qualidade de Risco

Descoberta e Pesquisa

Desenvolvimento não Clínico

Desenvolvimento Clínico  
Fase I, II e III

Ação Pós-Registro,  
Gerenciamento do Ciclo de Vida e Farmacovigilância



## A Biotecnologia no Desenvolvimento da vacina para SARS-CoV-2)

