

## **A tecnologia do ADN recombinante aplicada ao desenvolvimento de vacinas, com especial destaque para o contexto da COVID-19**

Surtos, epidemias e pandemias são responsáveis por grandes alterações económicas, políticas, e sociais, permitindo igualmente um elevado desenvolvimento científico e tecnológico. Ao longo da história, estes eventos têm-se vindo a intensificar devido ao aumento na mobilidade entre populações, o que se traduz num aumento das cadeias de transmissão de agentes infecciosos. Oficialmente declarada pandemia em 11/03/2020 pela Organização Mundial de Saúde (OMS), a COVID-19 assume-se, provavelmente, como o acontecimento global mais marcante desde a segunda guerra mundial, provocando uma alteração dos hábitos de vida de grande parte da população mundial, sem precedentes na história contemporânea. Volvidos mais de três anos e após a OMS ter declarado o fim da COVID-19 como emergência de saúde global (05/05/2023), torna-se claro que esta pandemia aumentou a consciencialização acerca da importância do desenvolvimento de métodos rápidos e efetivos que permitam controlar a propagação de doenças infecciosas, dos quais importam destacar as estratégias de vacinação. Entre outras, a tecnologia do ADN recombinante e os bioprocessos no domínio da biotecnologia vermelha são essenciais para o desenvolvimento e produção de vacinas. O desenvolvimento desta tecnologia bem como o seu contributo para a produção de vacinas de ADN plasmídico e subunidades de proteínas é enfatizado neste trabalho. Esta revisão é ainda complementada com uma breve resenha histórica do desenvolvimento das vacinas, os diferentes tipos de vacinas existentes e uma visão global da sua aplicação no controlo da COVID-19.

### **Palavras-chave**

doença infecciosa  
ADN plasmídico  
subunidade de proteínas  
antígeno  
bioprocessos

Leonor S. Castro<sup>1</sup>

Mara G. Freire<sup>1</sup>

Augusto Q. Pedro<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>CICECO – Instituto de Materiais de Aveiro,  
Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal.

\* apedro@ua.pt

ISSN 1647-323X

Artigo em acesso aberto sob [licença CC-BY](#)

© 2021 Autores



## Descoberta e Desenvolvimento de Vacinas

Historicamente, tem-se verificado que o aparecimento de surtos epidémicos de doenças infecciosas conduz a grandes alterações a nível económico, social, político e científico. Todos os anos a Organização Mundial de Saúde (OMS) relata o aparecimento de surtos epidémicos. Desde 2009, a OMS declarou 5 pandemias, nomeadamente, a da gripe suína em 2009 (H1N1), do MERS-CoV em 2012, do Ébola em 2013, do vírus ZIKA em 2015 e da COVID-19 em 2020 [1]. Embora pequenos surtos possam ser contidos rapidamente, dependendo do agente infeccioso e da sua capacidade de transmissão, o número de mortes pode aumentar rapidamente devido à falta de métodos eficazes que previnam a sua disseminação, bem como de tratamentos eficientes. Atualmente, a globalização permite uma maior conectividade e mobilidade entre as diversas populações, a qual juntamente com a disrupção causada por fenómenos naturais fruto das alterações climáticas, tais como cheias, furacões, secas, facilita o aparecimento e a propagação de doenças infecciosas [2].

Uma das ferramentas mais eficazes para controlar a propagação de doenças infecciosas é através da vacinação [3]. Segundo a OMS, a vacinação consiste na estimulação do sistema imune, quer por um agente infeccioso (ou apenas alguns dos seus componentes), quer por um agente infeccioso modificado. Este agente não deve provocar a doença, mas no momento do contacto entre o hospedeiro e o agente infeccioso, o sistema imune deve ser capaz de o neutralizar [4]. A introdução da vacinação na medicina é por isso considerado um dos passos mais revolucionários da história, permitindo uma redução significativa do número de mortes provocadas por doenças infecciosas [5], com a OMS a estimar que, atualmente, a imunização previna cerca de 3,5-5 milhões de mortes anualmente [6].

Ao longo da história e desde as primeiras descrições acerca do conceito de inoculação, a evolução científica associada às vacinas, permitiu a erradicação de diversas doenças, estando algumas das principais descobertas neste campo sumariadas na Figura 1.

No início do século XVIII, foi reportado no império otomano o processo de “variolação”, designado também por inoculação. Este consistia na recolha de pus de uma bolha de varíola, o qual era posteriormente introduzido subcutaneamente na pele de um indivíduo não infetado para conferir proteção [7]. Posteriormente, Edward Jenner, reconhecido como pioneiro a reportar o conceito de vacina, introduziu o processo de imunização, que se baseou na constatação de que indivíduos que tinham sido previamente infetados pelo vírus da varíola bovina, não contraíam a doença na sua variante humana e por isso se encontravam imunizados e protegidos contra a varíola.

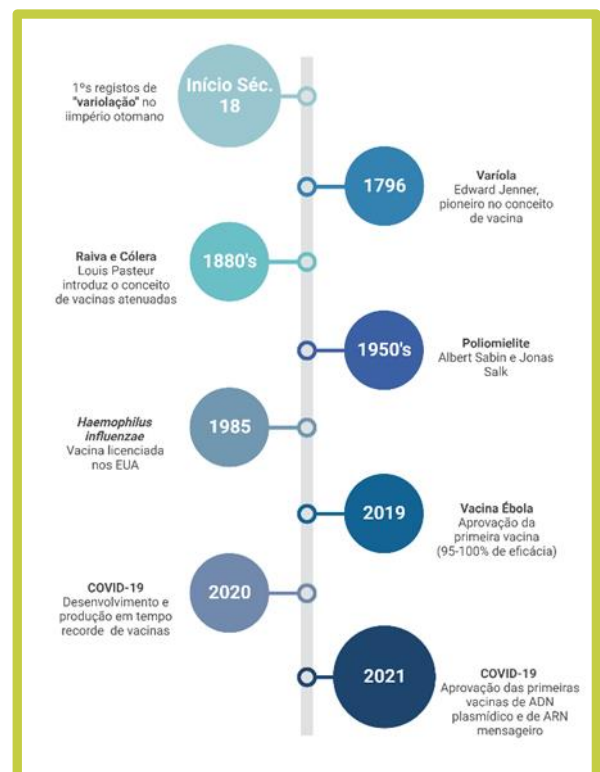


FIGURA 1: Cronograma e perspetiva histórica do desenvolvimento de vacinas. Criado com BioRender.com e adaptado de [7].

Em maio de 1796, Edward Jenner encontrou uma jovem leiteira, Sarah Nelms, com lesões frescas provocadas pela varíola bovina. Utilizando material destas lesões, inoculou uma criança de 8 anos, James Phipps. Alguns dias após a inoculação, James Phipps desenvolveu febre ligeira, desconforto nas axilas e perda de apetite, mas recuperando após alguns dias. Em julho de 1796, Phipps voltou a ser inoculado com novo material proveniente de lesões de varíola e não desenvolveu a doença [8]. Estas observações deram origem, em 1796, ao primeiro ensaio clínico conhecido, e que mais tarde viria a conduzir à erradicação da doença [8].

Em 1878, décadas após serem dados os primeiros passos na imunização, foram desenvolvidas as vacinas atenuadas por Louis Pasteur contra a cólera aviária [9]. Nesta altura, milhares de galinhas encontravam-se a morrer num intervalo de 48h, e após obter sucesso na cultura do agente causador da doença, *Pasteurella multocida*, Pasteur observou que culturas mais antigas perdiam a sua virulência e que galinhas inoculadas com culturas mais antigas se encontravam protegidas contra a estirpe virulenta [9,10]. Além disso, verificou-se que apesar de algumas das galinhas sobreviverem, excretavam ainda formas virulentas da bactéria, indicando assim a existência de portadores saudáveis e explicando o conceito da transmissão de germes durante epidemias [9,10]. Pasteur foi também responsável por desenvolver a vacina contra a raiva em 1885, sendo esta a descoberta pela qual se tornou mais conhecido e que foi essencial para reduzir a mortalidade da doença de 40% para 0,5% após a vacinação [9].

Anos mais tarde, foi introduzida uma nova geração de vacinas por Albert Sabin e Jonas Salk, para conferir proteção contra várias estirpes do agente infeccioso causador da poliomielite. No caso de Albert Sabin, este utilizou três estirpes vivas atenuadas de poliovírus para desenvolver uma vacina oral, enquanto Jonas Salk utilizou três estirpes inativadas do vírus para formular uma vacina injetável [11]. A utilização de vacinas como estratégia de prevenção de doenças conduziu a grandes avanços históricos como a erradicação da varíola, a quase erradicação da poliomielite e a redução em 95% da incidência de doenças como a difteria, tétano, parotidite e a rubéola. Em anos mais recentes, a vacinação contra a hepatite A, hepatite B e contra a bactéria *Haemophilus influenzae* tipo b diminuiu a mortalidade causada por diversos tipos de doenças infecciosas [3].

Em 2019, foi aprovada a primeira vacina contra o vírus do Ébola, tendo desde logo sido utilizada para conter um surto na República Democrática do Congo [12]. Os primeiros casos de infeção pelo coronavírus – SARS-CoV-2 – foram reportados no final de 2019 em Wuhan (China), vírus este que é responsável pela doença da COVID-19. Oficialmente declarada pandemia a 11 de março de 2020 pela OMS, a COVID-19 foi, à data de maio de 2023, responsável por mais de 765 milhões de casos, os quais resultaram em mais de 6,92 milhões de mortes [13]. Tendo em vista o combate à pandemia da COVID-19, a investigação, desenvolvimento e produção de vacinas foi conduzida a um ritmo sem precedentes, tendo a primeira vacina recebido autorização de utilização de emergência na União Europeia (UE) no final de 2020, pouco mais de um ano após terem sido reportados os primeiros casos de infeção.

Durante as últimas décadas, o campo da vacinação tem sido transformado devido aos avanços tecnológicos, sendo expectável que as vacinas continuem a contribuir para melhorar as condições de vida através do combate a doenças infecciosas emergentes ou reemergentes. Apesar dos poucos avanços registados nos últimos anos na produção de novas vacinas [14], a pandemia da COVID-19 veio alterar este cenário, pautado por elevado investimento financeiro e processos de aprovação mais simples devido à concessão de autorizações de utilização de emergência de algumas das vacinas desenvolvidas. Em geral, a tecnologia do

ácido desoxirribonucleico (ADN) recombinante e dos bioprocessos são aliados fundamentais no processo de desenvolvimento e/ou produção de grande parte das vacinas.

## Tipos de Vacinas

Historicamente, as primeiras vacinas eram baseadas em agentes patogênicos atenuados ou inativados, nomeadamente bactérias ou vírus. Desde então, a evolução científica tem procurado avançar no sentido de empregar frações cada vez menores dos agentes patogênicos tendo em vista o desenvolvimento de vacinas mais seguras, mas igualmente eficazes [15]. Tendo por base o conceito subjacente à estratégia de produção ou tipo de ingrediente ativo das vacinas, estas são geralmente classificadas em três grupos ou gerações, de acordo com a Figura 2: as vacinas de primeira geração podem conter agentes patogênicos vivos numa forma atenuada (geralmente vírus) ou inativada; as vacinas de segunda geração são vacinas recombinantes e podem conter toxinas produzidas por bactérias inativadas, ou partes do agente patogénico (proteínas recombinantes, polissacarídeos, entre outros) [16,17]; mais recentemente e de forma a combater novos desafios surgiu uma terceira geração de vacinas que utiliza a informação genética do agente patogénico em causa, mais especificamente ADN ou ARN (ácido ribonucleico), responsáveis pela codificação de proteínas que representam antígenos relevantes para desencadear uma resposta do sistema imunitário [3,15,17].

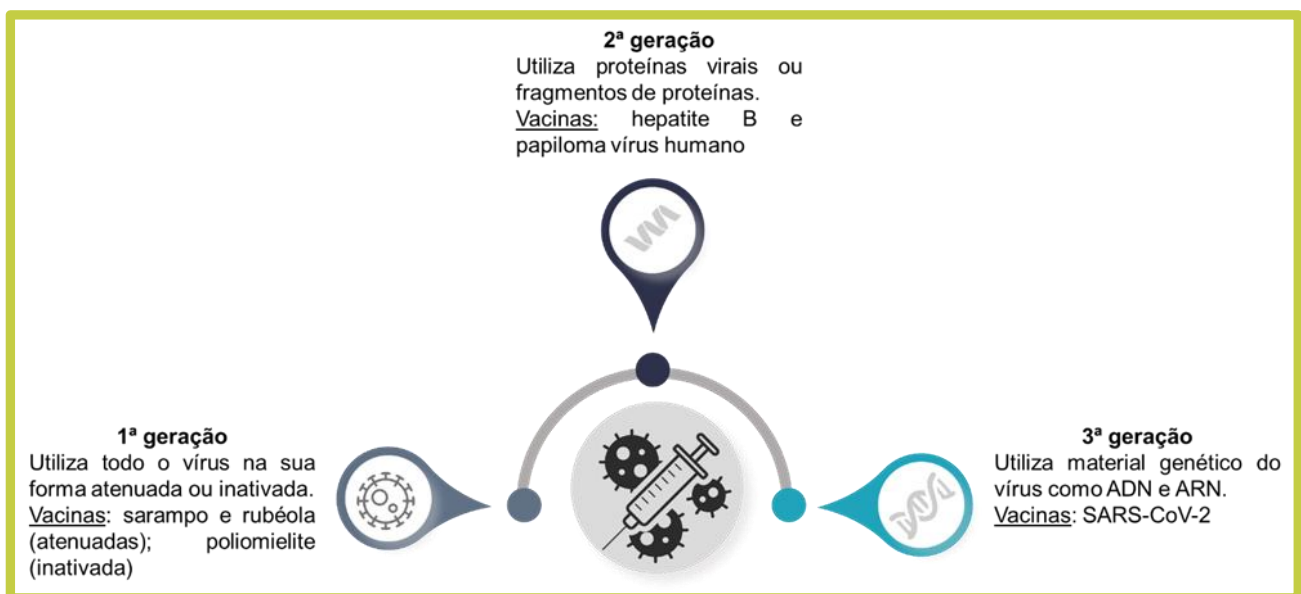


FIGURA 2: Classificação das diferentes gerações de vacinas consoante o tipo de ingrediente ativo ou método de produção.

O mecanismo de ação de uma vacina assenta no funcionamento da resposta imune. O sistema imune pode ser dividido em dois grandes subsistemas, o sistema imune inato e o sistema imune adaptativo, sendo que estes interagem entre si de forma a criar uma resposta imune eficaz [18]. A resposta imune inata pode ser considerada uma primeira linha de defesa contra agentes patogénicos, sendo esta resposta o resultado de barreiras anatómicas tais como a pele e as mucosas, as quais têm como principal objetivo a prevenção da entrada de microrganismos e outros agentes tóxicos. Além destas barreiras físicas fazem parte desta resposta inata barreiras fisiológicas tais como a temperatura, o pH ácido do estômago [19], e células especializadas do sistema imune [18,20].

Ainda dentro da resposta inata temos a ativação das vias do complemento. A via clássica é ativada por anticorpos IgM ou IgG que se ligam na superfície de antígenos ou microorganismos. A via da properdina é ativada pela deposição de proteína do complemento C3b nas superfícies dos microorganismos e não requer anticorpos para a sua ativação. Por seu lado, a via da lectina é ativada quando a proteína plasmática ligante de manose se liga a grupos manose presentes nas paredes celulares de microorganismos. Estas vias conectam-se numa via comum levando à formação do complexo que forma poros na membrana das células alvo, conduzindo assim à opsonização<sup>1</sup> que posteriormente ativa a resposta inflamatória localizada [19].

A resposta inflamatória é uma parte essencial da resposta imune inata. Além dos mecanismos fisiológicos, existem também padrões moleculares associados a agentes patogénicos (PAMPs) (peptidoglicanos, lipoproteínas e ADN viral) que são capazes de estimular a libertação de citocinas e ativar fagócitos. Os fagócitos apresentam a capacidade de interligar a resposta imune inata e adaptativa. Dentro dos fagócitos, existem os monócitos (sangue) e os macrófagos (tecidos) que têm um papel fundamental na degradação de agentes exógenos e na apresentação de antígenos a células T [21].

Por outro lado, as ações do sistema imune adaptativo são específicas para o agente infeccioso e, como tal, demoram mais tempo a entrar em ação do que as da resposta inata. Contudo, esta resposta possui memória, permitindo desenvolver uma resposta mais rápida quando se verifica uma exposição repetida ao agente infeccioso. O sistema imune adaptativo envolve a ação de linfócitos B, anticorpos (imunidade humoral), linfócitos T (imunidade mediada por células), ou células exterminadoras naturais (do inglês *natural killer* - NK) [19,21]. Desta forma, o funcionamento das vacinas passa por mimetizar um estado de infeção que não provoque a doença, mas que permita ao sistema imune produzir linfócitos T de memória e anticorpos [19].

Existem vários tipos de vacinas. O seu desenvolvimento e produção são muitas vezes dependentes do tipo de infeção que a vacina irá prevenir, como descrito na Tabela I.

No contexto da pandemia da COVID-19, devem ser realçados dois marcos importantes no campo da vacinação que terão certamente implicações na medicina contemporânea, nomeadamente a aprovação na UE/EUA (Estados Unidos da América) das primeiras vacinas de ARN mensageiro (ARNm) [22], bem como a aprovação na Índia da primeira vacina de ADN plasmídico (ADNp) [23]. Face ao exposto, a próxima secção aborda as características gerais das vacinas de ADNp e ARNm.

### **Vacinas de ácidos nucleicos**

Em geral, as vacinas tradicionais apresentam algumas desvantagens, nomeadamente o facto da produção em larga escala das vacinas que contêm vírus atenuados ser, geralmente, um processo moroso que não se coaduna com a urgência verificada no caso de surtos epidémicos, como por exemplo no caso da COVID-19. Por outro lado, estas podem induzir respostas do sistema imune, como inflamações ou casos de resistência, e no caso de doentes imunocomprometidos, a administração de vacinas convencionais pode aumentar o risco de morte [24,25]. Desta forma, torna-se evidente a necessidade de vacinas mais eficazes e seguras, mas

---

<sup>1</sup> A opsonização é uma resposta imune na qual as opsoninas são usadas para marcar patógenos de forma a serem eliminados por fagócitos. Sem as opsoninas os patógenos são capazes de repelir os anticorpos e evitam a sua eliminação pelo sistema imune podendo continuar a sua replicação no sistema.

sobretudo é imperativo o desenvolvimento e produção de vacinas em grande escala de uma forma mais rápida de modo a combater surtos epidêmicos.

TABELA I: Tipos de vacinas e doenças [16].

Tipo de vacina	Ingrediente farmacêutico ativo	Doença
<b>Vírus atenuados</b>	Contêm o vírus ou bactéria numa forma enfraquecida	Sarampo, Rubéola, Varicela
<b>Vírus inativado</b>	Contêm o vírus ou bactéria totalmente inativos	Poliomielite
<b>Toxoides</b>	Contêm toxinas numa forma enfraquecida (toxoides) produzidas pelas bactérias. As bactérias em si são incapazes de provocar a doença	Difteria e Tétano
<b>Subunidades</b>	Contêm apenas partes do vírus ou bactéria	Tosse convulsa
<b>Conjugadas</b>	Contêm polissacarídeos conjugados com outros antigénios, sendo aplicadas no combate a bactérias que possuem aquele tipo polissacarídeos	<i>Haemophilus influenzae</i> tipo B

Como alternativa às vacinas comuns surgiu o aparecimento de vacinas baseadas em ácidos nucleicos, nomeadamente ADN ou ARN. As vacinas de ADN envolvem a introdução de ADNp nos tecidos ou células, que contém sequências de ADN que codificam para antigénios específicos para a resposta imune pretendida [26,27]. Após administração, os antigénios em causa são produzidos pelo organismo hospedeiro, estimulando desta forma a resposta imune requerida [17]. A base das vacinas de ácidos nucleicos assenta no princípio da tecnologia de ADN recombinante, o qual é essencial pois permite clonar a sequência génica de interesse no ADNp.

As vacinas de ADNp apresentam vantagens em relação às vacinas tradicionais pois estas são capazes de estimular ambas as respostas das células T e B, são relativamente mais estáveis, não requerem a utilização de agentes infecciosos na sua formulação e a produção em larga escala é mais simples [17]. Adicionalmente, e ao contrário das vacinas convencionais que são apenas utilizadas no combate a doenças infecciosas, as vacinas de ácidos nucleicos podem ainda ser aplicadas em tratamentos de doenças não infecciosas tais como o cancro [28]. Em geral, o ADNp é obtido através de bioprocessos utilizando bactérias (abordado em mais detalhe na seção “Desenvolvimento de bioprocessos para a obtenção de ADN plasmídico”), incluído numa formulação que, além do principal ingrediente farmacêutico ativo (ADNp), pode ainda conter adjuvantes ou excipientes, até que é finalmente administrado recorrendo a diferentes métodos tais como injeções com agulhas (p. ex. por via intravenosa, subcutânea, ou intramuscular), e administração tópica em diversas mucosas (p. ex. intestinal, respiratória, pele e olhos) [17,29,30].

Apesar dos resultados promissores obtidos em animais e da expectativa criada em torno destas vacinas, a sua eficácia foi reportada como sendo mais reduzida em humanos e animais de grande porte [17,29,31]. De facto, os grandes entraves à aplicação das vacinas de ADNp são a instabilidade dos próprios plasmídeos e a falta de um mecanismo de entrega eficiente nas células, levando à necessidade de aplicar elevadas quantidades de ADNp, para que um número significativo de células incorpore o plasmídeo produzindo o antigénio de interesse e de forma a que seja desencadeada uma resposta imune eficiente [32]. No sentido de oferecer soluções inovadoras para ultrapassar este problema [33], têm sido amplamente investigadas diversas formulações para a sua entrega, tais como nanopartículas poliméricas, lipídicas, híbridos lípido-



polímero, inorgânicas, ou proteicas [34]. Pelo referido, as primeiras vacinas baseadas em ADN foram aprovadas exclusivamente para uso veterinário [27], como por exemplo, a vacina contra o melanoma em cães [35]. No entanto, é importante salientar que a primeira vacina baseada em ADNp, designada por ZyCoV-D (Zydu Lifesciences Limited, Índia) e com indicação para a COVID-19, foi aprovada na Índia recentemente [23].

Devido à maior estabilidade química do ADN em comparação com o ARN, o campo das vacinas dos ácidos nucleicos foi inicialmente dominado pelas vacinas de ADN. No entanto e paralelamente aos estudos conduzidos com as vacinas de ADN, foram surgindo novos desenvolvimentos no campo do ARN. Em 1992, Bloom e colegas demonstraram a eficácia do ARNm na expressão de proteínas *in vivo* usando uma injeção de ARNm no cérebro de ratos para expressar uma hormona, sendo esta a primeira descrição do ARNm como molécula terapêutica [36]. Apesar da estratégia adjacente à vacinação com ADNp e ARNm ter algumas semelhanças que culminam na síntese do antigénio alvo, existem algumas diferenças que devem ser realçadas: i) o ARNm é entregue no citoplasma da célula hospedeira de forma a que ocorra a tradução em proteínas, enquanto o ADN necessita de ser translocado para o núcleo e ser transcrito em ARNm, que é posteriormente transportado para o citoplasma [29]; ii) o ARNm não apresenta potencial para ser integrado no ADN do hospedeiro, o que não se verifica no caso do ADNp em que tal situação se pode verificar [37]; iii) em comparação com o ADN, o ARN é muito mais versátil pois o sistema imune do hospedeiro tem a capacidade para detetar e atacar vírus com genoma de ARN, e desta forma algumas moléculas de ARN são capazes de induzir, só por si, fortes respostas imunes [38]; iv) recorrendo à produção em sistemas que não contêm células, o desenvolvimento e produção das vacinas de ARNm é mais rápido, o que se revela útil quando se procura uma resposta rápida para conter uma pandemia como foi o caso da COVID-19 [39].

Apesar da versatilidade das vacinas de ARNm, este é altamente suscetível à degradação por ribonucleases, pelo que foram conduzidos diversos estudos envolvendo a otimização da sequência de ARNm no sentido de ultrapassar esta barreira [40]. Entre as diferentes estratégias, destacam-se a introdução de sequências que estabilizam o ARNm e que contribuem para a iniciação da tradução, a modificação de nucleósidos que conferem resistência à degradação, como por exemplo um análogo da cap 5', introdução de uma cauda poli-A, a otimização das sequências das regiões 5' e 3' que não são traduzidas e a utilização de nucleósidos modificados quimicamente [40,41]. Especificamente, o interesse nas moléculas de ARNm foi despoletado de forma mais intensa após os estudos de Weissman e Kariko [42], que demonstraram que a utilização de nucleósidos modificados tornavam o ARNm menos imunogénico, mais estável, e conduziam a um aumento na expressão de proteínas.

Tal como se verificou com as vacinas de ADN, um dos maiores obstáculos à aplicação das vacinas de ARNm é a sua entrega e internalização nas células, e como tal foram surgindo vários estudos reportando a entrega de ARNm, nomeadamente através da encapsulação em nanopartículas à base de lípidos [43], péptidos [44], replicões de vírus [45] e emulsões catiónicas [46] (Figura 3) [37], assim como estratégias de transfeção por micro-agulhas [41,47]. Apesar dos vetores virais serem a escolha mais óbvia numa fase inicial dado que são naturalmente capazes de entregar ácidos nucleicos de forma eficiente, foram observados vários entraves à sua vasta aplicação, nomeadamente, a sua imunogenicidade, carcinogénese, baixa capacidade no que diz respeito à quantidade de ácidos nucleicos a transportar e dificuldades na sua produção [48]. Desta forma, os vetores não virais, tais como lipossomas, polímeros, ou complexos péptidos-ADN [49], emergiram como

alternativas viáveis, apesar de apresentarem eficiências de transfeção inferior aos vetores virais. As vantagens que estes apresentam face aos vetores virais compreendem uma menor imunogenicidade que leva a que os doentes não possuam imunidade contra estes, bem como o facto de apresentarem menos restrições relativamente ao tamanho do ADN transgénico a ser entregue [50]. Face ao exposto, os vetores não virais tornaram-se mais populares, em particular o caso das nanopartículas lipídicas [48]. Estas nanopartículas são compostas por um interior aquoso envolto por uma bicamada lipídica que possui na sua composição diferentes tipos de lípidos, os quais possuem funções distintas [51]. Maioritariamente, as formulações destas nanopartículas são feitas com lípidos catiónicos que formam um complexo com o ARNm carregado negativamente. No entanto, como estes lípidos catiónicos são considerados mais tóxicos e menos eficientes, existe a possibilidade de utilizar lípidos ionizáveis e materiais semelhantes a lípidos que contêm grupos amina de forma a manter a carga da superfície da nanopartícula, neutra ou ligeiramente positiva a pH fisiológico [51]. Além de lípidos ionizáveis, existe também a possibilidade de utilizar fosfolípidos, colesterol, e lípido-poliétileno glicol [44,48]. Com o aumento da estabilidade do ARNm atingido através da utilização de nucleósidos modificados e da sua encapsulação em nanopartículas que conduzem a um aumento da biodisponibilidade do ARNm no interior da célula, estas vacinas tornaram-se mais competitivas.

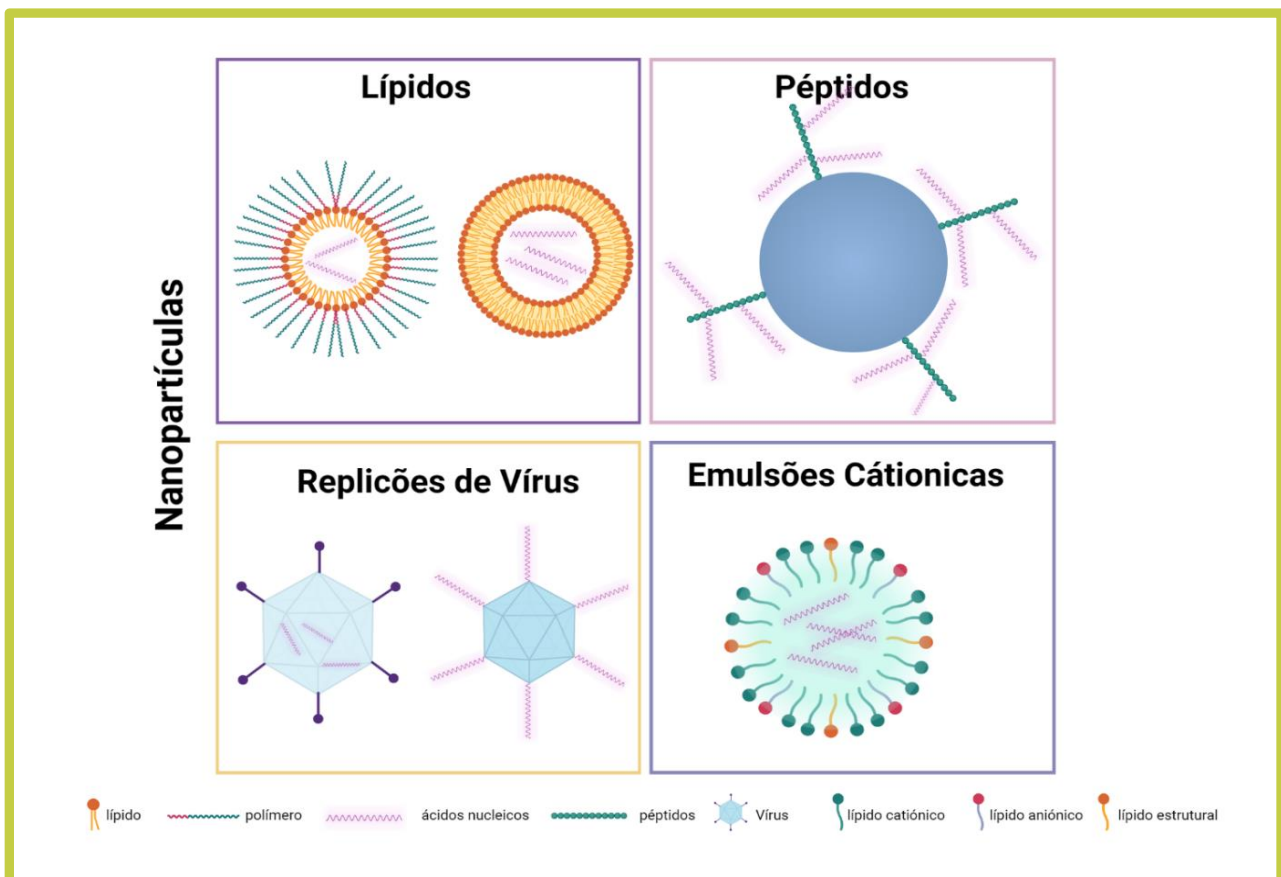


FIGURA 3: Representação esquemática de diferentes tipos de nanopartículas para a encapsulação de ARN mensageiro. Criado com BioRender.com.

Tal como descrito na Figura 4, a produção de vacinas de ARNm é um processo relativamente simples que compreende a identificação do gene alvo que corresponde ao antígeno que irá induzir a resposta imune após administração, seguido da sua clonagem em determinado plasmídeo, obtendo-se o plasmídeo recombinante



que é linearizado com uma enzima de restrição adequada. O plasmídeo linearizado servirá de sequência-molde para a reação de transcrição *in vitro*, que é realizada recorrendo a uma polimerase de um bacteriófago (T7, T3 ou SP6), e a partir da qual se obtém o ARNm alvo [52]. Durante este processo, a polimerase produz alguns produtos como ARNs de cadeia dupla que são capazes de ativar a resposta imune inata e impedir a tradução de ARNm [53]. Conseqüentemente, estes produtos indesejados são removidos num passo de purificação utilizando cromatografia líquida de alta performance [54]. Adicionalmente, o ARNm é ainda purificado através de técnicas adicionais (digestão de ADN com desoxirribonucleases, ou filtração tangencial) e encapsulado em nanopartículas lipídicas [55].

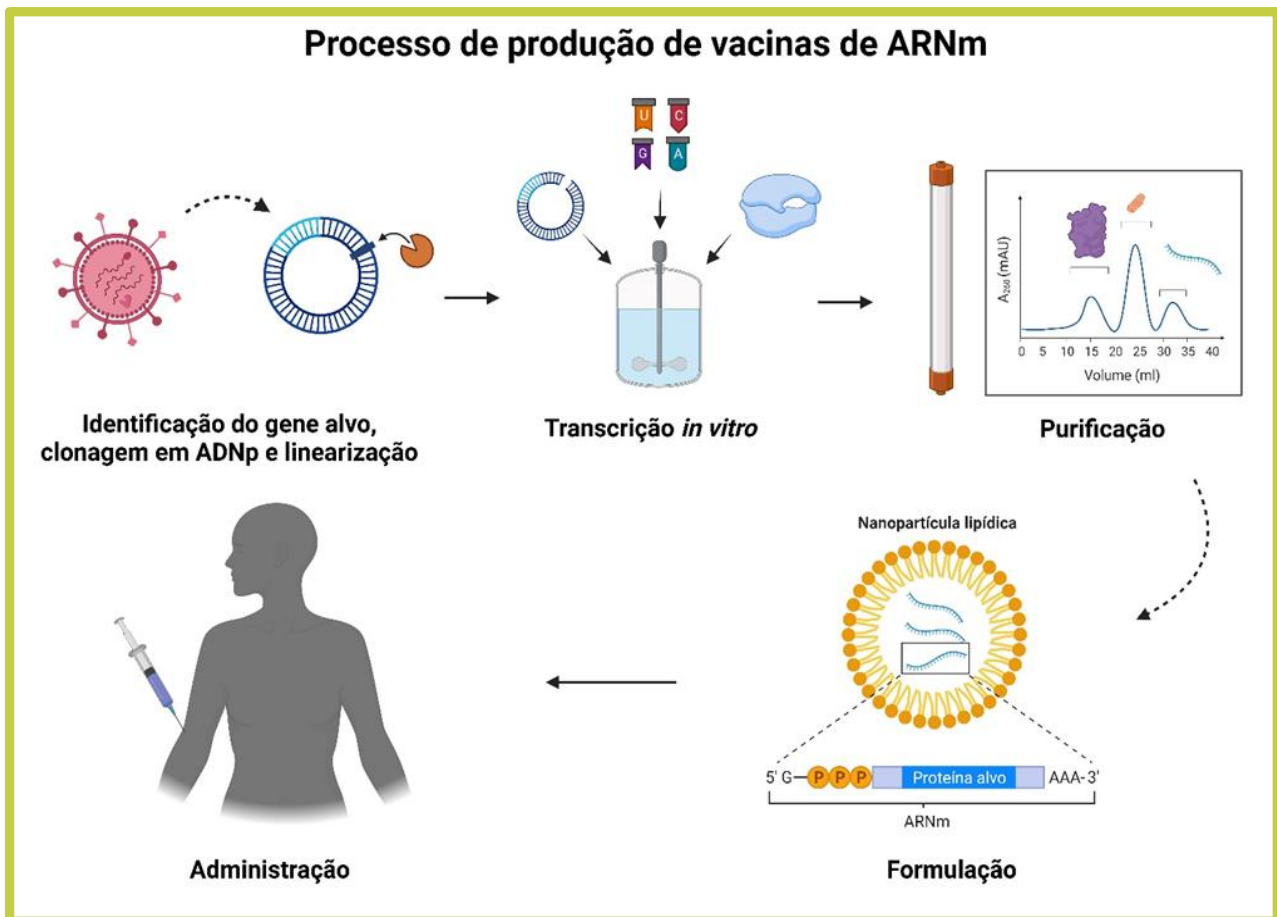


FIGURA 4: Processo geral de obtenção de vacinas de ARNm. Criado com BioRender.com.

Após a administração da vacina de ARNm, este é exposto a enzimas que são capazes de degradar a “vacina” e limitar a passagem do ARNm funcional para dentro das células. A passagem do ARNm é mediada por domínios da membrana, e após a internalização nas células, o ARN acumula-se no citoplasma onde é traduzido em proteínas [56]. O transcrito de ARNm, ao ser traduzido em proteínas, mimetiza uma situação de infecção levando a que a célula apresente de forma eficiente os antígenos através das proteínas do complexo de histocompatibilidade principal (do inglês *Major Histocompatibility Complex – MHC*) classe I e II, o que levará à ativação de células T [25]. Em 2020, vacinas de ARNm tais como a Comirnaty (Pfizer/BioNTech) e a Spikevax (Moderna) adquiriram especial destaque durante o combate à pandemia da COVID-19, estando inclusive entre as opções de primeira linha. Excluindo as vacinas desenvolvidas à posteriori para variantes específicas do SARS-CoV-2, à data de novembro de 2022, a vacina Comirnaty da Pfizer/BioNTech era a que

se encontrava aprovada num maior número de países (cerca de 149), enquanto a Spikevax da Moderna encontrava-se disponível em 88 países [57]. É importante realçar que a empresa Moderna, fundada em 2010, foi financiada com cerca de 2 biliões de dólares americanos com o principal objetivo de comercializar vacinas e terapias baseadas em ARNm, contando atualmente com 47 produtos unicamente baseados em ARNm em diferentes etapas de desenvolvimento e com diferentes aplicações clínicas [58]. Por outro lado, e no que diz respeito à legislação das vacinas de ARNm, o rápido aumento de estratégias terapêuticas baseadas neste tipo de produtos resultou num quadro regulamentar que aparenta estar um tanto ou quanto atrasado, seja porque as orientações atuais não se aplicam, não mencionam terapias baseadas em ARN, ou não têm definições amplamente aceites [59]. Importa ainda referir que as vacinas profiláticas e terapêuticas contra doenças infecciosas não são consideradas produtos medicinais baseados em terapia génica (do inglês *gene therapy medicinal products*) ou produtos de terapia génica (do inglês *gene therapy products*), respetivamente, pela EMA e pela FDA [59]. De facto, a classificação é fundamental para o tipo de autorização que é concedida e quais os controlos que têm de ser realizados, desde os ensaios pré-clínicos passando pelos ensaios clínicos e pela farmovigilância, de forma a que em última instância possam satisfazer os requisitos de segurança para os doentes [60]. Salienta-se que a OMS publicou um documento orientador para as autoridades nacionais bem como para os fabricantes de produtos biológicos com considerações de carácter regulatório acerca da avaliação da qualidade, segurança e eficácia de vacinas de ARNm para a prevenção de doenças infecciosas [61]. É ainda expectável não só que este documento produzido pela OMS venha a ser atualizado mas que também as agências reguladoras nacionais EMA e FDA venham a emitir normas orientadoras específicas para ao ARNm [59,62].

### **Desenvolvimento de vacinas para a COVID-19**

Com o aparecimento e desenvolvimento da COVID-19, a necessidade de uma vacina eficaz contra o vírus SARS-CoV-2 era premente, e várias equipas em empresas e universidades estiveram envolvidas em diversos estudos na procura de respostas para controlar a pandemia e desenvolver uma vacina segura e eficaz. Um dos grandes problemas num cenário de pandemia é a necessidade de desenvolver e produzir em massa uma vacina num curto espaço de tempo, sendo que para tal é necessário coordenar vários processos tais como: testes pré-clínicos, ensaios clínicos, produção e distribuição [63]. No caso do SARS-CoV-2, para que se obtivesse imunidade comunitária, as estimativas iniciais apontavam para a necessidade de pelo menos 60% da população ser afetada, e como tal, a forma mais eficaz e com menos riscos associados seria através da utilização de vacinas [64]. Idealmente, e de forma a responder às necessidades da pandemia, a vacina necessitava de ser facilmente produzida em massa a custos relativamente baixos, ser facilmente transportável e necessitar de poucas cadeias de frio para que desta forma pudesse ser facilmente distribuída em todo o globo.

A COVID-19 é uma doença causada por um betacoronavírus, SARS-Cov-2, que afeta o trato respiratório. Os sintomas desta doença podem variar entre rinorreias, nos casos menos graves, e síndromes respiratórias agudas, nos casos mais graves [65]. Os coronavírus como o SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-Cov-2, são vírus que se replicam no citoplasma, exibem um genoma com uma cadeia positiva de ARN e possuem 4 proteínas estruturais, a glicoproteína Spike de superfície (S), a glicoproteína do envelope (E), uma proteína membrana (M) e uma proteína da nucleocápside (N) [66]. Geralmente, a proteína S tem um papel

fundamental no progresso da doença e no desenvolvimento da resposta imune [67], pois liga-se com elevada afinidade a recetores específicos nas células do hospedeiro, nomeadamente a enzima conversora de angiotensina 2 – ACE2, que se encontra presente nas células epiteliais nos brônquios, e pneumócitos alveolares [68]. Após a fusão com a membrana, o genoma do ARN viral é libertado para o citoplasma, iniciando-se o ciclo com a tradução de proteínas não estruturais que são responsáveis por formar o complexo proteico de replicação e transcrição [69,70]. Há a produção de vários ARNm subgenómicos que são posteriormente traduzidos em proteínas virais. Estas proteínas virais e os ARN genómicos dão origem à formação de viriões no complexo de Golgi e retículo endoplasmático, sendo de seguida transportados para fora da célula através de vesículas [71]. Após a libertação do vírus e da sua ligação a células epiteliais, este ativa as células do sistema imunitário tanto da componente inata como da componente adaptativa.

Tendo por base a informação disponível acerca deste tipo de vírus, cedo se percebeu que a proteína S era capaz de induzir respostas imunes celulares e humorais, pelo que o fator chave para o desenvolvimento de vacinas contra o SARS-CoV-2 passaria pelo desenvolvimento de vacinas com base nas sequências do gene que codifica para esta proteína ou com base na própria proteína [72]. Após a sequenciação do genoma do vírus, as vacinas tornaram-se uma realidade, encabeçadas pelas atividades de investigação das empresas Pfizer/BioNTech e da Moderna em tecnologias baseadas em ARNm.

O desenvolvimento de uma vacina pode demorar cerca de uma década e engloba diferentes etapas, desde os ensaios pré-clínicos às diferentes fases do desenvolvimento clínico, aprovação pelas agências reguladoras e finalmente a produção em larga escala para distribuição pela população em geral, tal como representado na Figura 5 [73,74]. Para responder às necessidades do cenário que se viveu na pandemia da COVID-19, esta linha temporal foi mais reduzida não só devido ao elevado investimento financeiro como também à simplificação do processo de aprovação a nível regulamentar, comprimindo e sobrepondo algumas etapas, como exemplificado na Figura 5 para a vacina ARNm-1273 (Spikevax, Moderna) [74-76].



FIGURA 5: Representação temporal do desenvolvimento e produção tradicional de uma vacina vs o desenvolvimento e produção de uma vacina para a COVID-19 (ARNm-1273 – Spikevax, Moderna). Adaptado de [73].

À data de 14 de Novembro de 2022, existiam 50 vacinas aprovadas (por pelo menos 1 país) para a prevenção da COVID-19, incluindo vacinas contendo o vírus inativado ou componentes virais tais como o material genético (sob a forma de ARNm e ADN), subunidades de proteínas, vetores virais não replicativos e partículas semelhantes a vírus (do inglês, *virus-like particles* - VLP) [57]. A composição e as condições de

armazenamento de exemplos representativos de cada uma destas vacinas, selecionados com base no maior número de países em que as vacinas se encontram aprovadas, estão descritas na Tabela II.

Em geral, apesar das várias vantagens que as vacinas de ARNm trouxeram para o combate à COVID-19, uma potencial desvantagem relaciona-se com a necessidade de cadeias de refrigeração deste tipo de vacinas, para assegurar a sua estabilidade, mais ou menos severas, respetivamente, - 60 a - 80 °C para a vacina da Pfizer/BioNTech e - 15 a - 25 °C no caso da vacina da Moderna. Este facto pode levantar problemas tendo em vista a sua distribuição a nível global e o seu armazenamento em países subdesenvolvidos [77], quando em comparação com outras das vacinas aprovadas. Com exceção da vacina Covilo (Sinopharm, Beijing) que contém na sua composição o vírus atenuado, todos os tipos de vacinas representativas identificadas na Tabela II apresentam como antigénio a proteína S do vírus, o que reforça a relevância e eficácia deste antigénio para despoletar a imunização. Adicionalmente, e ao contrário de grande parte das vacinas cuja administração é intramuscular, a administração da vacina ZyCoV-D é intradérmica e não requer injeções com agulhas sendo, portanto, menos dolorosa. Considerando que a área debaixo da pele é muito rica em células do sistema imunitário que apresentam a capacidade para internalizar partículas estranhas tais como vacinas, a captura de ADN é mais eficiente do que no músculo [23].



### **Tecnologia do ADN recombinante e bioprocessos no desenvolvimento de vacinas**

A tecnologia do ADN recombinante envolve a alteração do material genético de um microrganismo de forma a melhorar ou permitir a aquisição de determinadas características, ou para a obtenção de produtos específicos. Inicialmente descrita em 1973 por Paul Berg e colaboradores [81], esta tecnologia envolve a manipulação do genoma através da inserção de fragmentos de ADN de várias fontes com a sequência de genes pretendida num vetor (p. ex. um plasmídeo ou cosmídeo), o qual é posteriormente introduzido num hospedeiro como a *Escherichia coli* (*E. coli*) [82]. Salieta-se que desenvolvimentos mais recentes nesta área tais como o CRISPR (do inglês *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) permitem a ativação, supressão, adição e deleção de genes num vasto conjunto de células com aplicações promissoras em diferentes áreas [33]; no entanto, o presente artigo aborda apenas a criação de moléculas de ADN recombinantes para a obtenção de produtos específicos, nomeadamente ADNp e antigénios/proteínas. O processo de obtenção de moléculas de ADN recombinantes compreende a aplicação de um passo de clivagem enzimática em locais específicos para a obtenção de fragmentos de ADN, seguido de uma etapa de ligação através da enzima ligase de ADN para unir os fragmentos e desta forma obter o vetor com o gene pretendido. Após a obtenção do vetor, este é introduzido no hospedeiro, que depois é submetido a um processo de cultura para o seu crescimento e produção de várias cópias dos fragmentos de ADN incorporados, até que finalmente os clones que contêm o vetor são selecionados [33].

TABELA II: Exemplos representativos de cada tipo de vacinas já aprovadas para a COVID-19, e informação relativamente ao número de países em que se encontram aprovadas (à data de novembro de 2022), a sua composição e condições de armazenamento [57,78-80].

Vacina (Empresa)	Número de Países que concederam aprovação	Administração	Composição	Condições de armazenamento
<b>Comirnaty - ARNm (Pfizer/BioNTech)</b>	149	Intramuscular	<b>ARNm que codifica a proteína S do vírus.</b> Lípidos, cloreto de potássio, fosfato de potássio monobásico, cloreto de sódio, fosfato de sódio dibásico dihidratado, sacarose	- 60 a - 80 °C; Após reconstituição em solução salina, deve ser administrada no prazo de 6h
<b>ZyCoV-D - ADNp (Zydus Cadila)</b>	1	Intradérmica (Sistema de injeção livre de agulhas)	<b>ADNp* que codifica a proteína S do vírus</b>	2 a 8 °C (demonstrando boa estabilidade durante 3 meses a 25 °C)
<b>Vaxzevria – Vetor viral não replicativo (Oxford/AstraZeneca)</b>	149	Intramuscular	<b>Adenovírus de chimpanzé que codifica a proteína S do vírus</b> produzido em células de rim de embrião humano. Cloreto de L-histidina monohidratado, cloreto de magnésio hexahidratado, Polisorbato 80 (E 433), etanol, sacarose, cloreto de sódio, edetato disódico dihidratado, água para a injeção	2 a 8 °C protegida da luz (até 6 meses); todas as vacinas do mesmo frasco devem ser administradas no prazo de 6h
<b>Nuvaxovid – Subunidade de proteína (Novavax)</b>	40	Intramuscular	<b>Antigénio da proteína S do vírus e o adjuvante matriz M1</b>	2 a 8 °C
<b>Covifenz - VLP (Medicago)</b>	1	Intramuscular	<b>VLPs da proteína S do vírus</b> produzidas na planta <i>Nicotiana benthamiana</i> . Fosfato de potássio monobásico, cloreto de sódio, fosfato de sódio dibásico, adjuvante AS03 (DL-alfa-tocoferol, esqualeno, polisorbato 80, tampão fosfato salino)	2 a 8 °C
<b>Covilo – Vírus inativado (Sinopharm, Beijing)</b>	93	Intramuscular	<b>Vírus inativado 19nCoV-CDC-Tan-HB02.</b> Hidrogenofosfato dissódico, cloreto de sódio, dihidrogenofosfato de sódio, hidróxido de alumínio como adjuvante	2 a 8 °C protegida da luz

VLP – *Virus-like particles* (partículas semelhantes a vírus); \*Não se encontrou informação adicional relativamente a potenciais excipientes.

A tecnologia do ADN recombinante apresenta aplicações multidisciplinares e potencial para melhorar diversos aspetos da vida, nomeadamente, no que diz respeito à saúde através da obtenção de produtos terapêuticos, à melhoria dos recursos alimentares e à resistência a efeitos ambientais adversos [83-85]. Em particular, desde os anos 80 que a tecnologia do ADN recombinante e a biotecnologia em geral têm vindo a ser aplicadas no desenvolvimento de vacinas (da primeira à terceira geração), cujos principais contributos se encontram descritos na Tabela III.

As estratégias de clonagem de genes e mutagéneses podem gerar microrganismos atenuados, nos quais os genes envolvidos na patogenicidade ou metabolismo primário são inativados de forma a não comprometerem a viabilidade do organismo, mas torná-lo incapaz de causar doença [15]. As vacinas de subunidades de proteínas consistem na indução de uma resposta imune através da administração de uma proteína (ou apenas

uma parte) do agente infeccioso, por ex. a proteína S no caso do SARS-CoV-2 [86]. Esta possibilidade tornou-se exequível com o desenvolvimento da tecnologia do ADN recombinante, a qual permite a clonagem de genes que codificam os antígenos necessários em sistemas de expressão heterólogos, e a sua obtenção em quantidades consideráveis num estado de elevada pureza tendo em vista a sua administração como vacinas [87].

TABELA III: Resumo dos contributos da tecnologia do ADN recombinante e da biotecnologia em geral para a obtenção de vacinas. Adaptado de [15].

Geração de vacina	Tipo de vacina	Impacto da tecnologia do ADN recombinante e bioprocessos
<b>Primeira</b>	Agentes patogénicos atenuados ou bivalentes	Manipulação genética para inserção de genes que codifiquem antígenos
<b>Segunda</b>	Vacina de subunidades proteicas	Produção de proteínas recombinantes em sistemas heterólogos
	Vacinas de ADN	Obtenção de plasmídeos recombinantes
<b>Terceira</b>	Vacinas de ARN	Obtenção das sequências de ADN e outros (p. ex. enzimas) componentes necessários à transcrição <i>in vitro</i>

As vacinas de ADN consistem em plasmídeos geneticamente modificados que após serem administrados *in vivo* num organismo (p. ex. humanos, ratinhos, entre outros), originam uma resposta imune. Para tal, o processo de obtenção e administração de vacinas de ADNp compreende, essencialmente, 4 etapas: i) identificação e isolamento (seja diretamente do microorganismo ou por síntese química) do gene que irá originar a resposta imunológica [87,88]; ii) clonagem do gene alvo num plasmídeo; iii) produção e purificação do ADNp recombinante por um processo biotecnológico (analisado em mais detalhe na secção “Desenvolvimento de bioprocessos para a obtenção de ADN plasmídico”), geralmente utilizando a bactéria *E. coli* [29]; iv) formulação da vacina de ADNp que além do ingrediente farmacêutico ativo, pode conter adjuvantes ou excipientes, até à sua administração final no organismo alvo (p. ex. em humanos) - após a sua administração, o gene presente no ADNp será transcrito e traduzido de forma a expressar uma proteína/antígeno, o qual em última instância irá desencadear uma resposta imune adaptativa [89]. O ARNm é obtido através de reações de transcrição *in vitro* com enzimas recombinantes, ribonucleótidos trifosfatos e a sequência de ADN que codifica o antígeno pretendido [62]. Apesar de indireto, a tecnologia de ADN recombinante tem um papel fundamental para o desenvolvimento e produção de vacinas de ARNm, nomeadamente nos processos biotecnológicos necessários à obtenção das moléculas de ADN (p. ex. ADNp) e das enzimas necessárias à transcrição do ADN, nomeadamente, a ARN polimerase.

Nas próximas secções apresenta-se uma visão global das estratégias gerais de obtenção de vacinas de ADNp bem como de antígenos para a formulação de vacinas de subunidades proteicas.

### Desenvolvimento de bioprocessos para a obtenção de ADN plasmídico

A produção de ADNp tendo em vista a sua aplicação em terapia génica ou para induzir respostas imunes sob a forma de vacinas é realizada recorrendo a bioprocessos, de acordo com o processo global descrito na Figura 6. O hospedeiro utilizado mais comum é a bactéria *E. coli*, cujas condições de fermentação devem ser otimizadas para aumentar a biossíntese de ADNp, nomeadamente o meio de cultura, pois este é um



parâmetro que influencia de forma significativa os níveis síntese de ADNp produzidos [90]. A etapa subsequente consiste na preparação de um lisado clarificado, inicialmente obtido através do método da lise alcalina, seguido de etapas de concentração e clarificação recorrendo, respetivamente, à precipitação com diversos tipos de solventes orgânicos e sais [91]. A constituição típica de um lisado de *E. coli* engloba 65% proteínas, 25% ARN, 4% endotoxinas, 3% ADN genómico e 3% ADNp, verificando-se portanto que apenas uma pequena percentagem corresponde à biomolécula de interesse [92]. Desta forma, e considerando todas as impurezas presentes nos lisados contendo ADNp, as agências reguladoras tais como a *Food and Drug Administration* (FDA nos EUA) e a Agência Europeia do Medicamento (do inglês *European Medicines Agency* – EMA na Europa) estabeleceram critérios de qualidade que as preparações contendo ADNp devem cumprir [93]. Assim, é da maior relevância desenvolver estratégias de isolamento e purificação de ADNp, devendo-se contudo salientar que esta tarefa não é simples, considerando que muitas impurezas apresentam características físico-químicas semelhantes ao ADNp, tais como: carga negativa (ARN, ADN genómico, endotoxinas, as isoformas circular aberta e linear do ADNp), peso molecular (ADN genómico e endotoxinas) e hidrofobicidade (endotoxinas) [92]. Para atingir este objetivo, são geralmente utilizadas técnicas cromatográficas (cromatografia de troca iónica, interação hidrofóbica, exclusão molecular ou de afinidade) explorando uma ou mais propriedades intrínsecas do ADNp [92,94]. O processo de purificação deve culminar na obtenção de elevadas quantidades de ADNp com atividade biológica, na sua isoforma superenrolada, uma vez que a eficiência terapêutica desta conformação molecular em conferir imunidade é superior à das restantes isoformas, tais como a circular aberta ou linear [95]. Finalmente, desenvolve-se uma formulação específica contendo o ADNp [27], a qual pode depender do tipo de administração, especificamente se a vacina será administrada intramuscularmente ou de forma tópica (através das mucosas intestinal, respiratória, pele e olhos) [17,29].

### **Produção recombinante de vacinas de subunidades de proteínas**

As vacinas baseadas em subunidades de proteínas recombinantes são formuladas contendo antigénios de proteínas obtidos através da sua produção heteróloga em células hospedeiras [96,97], cujo processo geral de obtenção se encontra descrito na Figura 7.

Em geral, este processo compreende duas etapas principais, o processamento a montante e a jusante. O processamento a montante consiste na construção do ADNp recombinante contendo o gene que codifica o antigénio de interesse (previamente isolado do organismo alvo ou sintetizado quimicamente), a transformação do hospedeiro, a seleção de clones recombinantes e a produção (Figura 7). A etapa de produção propriamente dita compreende o cultivo das células transformadas com o plasmídeo recombinante num meio de cultura adequado, a qual pode ou não incluir uma etapa de indução, respetivamente, se o plasmídeo é indutivo ou constitutivo. Por outro lado, a produção é, geralmente, otimizada em pequena escala em frascos erlenmeyer seguida do aumento de escala para biorreatores [98]. Existem diversos hospedeiros que podem ser utilizados para a produção de proteínas recombinantes, desde bactérias como a *E. coli*, leveduras como a *P. pastoris* (*P. pastoris*, reclassificada como *Komagataella pastoris*), células de inseto ou células de mamíferos [99]. A partir da produção de proteínas recombinantes nestes hospedeiros é possível o desenvolvimento de vacinas, algumas das quais já aprovadas para uso em humanos [97].

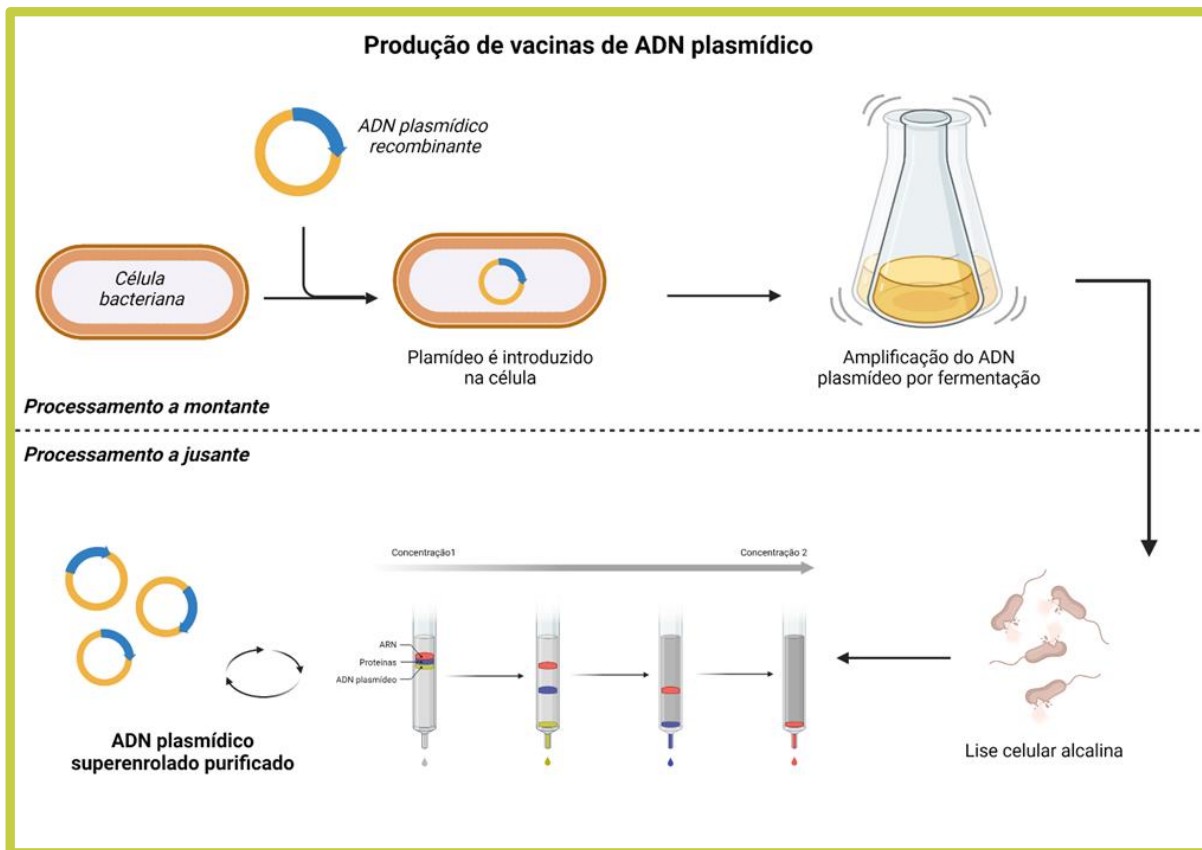


FIGURA 6: Produção e purificação de vacinas de ADN plasmídico. Criado com BioRender.com.

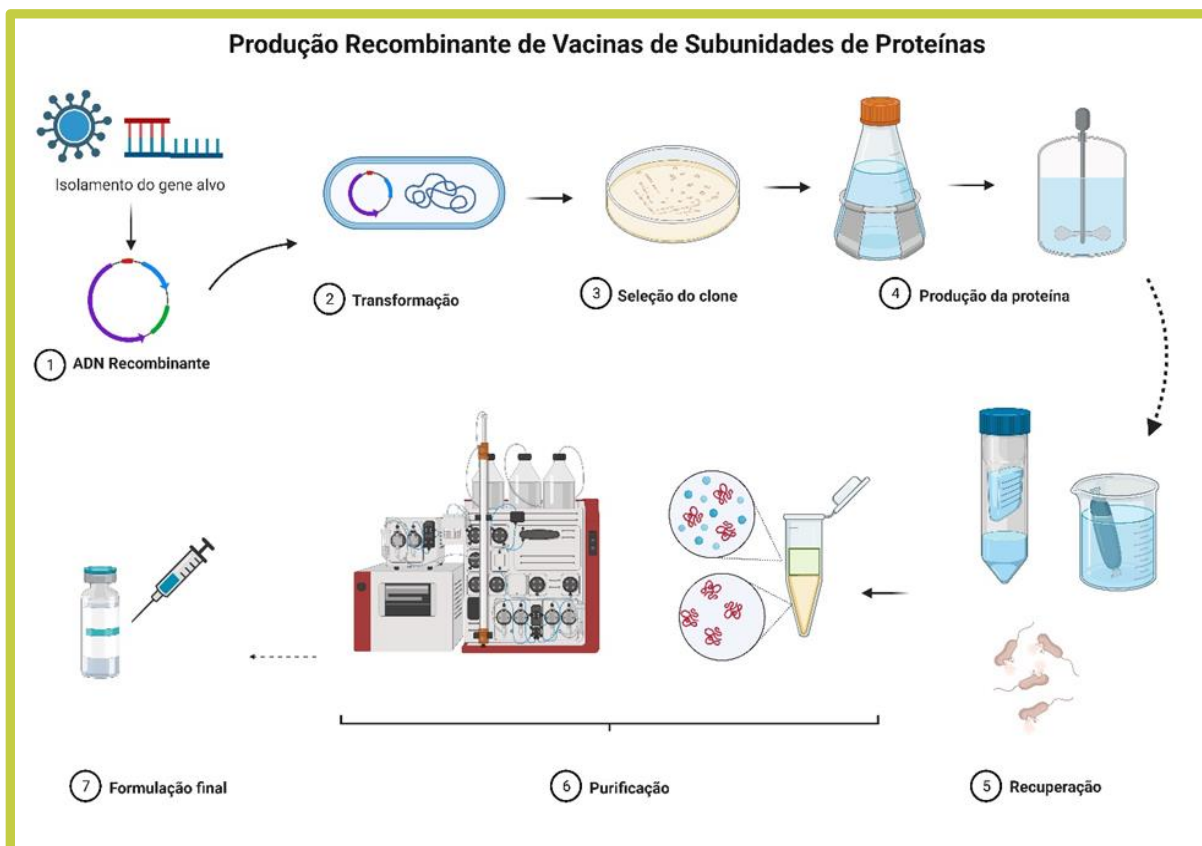


FIGURA 7: Esquema representativo da produção recombinante de vacinas de subunidades de proteínas em bactérias. Criado com BioRender.com.

Bactérias tais como a *E. coli* apresentam diversos benefícios para a produção heteróloga de proteínas, apesar de geralmente as proteínas se acumularem sob a forma de corpos de inclusão (dificultando a sua extração e recuperação) e sem as modificações pós-tradução desejadas, as quais podem ser importantes para induzir a resposta imune [97]. Estas desvantagens podem ser ultrapassadas pela utilização de células de mamíferos ou de insetos, sendo que as leveduras representam um bom compromisso entre os grupos de hospedeiros anteriormente referidos, permitindo obter níveis de antigénios imunogénicos consideráveis com elevado custo-benefício [100].

A seguir ao processamento a montante, segue-se o processamento a jusante que tem como finalidade recuperar e purificar a proteína. Em alguns hospedeiros, como por ex. a *P. pastoris*, existe a possibilidade de produzir a proteína intracelularmente, sendo de seguida exportada para o meio extracelular. Além da maquinaria intracelular do hospedeiro, a secreção da proteína para o meio extracelular depende da presença de uma sequência de secreção, a qual é, geralmente, introduzida no plasmídeo juntamente com o gene alvo, e que permite direcionar a proteína para a via secretória [101]. O fato da proteína ser secretada para o meio extracelular pode revelar-se extremamente vantajoso, pois além de não ser necessário efetuar uma etapa de lise celular, as etapas subsequentes de recuperação e purificação são simplificadas devido aos baixos níveis de proteínas endógenas que são secretadas para o meio extracelular [101]. Dependendo se a proteína é expressa intracelularmente ou se é secretada para o meio extracelular, a etapa inicial de recuperação será diferente.

Assim, para proteínas intracelulares, é necessária uma etapa de lise celular, recorrendo a métodos enzimáticos, químicos ou mecânicos, enquanto para proteínas secretadas, a etapa de recuperação inicial visa remover os componentes do meio e concentrar a proteína, podendo ser utilizada microfiltração, diálise, entre outras técnicas [98]. Após a recuperação e antes da formulação final, é necessário desenvolver uma estratégia de purificação que permita a remoção de contaminantes, permitindo obter a proteína recombinante num estado de elevada pureza que cumpra os requisitos das agências reguladoras para este tipo de produtos [102]. Os esquemas de purificação geralmente envolvem múltiplos passos, tais como precipitações (p. ex. com sulfato de amónia, polietileno glicol), clarificações (p. ex. através de filtração, centrifugação, filtração tangencial), ultracentrifugação por gradiente (p. ex. sacarose, cloreto de cézio), etapas cromatográficas, entre outras [103]. Devido à elevada seletividade e especificidade, técnicas cromatográficas são geralmente utilizadas para a purificação de antigénios e proteínas. No entanto, para cumprir com os requisitos de elevada pureza deste tipo de bioprodutos, por vezes revela-se necessário utilizar mais do que um passo cromatográfico, não só para a etapa de captura, como para a etapa de purificação intermédia e para o polimento final [102]. Por outro lado, abordagens alternativas, tais como os sistemas aquosos bifásicos, têm sido amplamente investigadas para a extração, concentração e purificação de proteínas recombinantes [104]. Este tipo de sistemas obtêm-se quando dois compostos solúveis em água são misturados acima de determinadas concentrações, dando origem a duas fases aquosas, uma enriquecida num soluto e a outra no segundo soluto, tendo demonstrado resultados promissores no processamento a jusante de diversos tipos de proteínas e seus derivados, produzidos a partir de diferentes fontes [105].

É importante realçar que alguns antígenos virais recombinantes podem associar-se espontaneamente em partículas semelhantes a vírus (do inglês *Virus-like particles* - VLPs), isto é, estruturas formadas por multiproteínas que mimetizam a organização e conformação dos vírus, mas sem o genoma viral [96]. A estratégia geral de obtenção de VLPs é semelhante à que se encontra descrita na Figura 7, apesar de por vezes ser necessário construir diversos plasmídeos que codificam diferentes proteínas estruturais do vírus [106].



## CONCLUSÕES

Desde que a vacinação foi introduzida, esta tem sido uma das maiores armas da medicina para combater diversas doenças causadas por agentes infecciosos, como vírus ou bactérias. Ao longo dos anos, as vacinas têm sido alvo de intensa investigação de forma a torná-las mais eficientes e seguras. Inicialmente, a vacinação era realizada recorrendo à utilização do agente infeccioso, geralmente o vírus numa forma atenuada ou inativada. No entanto, devido a questões de segurança e à dificuldade de produção em larga escala deste tipo de vacinas num curto espaço de tempo, foram desenvolvidas novas gerações de vacinas, tais como as baseadas em subunidades de proteínas. Por outro lado, na década de 90, surgiram os primeiros estudos utilizando vacinas que empregam material genético do agente infeccioso, nomeadamente ADNp e ARNm. Volvidos 30 anos e ainda que de forma não global, estas já receberam aprovação para utilização em humanos, tendo sido inclusive fundamentais na primeira linha de combate à pandemia da COVID-19. Em geral, o desenvolvimento das vacinas de segunda (p. ex. subunidades de proteínas) e terceira geração (p. ex. ADNp) apenas foi possível devido ao desenvolvimento da tecnologia do ADN recombinante, juntamente com os inúmeros avanços registados no domínio da biotecnologia vermelha, o ramo da biotecnologia responsável pela obtenção de produtos com propriedades terapêuticas.

De uma forma geral, a pandemia da COVID-19 renovou o interesse e despoletou intensas atividades de investigação que terminaram em soluções inovadoras no campo das vacinas, marcando o início de uma nova era nos processos de vacinação e a partir dos quais poderão surgir estratégias profiláticas e terapêuticas para outras doenças que não infecciosas, como por ex. no domínio do cancro.

---

**agradecimentos** • Este trabalho foi realizado no âmbito do projeto CICECO – Instituto de Materiais de Aveiro, UIDB/50011/2020, UIDP/50011/2020 & LA/P/0006/2020, financiado por fundos nacionais através da FCT/MCTES (PIDDAC). O presente trabalho foi ainda desenvolvido no âmbito do projeto "mVACCIL - Melhorias na obtenção de vacinas de ARN mensageiro utilizando líquidos iónicos e processos integrados de produção-clarificação", EXPL/BII-BTI/0731/2021, financiado por fundos nacionais (Orçamento de estado), através da FCT/MCTES. Leonor S. Castro e Augusto Q. Pedro agradecem à FCT, respetivamente, o financiamento da sua bolsa de doutoramento (2020/05090/BD, FCT) e do contrato de trabalho (CEECIND/02599/2020, FCT) concedido no âmbito do Estímulo ao Emprego Científico – Concurso Individual.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization, Health Emergencies List. Available online: <https://www.who.int/emergencies/situations> (accessed on February 20 2023).
2. McMichael, A.J. Extreme weather events and infectious disease outbreaks. *Virulence* 2015, 6, 543-547, doi:10.4161/21505594.2014.975022.
3. Rappuoli, R.; Mandl, C.W.; Black, S.; De Gregorio, E. Vaccines for the twenty-first century society. *Nature Reviews Immunology* 2011, 11, 865-872, doi:10.1038/nri3085.
4. World Health Organization, DNA Vaccines. Available online: <https://www.who.int/teams/health-product-and-policy-standards/standards-and-specifications/vaccines-quality/dna> (accessed on December 10 2022).
5. Andre, F.E.; Booy, R.; Bock, H.L.; Clemens, J.; Datta, S.K.; John, T.J.; Lee, B.W.; Lolekha, S.; Peltola, H.; Ruff, T.A.; et al. Vaccination greatly reduces disease, disability, death and inequity worldwide. *Bull World Health Organ* 2008, 86, 140-146, doi:10.2471/blt.07.040089.
6. World Health Organization, Vaccines and Immunization. Available online: [https://www.who.int/health-topics/vaccines-and-immunization#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/vaccines-and-immunization#tab=tab_1) (accessed on May 11 2023).
7. Fleming, A. The origins of vaccination. Available online: [nature.com/articles/d42859-020-00006-7](https://www.nature.com/articles/d42859-020-00006-7) (accessed on April 12 2022).
8. Riedel, S. Edward Jenner and the History of Smallpox and Vaccination. *Baylor University Medical Center Proceedings* 2005, 18, 21-25, doi:10.1080/08998280.2005.11928028.
9. Berche, P. Louis Pasteur, from crystals of life to vaccination. *Clinical Microbiology and Infection* 2012, 18, 1-6, doi:10.1111/j.1469-0691.2012.03945.x.
10. Pasteur, L. Sur les maladies virulentes : et en particulier sur la maladie appelée vulgairement choléra des poules; *CR Acad Sci (Paris)*: 1880; Volume 90, pp. 239-248.
11. World Health Organization, Production and control of polio vaccines. Available online: <https://www.who.int/teams/health-product-policy-and-standards/standards-and-specifications/vaccines-quality/poliomyelitis> (accessed on January 15 2023).
12. First Ebola vaccine approved. *Nature Biotechnology* 2020, 38, 6-6, doi:10.1038/s41587-019-0385-7.
13. Ritchie, H.M., E.; Rodés-Guirao, L.; Appel, C.; Giattino, C.; Ortiz-Ospina, E.; Hasell, J.; Macdonald, B.; Beltekian, D.; Roser, M. Coronavirus Pandemic (COVID-19). Available online: <https://www.ourworldindata.org/coronavirus> (accessed on May 11 2023).
14. Stern AM, M.H. The History Of Vaccines And Immunization: Familiar Patterns, New Challenges. *Health Affairs* 2005, 24, 611-621, doi:10.1377/hlthaff.24.3.611.
15. Diniz, M.D., Ferreira, L.C.S. Biotecnologia aplicada ao desenvolvimento de vacinas. *Estudos Avançados* 2010, 24, 19-30, doi:10.1590/S0103-40142010000300003.
16. Vetter, V.; Denizer, G.; Friedland, L.R.; Krishnan, J.; Shapiro, M. Understanding modern-day vaccines: what you need to know. *Annals of Medicine* 2018, 50, 110-120, doi:10.1080/07853890.2017.1407035.
17. Soltani, S.; Farahani, A.; Dastranj, M.; Momenifar, N.; Mohajeri, P.; Emamie, A. DNA vaccine: Methods and mechanisms. *Advances in Human Biology* 2018, 8, 132-139, doi:10.4103/aihb.Aihb\_74\_17.
18. Cruvinel, W., Danilo; Araújo, J.; Catelan, T.; Souza, A.d.; Silva, N.A., Luís Coelho. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Revista Brasileira de Reumatologia* 2010, 50, 434-447, doi:10.1590/S0482-50042010000400008.
19. Clem, A. Fundamentals of vaccine immunology. *Journal of Global Infectious Diseases* 2011, 3, 73-78, doi:10.4103/0974-777x.77299.

20. Marshall, J.S.; Warrington, R.; Watson, W.; Kim, H.L. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology* 2018, 14, 49, doi:10.1186/s13223-018-0278-1.
21. Kindt, T.J., Godsby, R. A., Osborne, B. A., Kuby J. *Kuby Immunology*, 6 ed.; W. H. Freeman: New York, 2007.
22. Bellino, S. COVID-19 vaccines approved in the European Union: current evidence and perspectives. *Expert Review of Vaccines* 2021, 20, 1195-1199, doi:10.1080/14760584.2021.1962304.
23. Mallapaty, S. India's DNA COVID vaccine is a world first - more are coming. *Nature* 2021, 597, 161-162, doi:10.1038/d41586-021-02385-x.
24. Liu, M.A. DNA vaccines: a review. *Journal of Internal Medicine* 2003, 253, 402-410, doi:10.1046/j.1365-2796.2003.01140.x.
25. Lee, K.; Kim, M.; Seo, Y.; Lee, H. Development of mRNA vaccines and their prophylactic and therapeutic applications. *Nano Research* 2018, 11, 5173-5192, doi:10.1007/s12274-018-2095-8.
26. Gurunathan, S.; Wu, C.Y.; Freidag, B.L.; Seder, R.A. DNA vaccines: a key for inducing long-term cellular immunity. *Curr Opin Immunol* 2000, 12, 442-447, doi:10.1016/s0952-7915(00)00118-7.
27. Kutzler, M.A.; Weiner, D.B. DNA vaccines: ready for prime time? *Nature Reviews Genetics* 2008, 9, 776-788, doi:10.1038/nrg2432.
28. Sahin, U.; Oehm, P.; Derhovanessian, E.; Jabulowsky, R.A.; Vormehr, M.; Gold, M.; Maurus, D.; Schwarck-Kokarakis, D.; Kuhn, A.N.; Omokoko, T.; et al. An RNA vaccine drives immunity in checkpoint-inhibitor-treated melanoma. *Nature* 2020, 585, 107-112, doi:10.1038/s41586-020-2537-9.
29. Donnelly, J.; Berry, K.; Ulmer, J.B. Technical and regulatory hurdles for DNA vaccines. *International Journal for Parasitology* 2003, 33, 457-467, doi:10.1016/S0020-7519(03)00056-0.
30. Ledesma-Feliciano, C.; Chapman, R.; Hooper, J.W.; Elma, K.; Zehring, D.; Brennan, M.B.; Spiegel, E.K. Improved DNA Vaccine Delivery with Needle-Free Injection Systems. *Vaccines (Basel)* 2023, 11, doi:10.3390/vaccines11020280.
31. Smith, H.A.; Klinman, D.M. The regulation of DNA vaccines. *Current Opinion in Biotechnology* 2001, 12, 299-303, doi:10.1016/S0958-1669(00)00215-9.
32. Hobernik, D.; Bros, M. DNA Vaccines—How Far From Clinical Use? *International Journal of Molecular Sciences* 2018, 19, 3605, doi:10.3390/ijms19113605.
33. Khan, S.; Ullah, M.W.; Siddique, R.; Nabi, G.; Manan, S.; Yousaf, M.; Hou, H. Role of Recombinant DNA Technology to Improve Life. *International Journal of Genomics* 2016, 2016, 2405954, doi:10.1155/2016/2405954.
34. Lim, M.; Badruddoza, A.Z.M.; Firdous, J.; Azad, M.; Mannan, A.; Al-Hilal, T.A.; Cho, C.-S.; Islam, M.A. Engineered Nanodelivery Systems to Improve DNA Vaccine Technologies. *Pharmaceutics* 2020, 12, 30, doi:10.3390/pharmaceutics12010030.
35. Elvidge, S. Melanoma vaccine for dogs. *Nature Biotechnology* 2010, 28, 189, doi:10.1038/nbt0310-189a.
36. Jirikowski, G.F.; Sanna, P.P.; Maciejewski-Lenoir, D.; Bloom, F.E. Reversal of Diabetes Insipidus in Brattleboro Rats: Intrahypothalamic Injection of Vasopressin mRNA. *Science* 1992, 255, 996-998, doi:10.1126/science.1546298.
37. Fuller, D.H.; Berglund, P. Amplifying RNA Vaccine Development. *New England Journal of Medicine* 2020, 382, 2469-2471, doi:10.1056/NEJMcibr2009737.
38. Liu, M.A. A Comparison of Plasmid DNA and mRNA as Vaccine Technologies. *Vaccines* 2019, 7, 37, doi:10.3390/vaccines7020037.
39. Bloom, K.; van den Berg, F.; Arbuthnot, P. Self-amplifying RNA vaccines for infectious diseases. *Gene Therapy* 2021, 28, 117-129, doi:10.1038/s41434-020-00204-y.
40. Lundstrom, K. Latest development on RNA-based drugs and vaccines. *Future Science OA* 2018, 4, doi:10.4155/fsoa-2017-0151.



41. Wang, Y.; Zhang, Z.; Luo, J.; Han, X.; Wei, Y.; Wei, X. mRNA vaccine: a potential therapeutic strategy. *Molecular Cancer* 2021, 20, 33, doi:10.1186/s12943-021-01311-z.
42. Karikó, K.; Muramatsu, H.; Welsh, F.A.; Ludwig, J.; Kato, H.; Akira, S.; Weissman, D. Incorporation of Pseudouridine Into mRNA Yields Superior Nonimmunogenic Vector With Increased Translational Capacity and Biological Stability. *Molecular Therapy* 2008, 16, 1833-1840, doi:10.1038/mt.2008.200.
43. Islam, M.A.; Reesor, E.K.G.; Xu, Y.; Zope, H.R.; Zetter, B.R.; Shi, J. Biomaterials for mRNA delivery. *Biomaterials Science* 2015, 3, 1519-1533, doi:10.1039/C5BM00198F.
44. Li, M.; Li, Y.; Li, S.; Jia, L.; Wang, H.; Li, M.; Deng, J.; Zhu, A.; Ma, L.; Li, W.; et al. The nano delivery systems and applications of mRNA. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2022, 227, 113910, doi:10.1016/j.ejmech.2021.113910.
45. Azizi, M.; Shahgolzari, M.; Fathi-Karkan, S.; Ghasemi, M.; Samadian, H. Multifunctional plant virus nanoparticles: An emerging strategy for therapy of cancer. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology* 2022, e1872, doi:10.1002/wnan.1872.
46. Blakney, A.K.; Ip, S.; Geall, A.J. An Update on Self-Amplifying mRNA Vaccine Development. *Vaccines* 2021, 9, 97, doi:10.3390/vaccines9020097.
47. Alfagih, I.M.; Aldosari, B.; AlQuadeib, B.; Almurshedi, A.; Alfagih, M.M. Nanoparticles as Adjuvants and Nanodelivery Systems for mRNA-Based Vaccines. *Pharmaceutics* 2021, 13, 45, doi:10.3390/pharmaceutics13010045.
48. Reichmuth, A.M.; Oberli, M.A.; Jaklenec, A.; Langer, R.; Blankschtein, D. mRNA vaccine delivery using lipid nanoparticles. *Therapeutic Delivery* 2016, 7, 319-334, doi:10.4155/tde-2016-0006.
49. Al-Dosari, M.S.; Gao, X. Nonviral gene delivery: principle, limitations, and recent progress. *AAPS J* 2009, 11, 671-681, doi:10.1208/s12248-009-9143-y.
50. Nayerossadat, N.; Maedeh, T.; Ali, P.A. Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. *Adv Biomed Res* 2012, 1, 27, doi:10.4103/2277-9175.98152.
51. Mintzer, M.A.; Simanek, E.E. Nonviral Vectors for Gene Delivery. *Chemical Reviews* 2009, 109, 259-302, doi:10.1021/cr800409e.
52. Oh, S.; Kessler, J.A. Design, Assembly, Production, and Transfection of Synthetic Modified mRNA. *Methods* 2018, 133, 29-43, doi:10.1016/j.ymeth.2017.10.008.
53. Mu, X.; Greenwald, E.; Ahmad, S.; Hur, S. An origin of the immunogenicity of in vitro transcribed RNA. *Nucleic Acids Res* 2018, 46, 5239-5249, doi:10.1093/nar/gky177.
54. Linares-Fernández, S.; Lacroix, C.; Exposito, J.-Y.; Verrier, B. Tailoring mRNA Vaccine to Balance Innate/Adaptive Immune Response. *Trends in Molecular Medicine* 2020, 26, 311-323, doi:10.1016/j.molmed.2019.10.002.
55. Kis, Z.; Kontoravdi, C.; Shattock, R.; Shah, N. Resources, Production Scales and Time Required for Producing RNA Vaccines for the Global Pandemic Demand. *Vaccines* 2021, 9, 205, doi:10.3390/vaccines9010003.
56. Bourquin, C.; Schmidt, L.; Hornung, V.; Wurzenberger, C.; Anz, D.; Sandholzer, N.; Schreiber, S.; Voelkl, A.; Hartmann, G.; Endres, S. Immunostimulatory RNA oligonucleotides trigger an antigen-specific cytotoxic T-cell and IgG2a response. *Blood* 2007, 109, 2953-2960, doi:10.1182/blood-2006-07-033258.
57. Basta NE and Moodie EMM on behalf of the VIPER (Vaccines, I.d.P., and Epidemiology Research) Group COVID-19 Vaccine Development and Approvals Tracker Team. COVID-19 Vaccine Development and Approvals Tracker. Available online: covid19.trackvaccines.org/ (accessed on November 14 2022).
58. Moderna, mRNA pipeline. Available online: <https://www.modernatx.com/research/product-pipeline> (accessed on April 22 2023).
59. Vervaeke, P.; Borgos, S.E.; Sanders, N.N.; Combes, F. Regulatory guidelines and preclinical tools to study the biodistribution of RNA therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2022, 184, 114236, doi:10.1016/j.addr.2022.114236.

60. Guerriaud, M.; Kohli, E. RNA-based drugs and regulation: Toward a necessary evolution of the definitions issued from the European union legislation. *Frontiers in Medicine* 2022, 9, doi:10.3389/fmed.2022.1012497.
61. WHO Expert Committee on Biological Standardization: seventy-fourth report. Annex 3: Evaluation of the quality, safety and efficacy of messenger RNA vaccines for the prevention of infectious diseases: regulatory considerations. Available online: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240046870> (accessed on June 18 2023).
62. Pardi, N.; Hogan, M.J.; Porter, F.W.; Weissman, D. mRNA vaccines — a new era in vaccinology. *Nature Reviews Drug Discovery* 2018, 17, 261-279, doi:10.1038/nrd.2017.243.
63. Schwartz, J.; Yen, M.-Y. Toward a collaborative model of pandemic preparedness and response: Taiwan's changing approach to pandemics. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 2017, 50, 125-132, doi:10.1016/j.jmii.2016.08.010.
64. Ashwanden, C. The false promise of herd immunity for COVID-19. *Nature* 2020, 587, 26-28, doi:10.1038/d41586-020-02948-4.
65. Wu, F.; Zhao, S.; Yu, B.; Chen, Y.-M.; Wang, W.; Song, Z.-G.; Hu, Y.; Tao, Z.-W.; Tian, J.-H.; Pei, Y.-Y.; et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* 2020, 579, 265-269, doi:10.1038/s41586-020-2008-3.
66. Chen, Y.; Liu, Q.; Guo, D. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *J Med Virol* 2020, 92, 418-423, doi:10.1002/jmv.25681.
67. Dong, Y.; Dai, T.; Wei, Y.; Zhang, L.; Zheng, M.; Zhou, F. A systematic review of SARS-CoV-2 vaccine candidates. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2020, 5, 237, doi:10.1038/s41392-020-00352-y.
68. Walls, A.C.; Park, Y.J.; Tortorici, M.A.; Wall, A.; McGuire, A.T.; Veesler, D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell* 2020, 183, 1735, doi:10.1016/j.cell.2020.11.032.
69. Koirala, A.; Joo, Y.J.; Khatami, A.; Chiu, C.; Britton, P.N. Vaccines for COVID-19: The current state of play. *Paediatric Respiratory Reviews* 2020, 35, 43-49, doi:10.1016/j.prrv.2020.06.010.
70. Khade, S.M.; Yabaji, S.M.; Srivastava, J. An update on COVID-19: SARS-CoV-2 life cycle, immunopathology, and BCG vaccination. *Preparative Biochemistry & Biotechnology* 2021, 51, 650-658, doi:10.1080/10826068.2020.1848869.
71. Shereen, M.A.; Khan, S.; Kazmi, A.; Bashir, N.; Siddique, R. COVID-19 infection: Emergence, transmission, and characteristics of human coronaviruses. *Journal of Advanced Research* 2020, 24, 91-98, doi:10.1016/j.jare.2020.03.005.
72. Papageorgiou, A.C.; Mohsin, I. The SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein as a Drug and Vaccine Target: Structural Insights into Its Complexes with ACE2 and Antibodies. *Cells* 2020, 9, 2343, doi:10.3390/cells9112343.
73. Deming, M.E.; Michael, N.L.; Robb, M.; Cohen, M.S.; Neuzil, K.M. Accelerating Development of SARS-CoV-2 Vaccines — The Role for Controlled Human Infection Models. *New England Journal of Medicine* 2020, 383, e63, doi:10.1056/NEJMp2020076.
74. Jackson, L.A.; Anderson, E.J.; Rouphael, N.G.; Roberts, P.C.; Makhene, M.; Coler, R.N.; McCullough, M.P.; Chappell, J.D.; Denison, M.R.; Stevens, L.J.; et al. An mRNA Vaccine against SARS-CoV-2 — Preliminary Report. *New England Journal of Medicine* 2020, 383, 1920-1931, doi:10.1056/NEJMoa2022483.
75. Jhaveri, R. The COVID-19 mRNA Vaccines and the Pandemic: Do They Represent the Beginning of the End or the End of the Beginning? *Clinical Therapeutics* 2021, 43, 549-556, doi:10.1016/j.clinthera.2021.01.014.
76. Komaroff, A.L. Why are mRNA vaccines so exciting? Available online: <https://www.health.harvard.edu/blog/why-are-mrna-vaccines-so-exciting-2020121021599> (accessed on April 7 2022).
77. Crommelin, D.J.A.; Anchordoquy, T.J.; Volkin, D.B.; Jiskoot, W.; Mastrobattista, E. Addressing the Cold Reality of mRNA Vaccine Stability. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2021, 110, 997-1001, doi:10.1016/j.xphs.2020.12.006.
78. Precision Vaccinations, ZyCoV-D COVID-19 Vaccine. Available online: <https://www.precisionvaccinations.com/vaccines/zycov-d-covid-19-vaccine> (accessed on April 4 2022).

79. Fahrni, M.L.; Ismail, I.A.-N.; Refi, D.M.; Almeman, A.; Yaakob, N.C.; Saman, K.M.; Mansor, N.F.; Noordin, N.; Babar, Z.-U.-D. Management of COVID-19 vaccines cold chain logistics: a scoping review. *J Pharm Policy Pract* 2022, 15, 16-16, doi:10.1186/s40545-022-00411-5.
80. Fiolet, T.; Kherabi, Y.; MacDonald, C.J.; Ghosn, J.; Peiffer-Smadja, N. Comparing COVID-19 vaccines for their characteristics, efficacy and effectiveness against SARS-CoV-2 and variants of concern: a narrative review. *Clinical Microbiology and Infection* 2022, 28, 202-221, doi:10.1016/j.cmi.2021.10.005.
81. Cohen, S.N.; Chang, A.C.Y.; Boyer, H.W.; Helling, R.B. Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids In Vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1973, 70, 3240-3244, doi:doi:10.1073/pnas.70.11.3240.
82. Prajapat, R.; Jain, S. Advancement in Medical Biotechnology: A Review. *International Journal of Medical Reviews* 2022, 9, 217-226, doi:10.30491/ijmr.2021.279672.1197.
83. Fang, J.; Zhu, X.; Wang, C.; Shangguan, L. Applications of DNA Technologies in Agriculture. *Curr Genomics* 2016, 17, 379-386, doi:10.2174/1389202917666160331203224.
84. Šlesingerová, E. Recombinant DNA and Genome-editing Technologies: Embodied Utopias and Heterotopias. *Body & Society* 2021, 27, 32-57, doi:10.1177/1357034x21998449.
85. Olempska-Beer, Z.S.; Merker, R.I.; Ditto, M.D.; DiNovi, M.J. Food-processing enzymes from recombinant microorganisms--a review. *Regul Toxicol Pharmacol* 2006, 45, 144-158, doi:10.1016/j.yrtph.2006.05.001.
86. Yadav, T.; Srivastava, N.; Mishra, G.; Dhama, K.; Kumar, S.; Puri, B.; Saxena, S.K. Recombinant vaccines for COVID-19. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 2020, 16, 2905-2912, doi:10.1080/21645515.2020.1820808.
87. Khan, M.Y.A., M.; Alghamdi, K.; Qadri, I. Biotechnology and its applications in vaccine development. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research* 2021, 37, 29114-29116, doi:10.26717/BJSTR.2021.37.005949.
88. Yadav, D.K.; Yadav, N.; Khurana, S.M.P. Chapter 26 - Vaccines: Present Status and Applications. In *Animal Biotechnology*, Verma, A.S., Singh, A., Eds.; Academic Press: San Diego, 2014; pp. 491-508.
89. Khan, K.H. DNA vaccines: roles against diseases. *Germs* 2013, 3, 26-35, doi:10.11599/germs.2013.1034.
90. Martins, L.M.; Pedro, A.Q.; Opolzer, D.; Sousa, F.; Queiroz, J.A.; Passarinha, L.A. Enhanced biosynthesis of plasmid DNA from *Escherichia coli* VH33 using Box-Behnken design associated to aromatic amino acids pathway. *Biochemical Engineering Journal* 2015, 98, 117-126, doi:10.1016/j.bej.2015.02.001.
91. Sousa, Â.; Almeida, A.M.; Valente, J.; Queiroz, J.; Sousa, F. Hands-On Laboratory Class for Biopharmaceutical pDNA Quality Control. *Journal of Chemical Education* 2022, 99, 975-982, doi:10.1021/acs.jchemed.1c00695.
92. Valente, J.F.A.; Queiroz, J.A.; Sousa, F. Dilemma on plasmid DNA purification: binding capacity vs selectivity. *Journal of Chromatography A* 2021, 1637, 461848, doi:10.1016/j.chroma.2020.461848.
93. Agency, E.M. European Medicines Agency (EMA), Quality, preclinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products - Scientific guideline. Available online: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-guideline-quality-non-clinical-clinical-aspects-gene-therapy-medicinal-products\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-guideline-quality-non-clinical-clinical-aspects-gene-therapy-medicinal-products_en.pdf) (accessed on May 11 2023).
94. Prazeres, D.M.F.; Ferreira, G.N.M. Design of flowsheets for the recovery and purification of plasmids for gene therapy and DNA vaccination. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 2004, 43, 609-624, doi:10.1016/j.cep.2003.02.002.
95. Cupillard, L.; Juillard, V.; Latour, S.; Colombet, G.; Cachet, N.; Richard, S.; Blanchard, S.; Fischer, L. Impact of plasmid supercoiling on the efficacy of a rabies DNA vaccine to protect cats. *Vaccine* 2005, 23, 1910-1916, doi:10.1016/j.vaccine.2004.10.018.
96. Wang, M.; Jiang, S.; Wang, Y. Recent advances in the production of recombinant subunit vaccines in *Pichia pastoris*. *Bioengineered* 2016, 7, 155-165, doi:10.1080/21655979.2016.1191707.
97. Bill, R.M. Recombinant protein subunit vaccine synthesis in microbes: a role for yeast? *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2015, 67, 319-328, doi:10.1111/jphp.12353.

98. Castro, L.S.; Lobo, G.S.; Pereira, P.; Freire, M.G.; Neves, M.C.; Pedro, A.Q. Interferon-Based Biopharmaceuticals: Overview on the Production, Purification, and Formulation. *Vaccines* 2021, 9, 328, doi:10.3390/vaccines9040328.
99. Pedro, A.Q.; Queiroz, J.A.; Passarinha, L.A. Smoothing membrane protein structure determination by initial upstream stage improvements. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2019, 103, 5483-5500, doi:10.1007/s00253-019-09873-1.
100. Vieira Gomes, A.M.; Souza Carmo, T.; Silva Carvalho, L.; Mendonça Bahia, F.; Parachin, N.S. Comparison of Yeasts as Hosts for Recombinant Protein Production. *Microorganisms* 2018, 6, doi:10.3390/microorganisms6020038.
101. Gonçalves, A.M.; Pedro, A.Q.; Maia, C.; Sousa, F.; Queiroz, J.A.; Passarinha, L.A. *Pichia pastoris*: a recombinant microfactory for antibodies and human membrane proteins. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 2013, 23, 587-601, doi:10.4014/jmb.1210.10063.
102. Gomez, P.L.; Robinson, J.M. Vaccine Manufacturing. Plotkin's *Vaccines* 2018, 51-60.e51, doi:10.1016/B978-0-323-35761-6.00005-5.
103. Zhao, M.; Vandersluis, M.; Stout, J.; Haupts, U.; Sanders, M.; Jacquemart, R. Affinity chromatography for vaccines manufacturing: Finally ready for prime time? *Vaccine* 2019, 37, 5491-5503, doi:10.1016/j.vaccine.2018.02.090.
104. Castro, L.S.; Pereira, P.; Passarinha, L.A.; Freire, M.G.; Pedro, A.Q. Enhanced performance of polymer-polymer aqueous two-phase systems using ionic liquids as adjuvants towards the purification of recombinant proteins. *Separation and Purification Technology* 2020, 248, 117051, doi:10.1016/j.seppur.2020.117051.
105. Castro, L.S.P., P.; Freire, M.G.; Pedro, A.Q. Progress in the development of aqueous two-phase systems comprising ionic liquids for the downstream processing of protein-based biopharmaceuticals. *American Pharmaceutical Review* 2019.
106. Nooraei, S.; Bahrulolum, H.; Hoseini, Z.S.; Katalani, C.; Hajizade, A.; Easton, A.J.; Ahmadian, G. Virus-like particles: preparation, immunogenicity and their roles as nanovaccines and drug nanocarriers. *Journal of Nanobiotechnology* 2021, 19, 59, doi:10.1186/s12951-021-00806-7.