



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Patrícia Alexandra Jacinto Piçarra

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Virus-like particles based vaccines and their role in the COVID-19 pandemic”, sob a orientação da Dra. Fátima Bastos, do Dr. Mário Patrício, e da Professora Doutora Olga Borges Ribeiro apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro de 2021



UNIVERSIDADE D COIMBRA

Patrícia Alexandra Jacinto Piçarra

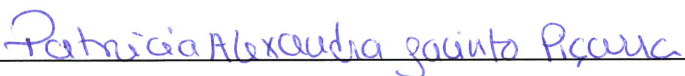
Relatórios de Estágio e Monografia intitulada "Virus-like particles based vaccines and their role in the COVID-19 pandemic", sob a orientação da Dra. Fátima Bastos, do Dr. Mário Patrício, e da Professora Doutora Olga Borges Ribeiro apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro 2021

Eu, Patrícia Alexandra Jacinto Piçarra, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2016253476, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Virus-like particles based vaccines and their role in the COVID-19 pandemic” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este Documento é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 13 de setembro de 2021.



(Patrícia Alexandra Jacinto Piçarra)

I. Agradecimentos

A toda a equipa de excelentes profissionais da Farmácia Garção pela simpatia, confiança, exemplo, e por terem tornado o meu primeiro grande contacto com a Farmácia Comunitária numa história tão bonita.

A todos os profissionais da Generis SA. pelos ensinamentos e paciência.

À Professora Doutora Olga pelos ensinamentos, e pela orientação da minha monografia.

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra que me formou enquanto Farmacêutica.

Às minhas amigas de Coimbra, elas sabem quem são, por terem tornado estes anos inesquecíveis.

Ao Luís, pela paciência.

À minha mãe, ao meu pai e à minha irmã, pelo apoio, pelo esforço, pela dedicação, e pelo porto seguro.

A todos vós, obrigada! Estar-vos-ei para sempre grata.

Índice Geral

CAPÍTULO I | RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM FARMÁCIA COMUNITÁRIA

1 Introdução.....	8
2 A Farmácia Garção	8
3 ANÁLISE SWOT	9
3.1 Pontos Fortes	9
a) Equipa.....	9
b) Localização e horário da Farmácia.....	10
c) Plano de estágio	11
d) Programa Valormed	11
e) Caixa única.....	12
f) Oferta de Serviços	12
g) Dermocosmética e Puericultura	12
h) Autonomia e responsabilidade na realização de tarefas	13
3.2 Pontos Fracos.....	13
a) Dificuldade inicial de associação nome comercial ao princípio ativo.....	13
b) Espaço dos produtos veterinários	13
3.3 Oportunidades	14
a) Lares de idosos - Preparação Unitária.....	14
b) Serviços de Farmacoterapia e Aconselhamento Farmacêutico	14
c) Medicação hospitalar em contexto COVID-19.....	15
3.4 Ameaças.....	15
a) Receitas manuais	15
b) Facilidade de acesso a fontes de informação pouco fiável / venda de MNSRM fora das farmácias	16
4 Notas Finais.....	17
5 Casos Práticos	18
Referências Bibliográficas	20

CAPÍTULO II | RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM INDÚSTRIA FARMACÊUTICA

Abreviaturas	23
1 Introdução.....	24
2 A Generis SA.....	24
3 Análise SWOT	25
3.1 Forças.....	26
a) Bom acolhimento - Equipa multidisciplinar.....	26
b) Formações	26
c) Diversidade de tarefas.....	27
d) Autonomia - Inclusão no contexto real do trabalho.....	28
e) Medicina do trabalho	28
3.2 Fraquezas	29
a) Duração do estágio.....	29
b) Baixa rotatividade entre as diferentes equipas do CQ.....	29
c) Ferramentas de trabalho pouco informatizadas	29
3.3 Oportunidades.....	30
a) Aplicação de conhecimentos.....	30
b) Auditorias Internas.....	30

3.4 Ameaças.....	31
a) Baixa representatividade de farmacêuticos.....	31
4 Notas Finais.....	31
Referências Bibliográficas	32

CAPITULO III | MONOGRAFIA - “Virus-like particles based vaccines and their role in the COVID-19 pandemic”

Abstract	34
Resumo.....	35
Abbreviations.....	37
1 Introduction	39
2 The virus and its structure.....	41
3 VLPs Production methods - Expression system	47
3.1 Bacteria - A research opportunity.....	48
3.2 Yeast - The most proven expression system	50
3.3 Baculovirus/Insect Cells – One of the most commonly used	51
3.4 Plants - Are edible vaccines the goal?	52
3.5 Mammalian Cells - The production of the most complex VLPs	53
4 SARS-COV-2 VLP Candidate vaccines.....	55
4.1 Plants as a production system and the Proficia® technology	55
4.2 Mammalian cells based vaccine	56
4.3 SpyTag/SpyCatcher technology.....	56
4.4 Others.....	59
5 Conclusion and Future Perspectives	60
6 References.....	62

Capítulo I

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária



Farmácia Garção

Sob orientação da Dra. Fátima Bastos

Abreviaturas

MAPA - Monitorização Ambulatória da Pressão Arterial

MICF - Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MNSRM - Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica

OGF - Organização e Gestão Farmacêutica

PUV - Preparações de Uso Veterinário

SIGREM - Sistema Integrado de Gestão de Resíduos de Embalagens e Medicamentos

SWOT - Forças (*Strengths*), Fraquezas (*Weaknesses*), Oportunidades (*Opportunities*), Ameaças (*Threats*)

1. Introdução

Findados quase 5 anos de formação o estágio curricular em Farmácia Comunitária era um momento por mim muito aguardado. Mesmo depois de escolher o Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) como o curso pelo qual queria enveredar, a Farmácia Comunitária nunca foi uma área pela qual tivesse imenso interesse. Não obstante, com o passar do tempo e com o conhecimento que fui obtendo em farmacologia o gosto pelo aconselhamento foi surgindo naturalmente. Hoje em dia vejo com clareza que o papel dos farmacêuticos comunitários é importantíssimo. A importância da farmácia comunitária, e dos farmacêuticos comunitários, nos cuidados primários de saúde é inquestionável quer ao nível do rastreio de cuidados de saúde que necessitam de ser encaminhados, quer ao nível do acompanhamento e resolução de situações de menor gravidade.

Neste relatório de estágio, que apresento sob a forma de análise SWOT, pretendo explicar os pontos fortes (*Strengths*), os pontos fracos (*Weaknesses*), as oportunidades (*Opportunities*) e ameaças (*Threats*) que vivi durante a minha passagem pela Farmácia Garção como estagiária de Ciências Farmacêuticas.

2. A Farmácia Garção

A Farmácia Garção, em Torres Vedras, é uma farmácia com mais de 30 anos de experiência, onde se privilegia o atendimento do utente procurando a sua satisfação através da qualidade do aconselhamento farmacêutico prestado.

Disponibiliza a quem a visita uma série de produtos e serviços de ortopedia, dermocosmética, ortopedia, nutrição e bem-estar, puericultura, veterinária, para além de uma série de diagnósticos bioquímicos, e diagnóstico cutâneo e capilar (1).

3. ANÁLISE SWOT

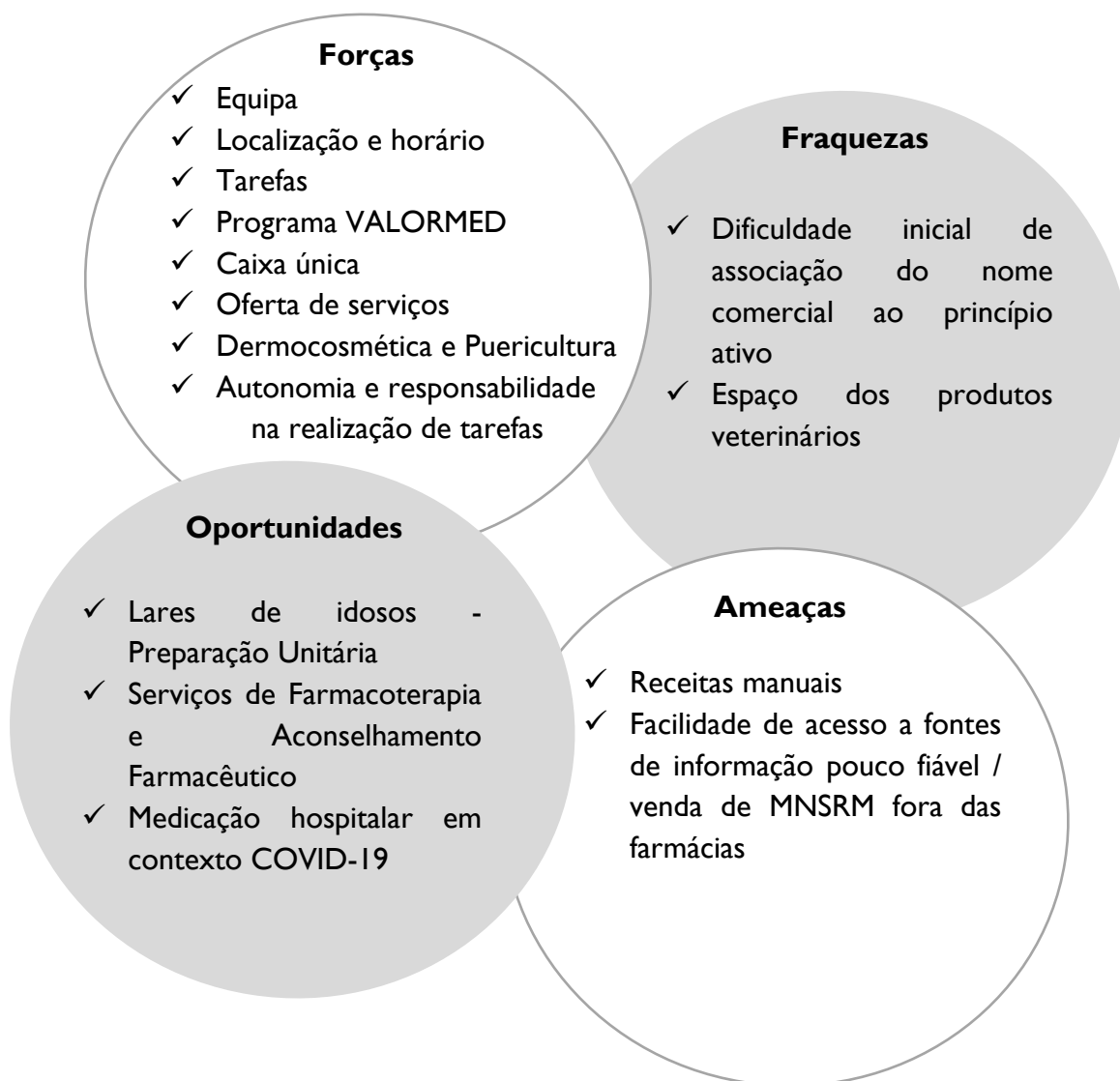


Figura 1 Esquema da Análise SWOT relativa ao estágio curricular realizado na Farmácia Garção.

3.1 Pontos Fortes

a) Equipa

O meu objetivo enquanto estagiária foi, como deve ser, o de absorver o máximo de conhecimento possível.

Neste meu processo de aprendizagem os alicerces foram todos os elementos da equipa de profissionais da Farmácia Garção. Ao longo do estágio, como é natural, tive dúvidas de como seria a melhor forma de proceder em determinadas situações, e tive sempre todo o

apoio e abertura para tirar qualquer dúvida que me surgisse. Toda a equipa, desde farmacêuticos, técnicos e equipa de armazém, sempre se mostrou disponível para me ensinar qualquer coisa em que eu mostrasse interesse em aprender, quer estivesse relacionada com as minhas funções do momento, quer não. Senti sempre uma preocupação de todos para com a minha aprendizagem durante o tempo em que estive na equipa. De notar que a Dra. Fátima Bastos, enquanto minha orientadora de estágio, teve sempre a preocupação de semanalmente confirmar se todos os pontos referidos no plano de estágio tinham sido, na minha perspetiva, suficientemente sedimentados.

Toda a equipa é dinâmica, bem-disposta e profissional, o que é, sem dúvida, uma grande mais-valia para a farmácia.

b) Localização e horário da Farmácia

A Farmácia Garção localiza-se na rua Amadeu Rodrigues Ferreira Matias em Torres Vedras, mesmo em frente à CUF, e muito próxima do Centro de Saúde. O horário de funcionamento é das 8h30-21h durante a semana, e das 9h-19h ao sábado, sendo que, de 9 em 9 dias a farmácia Garção está de serviço.

Uma vez que a localização da farmácia é bastante próxima de uma clínica CUF, e também do centro de saúde acaba ter uma afluência de várias classes etárias e socioeconómicas, o que contribui para que tenha tido contacto com situações muito diversificadas. Considero que esta realidade me foi vantajosa por me obrigar a ter de me adaptar a situações e utentes bastante diferentes entre si. Tínhamos, por um lado, os utentes que são fidelizados e com os quais se consegue fazer acompanhamento, e por outro, os utentes que passam na farmácia após ir a consultas na CUF para levantar a sua medicação e apresentam situações mais diferenciadas. Inclusive, aconteceu durante o meu estágio, pessoas que não conseguiam consultas, nem na CUF nem no Centro de Saúde e não queriam ir ao hospital devido ao contexto COVID-19, passarem pela farmácia a pedir ajuda. Essas situações são muito desafiantes pois, muitas vezes, não podemos tratar o problema, mas tentamos sempre arranjar uma forma de ajudar.

No que concerne ao horário de funcionamento considero-o também um ponto positivo, pois como passei pelos diferentes horários consegui ter contacto com diferentes afluências de pessoas. Pela manhã predominam os atendimentos a pessoas mais velhas, e ao fim do dia a pessoas mais jovens, e conseqüentemente, as necessidades destas pessoas, e o tipo de atendimento são também diferentes.

c) Plano de estágio

Como aspirante a farmacêutica é expectável que durante o estágio curricular ganhe aptidão para desempenhar todas as tarefas que um farmacêutico desempenha numa farmácia. O meu plano de estágio estava claramente em concordância com isso, plano de estágio esse que foi sempre cumprido.

Fiz todas as atividades de *BackOffice*, desde receção e gestão de encomendas, arrumação dos medicamentos, organização dos lineares, inventário, organização da medicação para os lares, 1ª conferência da medicação unidose, entre outras.

Numa fase mais avançada do meu estágio comecei a fazer atendimento. Considero que me foram previamente dadas todas as ferramentas necessárias para que este grande passo corresse da forma mais natural e calma possível. Tive ainda a oportunidade de, com ajuda, fazer medições de parâmetros bioquímicos, como medições de tensão arterial, colesterol, e glicémia, e fazer o respetivo aconselhamento consoantes os resultados dos mesmos. Foi muito positivo para mim o facto de todos os farmacêuticos que me acompanharam me terem dado espaço para crescer, estando sempre na minha retaguarda para me acompanhar e ajudar em tudo o que eu ia precisando.

Considero que, desta forma, adquiri e solidifiquei conhecimentos basilares naquilo que são as funções de um farmacêutico comunitário.

d) Programa Valormed

A VALORMED é uma sociedade sem fins lucrativos responsável pela gestão de resíduos de medicamentos fora de uso e respetivas embalagens através do Sistema Integrado de Gestão de Resíduos de Embalagens e Medicamentos (SIGREM) (2). Desta forma, o programa VALORMED alia a proteção do meio ambiente e a não utilização incorreta dos medicamentos, dado que pretende evitar que as pessoas guardem medicamentos fora de uso em casa.

A Farmácia Garção colabora com o programa VALORMED, e portanto coloca à disposição dos seus utentes um caixote na entrada da farmácia.

Durante o meu estágio interagi de perto com todo processo, desde o alerta que é feito aos utentes para a importância de utilizarem o caixote, até proceder à selagem para que fossem recolhidos pelo armazenista.

e) Caixa única

Ao contrário do que se passa na maioria das farmácias a Farmácia Garção funciona com uma caixa única, ao qual o utente se dirige para pagar após usufruir do atendimento e aconselhamento com o farmacêutico. Considero que esta realidade foi vantajosa para o meu estágio uma vez que quando iniciei a fase do atendimento o facto de não me ter de preocupar com a parte do pagamento foi positivo, visto que assim tinha toda a minha atenção concentrada no ato da indicação, e portanto, era menos um fator de ansiedade.

Para além disso, considero ainda que a caixa central e o facto de o utente não fazer o ato de pagamento diretamente ao farmacêutico é vantajoso no sentido em que, o ato de pagamento acaba por, na ótica do utente, lhe conferir um certo poder. Consequentemente, por vezes, pode acabar por levar a que as pessoas pensem que podem opinar sobre a decisão do farmacêutico.

Durante o estágio passei pela caixa, o que me foi útil para ganhar à vontade na parte de pagamento do SIFARMA, pois poderei trabalhar numa farmácia que não tenha caixa central.

f) Oferta de Serviços

A Farmácia Garção apresenta à disposição dos seus utentes uma gama alargada de serviços, de entre os quais consultas de nutrição, diagnósticos cutâneos e capilares, aconselhamento em dermocosmética, rastreios auditivos, medições de colesterol, glicemia, perfil lipídicos, pressão arterial e Monitorização Ambulatória da Pressão Arterial (MAPA). Esta vasta oferta de serviços é uma grande vantagem para a farmácia, pois leva a que muitos utentes se fidelizem. Também foi vantajoso para mim enquanto estagiária por me dar a conhecer tantos serviços diferentes, e mais conhecimento sobre cada um deles.

g) Dermocosmética e Puericultura

A farmácia Garção é uma Farmácia de referência no que concerne ao aconselhamento em dermocosmética. Há na equipa um elemento especializado que se foca exclusivamente nesta área. Para além disso, há à disposição dos utentes um sortido imenso, com diversos produtos, diversas marcas, para diferentes preços.

A dermocosmética é uma área importantíssima nas farmácias, e que se encontra em franco crescimento; durante todo o meu estágio sempre foi recorrente utentes irem à farmácia para receberem aconselhamento dermocosmético.

Embora a área da dermocosmética fosse a que menos me sentia à vontade para fazer aconselhamento, pois não conhecia as gamas, a verdade é que sendo a dermocosmética tão forte na Farmácia Garção me foi possível adquirir conhecimentos basilares no aconselhamento, conhecer melhor algumas gamas, e ganhar alguma sensibilidade na adequação dos produtos aos diferentes tipos de pele, e às diferentes necessidades de cada pele em cada momento.

h) Autonomia e responsabilidade na realização de tarefas

Desde o primeiro momento senti que me foi dada autonomia e responsabilidade na realização das minhas tarefas, o que me permitiu ganhar confiança nas minhas capacidades ao longo do tempo. De realçar que sempre tive todo o apoio, e sempre me senti segura, visto que sempre me foi dada a certeza de que a qualquer momento tinha alguém pronto para me ajudar, ou tirar qualquer dúvida de última hora.

3.2 Pontos Fracos

a) Dificuldade inicial de associação nome comercial ao princípio ativo

Um dos maiores pontos fracos do meu estágio foi, sem dúvida, a minha dificuldade inicial em fazer a associação entre o princípio ativo e o(s) nome(s) comerciais. Comecei por fazer *BackOffice*, mais concretamente receção e gestão de encomendas, o que me ajudou um pouco a colmatar essa dificuldade num primeiro momento, pois comecei desde logo a fazer um esforço de associação. Não obstante, quando iniciei o atendimento no caso de princípios ativos que apareciam menos vezes nas encomendas ainda tinha dificuldade em associar rapidamente.

Uma vez que, as prescrições, salvo exceções, são feitas por princípio ativo, muitas vezes quando o utente me pedia uma determinada marca eu tinha a necessidade de abrir toda a receita para conseguir perceber a que princípio ativo a marca correspondia.

b) Espaço dos produtos veterinários

Os produtos de uso veterinário não foram muito amplamente abordados durante o MICEF, tendo apenas sido lecionados numa cadeira de 5º ano. Embora a cadeira de Produtos de Uso Veterinário (PUV) tenha sido lecionada no último semestre de aulas, pouco antes do estágio, a verdade é que considero que esta é curta, e conseqüentemente não acho que tenha adquirido os conhecimentos suficientes para fazer um aconselhamento consistente dentro da área. A par disto, e devido à pouca procura de produtos veterinários pelos utentes a área

dedicada a produtos de veterinária não é muito extensa, e tão pouco tem muita procura, motivo pelo qual acho que continua a ser uma área na qual, embora tenha adquirido conhecimentos, há ainda muita coisa que tenho de explorar.

3.3 Oportunidades

a) Lares de idosos - Preparação Unitária

A Farmácia Garção disponibiliza um serviço de preparação de medicação individualizada unidose. Este serviço é prestado essencialmente a lares de idosos. Durante o meu estágio tive a oportunidade de acompanhar a preparação da medicação. Inicialmente é necessário introduzir os utentes no sistema e definir a medicação por dia e hora. A máquina TiMedi tem uma série de canisters onde são colocados os fármacos que a maioria dos utentes toma. Quando surgem alterações (ex. antibiótico que se vai adicionar à medicação durante um curto período de tempo), ou fármacos que poucos utentes tomam pode adicionar-se manualmente num tabuleiro por dia e hora, sendo esses também acrescentados assim às saquetas unidose. Todas as caixas de medicação inseridas na máquina têm de ter o seu código passado no sistema para que seja possível rastrear, caso haja necessidade. Feitos os rolos de medicação individualizada unidose, é feita dupla verificação para garantir que não há qualquer erro, de notar que este passo tem obrigatoriamente de ser realizado por um farmacêutico.

Considero que foi uma oportunidade conhecer este sistema. Embora tenha apenas feito a separação da medicação e a primeira verificação todo o processo me foi explicado, e foi mais uma área que pude conhecer e em que pude reter algum conhecimento.

b) Serviços de Farmacoterapia e Aconselhamento Farmacêutico

A Farmácia Garção, como supracitado, apresenta uma série de serviços que potenciam a fidelização dos utentes à farmácia. Não obstante, considero que seria uma grande oportunidade a implementação de consultas de farmacoterapia e aconselhamento farmacoterapêutico. Considero que este serviço, para além de ser cada vez mais procurado, é de extrema importância para a promoção da saúde dos utentes, especialmente os polimedicados. A profissão do Farmacêutico Comunitário tem, cada vez mais, vindo a perder o posicionamento que há uns anos tinha, muito devido a haver permissão para que pessoas sem formação em farmacologia e no medicamento possam desempenhar determinadas funções que deveriam ser, na minha opinião, somente do farmacêutico; nesse sentido, é cada vez mais nossa a responsabilidade de continuar a criar espaços, serviços, e motivos para que

as pessoas continuem a frequentar as farmácias por estas serem um espaço de excelência no aconselhamento de tudo o que envolve o medicamento, e o seu bem-estar no geral.

c) Medicação hospitalar em contexto COVID-19

Devido à situação de pandemia que vivemos, aquando do meu estágio, estava há relativamente pouco tempo em vigor a possibilidade de levantamento da medicação hospitalar na farmácia. A medicação chega à farmácia através da transportadora, e nessa altura a farmácia contacta o utente para informar da chegada da medicação. Considero uma grande oportunidade quer para a farmácia, quer para os farmacêuticos que têm assim a oportunidade de contactar com novos fármacos, o que é sempre uma oportunidade para ir à procura de mais conhecimento, e ainda para os utentes, pois desta forma não têm de se deslocar ao hospital para fazer o levantamento da sua medicação.

Para mim, enquanto estagiária, foi uma oportunidade no sentido em que, embora não tenha feito a cedência destes fármacos, pois era preciso o número da cédula profissional para tal, tive a oportunidade de acompanhar o processo, e perceber como funciona o mesmo.

3.4 Ameaças

a) Receitas manuais

Hoje em dia, na esmagadora maioria das vezes as receitas que chegam à farmácia são receitas eletrónicas, o que considero imensamente vantajoso no sentido em que diminui muitos possíveis erros na dispensa da medicação. No entanto, é ainda possível aos médicos prescrever receitas manuais se forem cumpridas algumas condições: prescrição ao domicílio, inaptidão do prescritor, falência informática ou até 40 receitas por mês.

A questão é que imensas vezes as receitas manuais são ilegíveis, ou vêm com informação em falta, como não indicar qual a dosagem ou tamanho da embalagem. Para além disso, muitas vezes estas receitas também surgem com a data errada, falta da vinheta do prescritor, entre outros erros, que impossibilitavam a aceitação da receita por parte da farmácia. Esta situação é deveras chata, e muitas vezes os utentes ficavam muito descontentes com a situação.

Desta forma, considero que as receitas manuais são uma ameaça ao bom funcionamento da cedência de medicação com base em prescrição, e muitas vezes colocam inclusive em risco a correta terapêutica dos utentes.

b) Facilidade de acesso a fontes de informação pouco fiável / venda de MNSRM fora das farmácias

Os Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica (MNSRM) para uso humano, que não sejam de venda exclusiva em farmácia, podem ser vendidos fora das farmácias (3). Esta realidade potencia, no meu ponto de vista, o uso irracional do medicamento. Acredito que todo e qualquer medicamento deve ser acompanhado de aconselhamento farmacêutico aquando da dispensa do mesmo. Todos os medicamentos podem causar problemas se não forem tomados da forma correta – “O medicamento certo, na dose certa, no momento certo”, esta deve ser sempre a máxima a cumprir.

Ainda neste seguimento, podemos verificar que as grandes cadeias de parafarmácias vieram também aumentar em muito a competitividade no setor, sendo que, dificilmente as farmácias conseguem competir com estas em termos de preço. Acontece inclusive as pessoas virem pedir aconselhamento, principalmente em relação à dermocosmética, dando muitas vezes a ideia de que iriam posteriormente adquirir o produto noutros sítios que conseguem fazer campanhas promocionais muito superiores às da farmácia. Também acontece chegarem à farmácia com um produto já comprado noutro local e pedirem o respetivo aconselhamento. Estas situações não são fáceis de gerir, e são uma enorme ameaça à competitividade das farmácias no mercado dos MNSRM.

Para além do fácil acesso aos medicamentos, o facto de hoje em dia haver a partir das redes sociais, e outros, uma elevada facilidade de partilha de informação leva a que as pessoas acabem por consumir informação que nem sempre é verdadeira, e que potencia uma tomada de decisão errada.

No sentido de ultrapassar esta ameaça considero que os farmacêuticos devem apostar cada vez mais em ter um papel ativo no aumento da literacia em saúde, para que a população consiga cada vez mais distinguir aquilo que são as fontes credíveis de informação daquelas que não o são. Para além disso, devem apostar como até aqui na qualidade de excelência da indicação e aconselhamento que prestam aos seus utentes para que estes percebam sempre que os farmacêuticos são os profissionais mais especializados no medicamento, e é com os farmacêuticos que se devem aconselhar. Os farmacêuticos são profissionais importantíssimos nos cuidados primários de saúde e devem sempre impor-se através do serviço de qualidade que prestam.

4. Notas Finais

Findado o meu estágio curricular em farmácia comunitária e fazendo o balanço do que significaram para a minha formação estes meses, posso dizer que uma das grandes conclusões a que cheguei foi que a farmácia comunitária é, sem dúvida, uma ferramenta crucial a nível dos cuidados básicos de saúde, e que tem toda a capacidade de influenciar positivamente a saúde e qualidade de vida da população. Quando, como quase farmacêutica, chego a esta conclusão não há como não sentir a missão de durante a minha vida profissional trabalhar afincadamente no sentido de contribuir para a melhoria da qualidade dos serviços prestados. Como especialista do medicamento creio que terei sempre a oportunidade de contribuir ativamente para tal.

Para além disso, percebi também que os farmacêuticos comunitários, embora já não tenham o mesmo posicionamento de outros tempos são profissionais de excelência, e devem continuar a lutar sempre pelo seu espaço como profissionais de saúde, pois sem dúvida que o serviço prestado pelos farmacêuticos em nada tem a ver com o serviço prestado por outros profissionais. Não obstante, acredito que haja lugar para todos, sendo claro, que os farmacêuticos são os profissionais de saúde mais qualificados nas farmácias, e nunca nos podemos esquecer disso.

Não posso terminar esta reflexão sobre este meu estágio curricular sem agradecer a toda a equipa da Farmácia Garção, todos sem exceção, contribuíram ativamente para que o meu estágio decorresse nas melhores condições possíveis, todos me ensinaram imenso e da melhor maneira que sabiam. De coração, ficar-lhes-ei sempre grata.

Em suma, considero que o meu estágio na Farmácia Garção correu muito bem, aprendi imenso, e adquiri ferramentas que serão certamente alicerces úteis, e necessários, na minha vida profissional.

5. Anexos

Caso I

Uma senhora dirigiu-se à farmácia com a sua filha de 13 anos. A menina fazia-se acompanhar por uma receita de isotretinoína 10 mg.

Em primeiro lugar, apesar da tenra idade da menina expliquei que a isotretinoína é teratogénica, e portanto enquanto durasse o tratamento era altamente desaconselhado engravidar.

Fiz a cedência da medicação prescrita. Expliquei de seguida que era importante fazer a aplicação diária de um protetor solar FPS 50+ diariamente, pois caso contrário poderiam ser tratadas as borbulhas mas ficarem manchas no rosto. Adverti ainda para o facto da isotretinoína potenciar uma secagem generalizada na pele, e não só; normalmente sendo os primeiros efeitos secundários a pele e lábios ficarem muito secos, pelo que aconselhei que fosse aplicado um bálsamo labial (La Roche-Posay Cicaplast Baume Lips® (4)) durante o tratamento e uma adequada hidratação da pele, para evitar tais efeitos secundários.

Para além disto, alertei para o facto de que possivelmente poderia vir a ser necessário fazer a lavagem da zona íntima com um gel hidratante (ex: Lactacyd hidratante® (5)), gotas oculares hidratantes (ex: Systane ULTRA® - gotas lubrificantes (6)), entre outros, pelo que, se surgissem estas necessidades posteriormente seriam efeitos secundários da medicação.

Caso II

Um jovem, na casa dos 25 anos, dirigiu-se à farmácia, por volta das 14h, queixando-se de que estava com diarreia desde essa manhã.

Perguntei se tinha febre, ou se tinha viajado recentemente, ao qual me respondeu que não. Disse-me também que não tomava nenhuma medicação. Questionei se estava por casa, ou se tinha de ir trabalhar, ao qual me disse que estava em casa em tele-trabalho.

Dadas as suas respostas, e sendo normalmente a diarreia auto-limitada, optei por aconselhar, desde logo, a ingestão de muitos líquidos para que não houvesse desidratação, e de eletrólitos, podendo fazer, por exemplo, Bi-Oral Suero® (7), e ainda Atyflor® (8), um simbiótico que atua restabelecendo a flora intestinal.

Posto isto, alertei para que caso a diarreia se prolongasse, houvesse febre, dor abdominal intensa, sangue nas fezes ou sinais de desidratação (boca seca, dores de cabeça, urina escura...) (9) devia recorrer a um médico.

Caso III

Uma senhora, de aproximadamente 35 anos, dirigiu-se à farmácia e solicitou ajuda pois apresentava sintomatologia daquilo que pensava ser o início de infecção urinária, pois apresenta frequentemente esta patologia. Apresentava disúria e aumento da frequência de micção associada a desconforto, sintomas esses que haviam começado durante a madrugada anterior. Dado que os sintomas eram recentes e ainda não havia perda de sangue, nem febre aconselhei a toma de CYS-RÉGUL® Flash (10) saquetas, fazendo uma saqueta diluída em água durante 5 dias. Alertei ainda para que podia ser interessante, para fazer posteriormente como prevenção o CYS-RÉGUL® Plus (11) fazendo 1 comprimido por dia durante 7 dias por mês durante alguns meses.

Para além disto, questionei se já fazia a lavagem da zona íntima com um gel de limpeza adequado à zona íntima, no sentido de perceber se podia haver aqui uma desregulação do pH a potenciar as infeções urinárias recorrentes. A senhora não utilizava nenhum produto para o efeito e portanto aconselhei que passasse a fazer a sua higiene íntima com Gyn-Phy da URIAGE® (12) 1 a 2 vezes por dia. Aconselhei ainda que fosse feita uma ingestão de água adequada, que tentasse ir à casa de banho regularmente, utilizar roupa interior de algodão, tentar urinar e limpar adequadamente o local após as relações sexuais, tudo isto como medidas preventivas.

Adverti ainda que caso com a medicação dispensada a situação não fosse resolvida, então seria necessário ir ao médico. Dado as infeções serem tão recorrentes, aconselhei ainda que fosse tida uma conversa com o seu médico no sentido de expor a situação, pois haveriam outras forma de agir profilaticamente que poderiam ser discutidas com o médico.

Referências Bibliográficas

1. Farmácia | Torres Vedras - Ortopedia [Internet]. [cited 2021 Aug 1]. Available from: <https://www.farmaciarca.pt/>
2. Quem somos: ValorMed [Internet]. [cited 2021 Aug 1]. Available from: <http://www.valormed.pt/paginas/2/quem-somos/>
3. Registo prévio dos locais de venda de medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica (MNSRM) - Infarmed - INFARMED, I.P. [Internet]. [cited 2021 Aug 1]. Available from: https://www.infarmed.pt/web/infarmed/infarmed?p_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_s_tate=maximized&p_p_mode=view&_101_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_assetEntryId=1160547&_101_type=document&inheritRedirect=false&redirect=https%3A%2F%2Fwww.i
4. Cicaplast Lábios: Lábios secos e gretados | La Roche-Posay [Internet]. [cited 2021 Aug 10]. Available from: <https://www.laroche-posay.pt/cicaplast/cicaplast-labios>
5. Nutrição e hidratação da zona íntima na menopausa | Lactacyd - Lactacyd [Internet]. [cited 2021 Aug 10]. Available from: https://www.lactacyd.pt/lactacyd/portfolio/lactacyd-pharma-hidratante/?gclid=CjwKCAjwx8iBhBwEiwA2quaq-LH-PVbrCpiN1ldpwbVfwjwIMnv8Dpy4SGnQQ15xYmS60gma59IihoCgmwQAvD_BwE&gclsrc=aw.ds
6. Systane Ultra Solução Oftalmológica Lubrificante [Internet]. [cited 2021 Aug 10]. Available from: <https://www.farmaciasportuguesas.pt/catalogo/index.php/catalog/product/view/id/455790/s/systane-ultra-gotas-oftalmologicas-lubrificantes/category/1238/>
7. Bi-Oral Suero® Frutas | Suplemento alimentar | Jaba Recordati [Internet]. [cited 2021 Aug 11]. Available from: <https://www.jaba-recordati.pt/pt/produtos-farmacuticos/suplementos-alimentares/bi-oral-suero-frutas>
8. Produtos - Atyflor® [Internet]. [cited 2021 Aug 11]. Available from: <https://www.italfarmaco.pt/produtos-obstipacao>
9. Diarreia | SNS24 [Internet]. [cited 2021 Aug 12]. Available from: <https://portal-sns24-prd.azurewebsites.net/tema/sintomas/diarreia/#sec-6>
10. CYS-RÉGUL® Flash 5D - Noreva Portugal [Internet]. [cited 2021 Aug 11]. Available from: <https://www.norevaporugal.pt/loja/nutreov/suplementos/cystiregul/cystiregul-flash-5d/>
11. CYS-RÉGUL® Plus - Noreva Portugal [Internet]. [cited 2021 Aug 11]. Available from:

<https://www.norevaportugal.pt/loja/nutreov/suplementos/cystiregul/cystiregul-plus/>

12. Refrescante de Limpeza GYN-PHY | Uriage [Internet]. [cited 2021 Aug 11]. Available from: <https://www.uriage.pt/produtos/gyn-phy-gel-refrescante-de-limpeza>

Capítulo II

Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica



Generis® Farmacêutica S.A.

Sob orientação do Dr. Mário Patrício

Abreviaturas

API - Ingrediente Ativo Farmacêutico

BPF - Boas Práticas de Fabrico

CoA - Certificado de Análise

CQ - Controlo de Qualidade

FFUC - Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

FQ - Físico-Química

FTIR - Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Pressão

IF - Indústria Farmacêutica

IV - Infravermelho

MICF - Mestrado Integrado de Ciências Farmacêuticas

MPs – Matérias-Primas

RA - Registo de Análise

SWOT - Forças (*Strengths*), Fraquezas (*Weaknesses*), Oportunidades (*Opportunities*), Ameaças (*Threats*)

I. Introdução

Há praticamente 5 anos iniciei o meu percurso na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC). Nessa altura o momento de escolha dos estágios finais parecia uma utopia. Não obstante, desde o primeiro momento em que o Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) começou a pairar nos meus pensamentos, sempre tive presente que a indústria farmacêutica era uma possibilidade forte da área pela qual queria enveredar. Escolhi o meu curso superior não com o sonho de ser farmacêutica, mas sim após a análise exaustiva de inúmeros planos de estudos; o desejo de ser farmacêutica veio depois, e veio com a vontade de conhecer todo o percurso do medicamento, pois só assim poderei ser realmente uma especialista do medicamento. Deste modo, e tendo eu como estágio obrigatório, o estágio em farmácia comunitária achei que um excelente complemento seria um estágio em Indústria Farmacêutica (IF). Dentro das opções que tinha, a que mais me atraía era o Controlo de Qualidade (CQ) devido à componente mais analítica, e à ligação mais óbvia com o conhecimento de química.

A Generis[®], sendo uma IF de renome em Portugal na área dos genéricos, foi a minha primeira opção. Surgiu então a oportunidade de fazer um estágio de 3 meses na equipa das MPs do laboratório de CQ da Generis[®], sob orientação do Dr. Mário Patrício. Nesta equipa, o trabalho consiste, de forma muito resumida, em analisar as matérias-primas (MPs) no sentido de averiguar se estas apresentam a qualidade necessária para poderem posteriormente ser libertadas e usadas na produção para a confeção dos medicamentos.

Neste relatório apresentarei sob a forma de análise SWOT os pontos fortes (*Strengths*), os pontos fracos (*Weaknesses*), as oportunidades (*Opportunities*) e ameaças (*Threats*) que vivi durante a minha passagem pela Generis.

2. A Generis[®]

A Generis SA, empresa portuguesa que nasceu em 2002, tem como lema o desenvolvimento e produção de medicamentos de elevadíssima qualidade a um preço acessível. É atualmente, e desde 2011, a empresa líder do mercado de medicamentos genéricos a nível nacional, sendo a empresa que detém o maior portfólio de genéricos do país. Atualmente, continua a trabalhar e a apostar no crescimento para que cheguem cada vez mais, e todos os dias, às farmácias e aos hospitais, genéricos e biossimilares com o selo de qualidade Generis[®] (1). Falando em números, a unidade fabril da Venda Nova, que se encontra em

funcionamento desde 2006, apresenta uma capacidade de produção de 1,2 mil milhões de unidades ao ano (2).

De notar que em 2017 a Generis® foi adquirida pelo grupo Aurobindo, uma empresa de topo a nível mundial no que concerne à produção de Ingrediente Ativo Farmacêutico (APIs) (3).

3. Análise SWOT

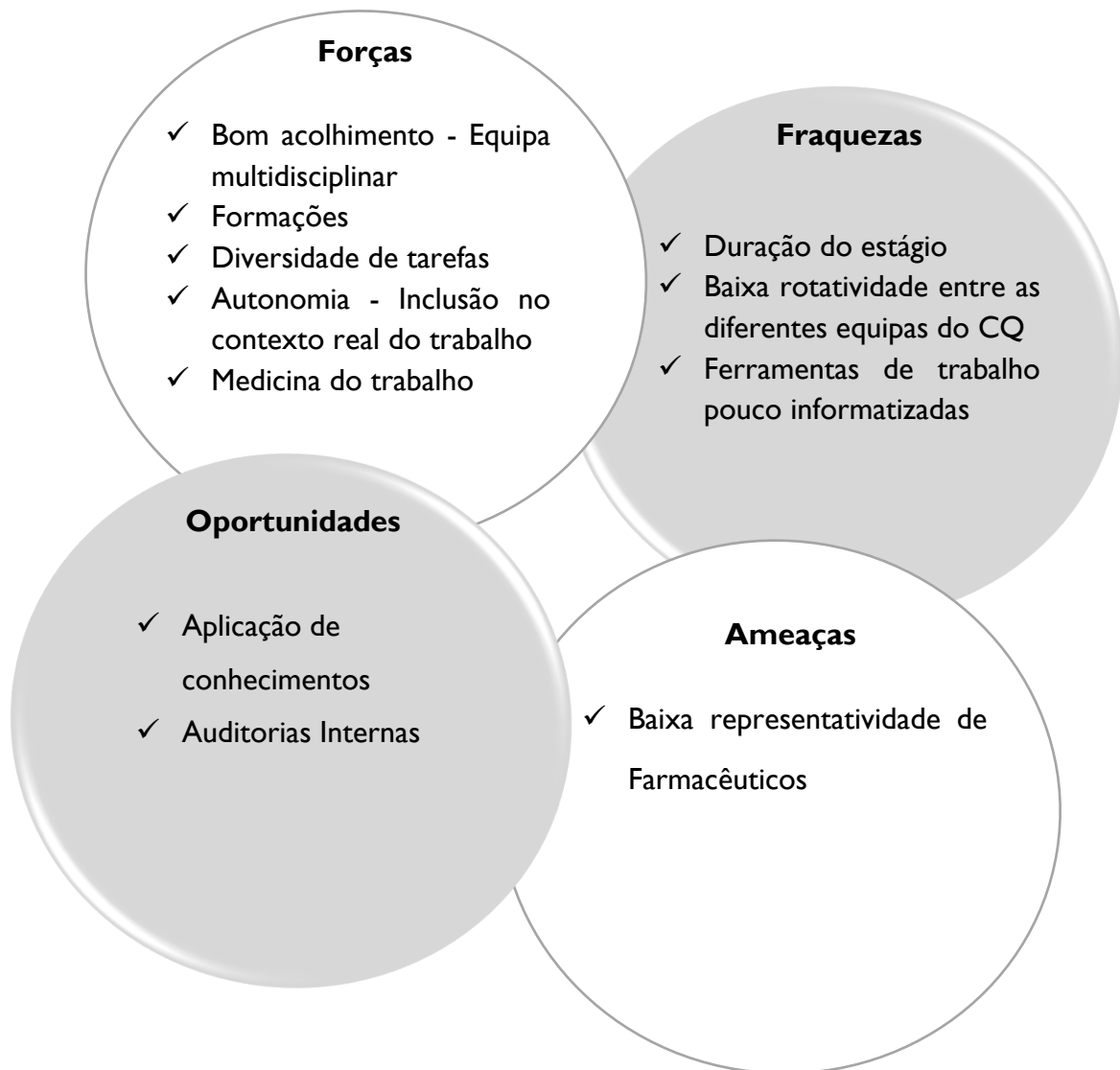


Figura 1 Esquema da Análise SWOT relativa ao estágio curricular realizado em Indústria Farmacêutica.

3.1 Forças

a) Bom acolhimento - Equipa multidisciplinar

O dia 3 de maio de 2021 marcou o início do meu estágio na Generis[®]. Desde o primeiro momento fui extremamente bem recebida por todos os colaboradores da empresa com quem contactei. O ambiente que se vive no laboratório CQ é muitíssimo bom.

Apesar do ritmo que se vive numa IF ser alucinante, pude experienciar um sentido de entreatajuda enorme, onde a partilha de conhecimento e a consequente evolução de cada um era, de dia para dia, notória. Esta entreatajuda constante entre os elementos da equipa pode ter que ver com a multidisciplinariedade da mesma. Os backgrounds académicos são muitos amplos, indo desde químicos, bioquímicos, engenheiros químicos, analistas químicos e também farmacêuticos, pelo que, os pontos fortes e a melhorar dentro dos vários analistas acabavam por se complementar, o que ia permitindo que todos fossem evoluindo a partir da interação com os colegas.

b) Formações

Na minha passagem pela Generis[®] tive a oportunidade de fazer várias formações.

No primeiro dia comecei logo com uma formação ministrada pela equipa da Segurança relativa ao tema “Segurança, Higiene e Ambiente no trabalho”. Considero que esta formação foi extremamente relevante para que ao iniciar o trabalho no laboratório tivesse a melhor formação possível acerca dos cuidados de segurança que devem ser tidos de forma a evitar acidentes. Ainda nessa mesma formação aprendi a fazer a separação dos diversos materiais de acordo com o código de cores da Generis[®], que podemos ver na Figura 2, para que nada falhe na proteção do meio ambiente, tema sobre o qual a Generis[®] demonstra ser muito responsável. Para além disso, realizei mais duas formações logo no arranque do estágio, relativamente à Farmacovigilância, e Boas Práticas de Fabrico.



Figura 2 - Regras de separação do lixo na empresa Generis inseridas na sua política de proteção do meio ambiente. As diferentes cores correspondem aos diferentes tipos de resíduos cujo destino final será diferente.

Fiz também uma série de formações relativas tanto a determinados procedimentos do laboratório, como aos equipamentos propriamente ditos. Em complemento às mesmas, sempre que algum equipamento ou técnica nova me eram introduzidos, algum elemento da equipa acabava sempre por introduzir o trabalho e dar-me algumas bases sobre o equipamento, se fosse caso disso.

c) Diversidade de tarefas

Durante a minha passagem pela equipa das MPs do laboratório de CQ da Generis® tive a oportunidade de realizar muitos ensaios de físico-química (FQ) que me trouxeram, indubitavelmente, uma maior destreza ao nível das técnicas de laboratório.

Na sala das MPs tínhamos a nossa primeira ferramenta de trabalho - o quadro de apoio das MPs. Este quadro todos os dias era atualizado pela supervisão, e dividia as MPs em vários estados de acordo com a urgência e fase em que estava a análise da amostra. Após verificarmos de acordo com o quadro e/ou indicações da supervisão qual a amostra que iríamos analisar, seguia-se a fase de reunir a amostra com a sua documentação e respetivo caderno de laboratório. Desta feita, iniciava-se a análise. Tive oportunidade de fazer diversos ensaios, quer em APIS, quer em excipientes, tais como, espectroscopia de IV - Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), tanto em módulo ATR, como KBr, e espectroscopia RAMAN. Também, métodos de determinação do teor em água da amostra, como Karl Fisher e perda por secagem. Para além destes, tive ainda a oportunidade de realizar doseamentos, ensaios de cinzas sulfúricas, determinações de valor de pH, viscosidade, ponto de fusão, pesquisa de sódio, sulfatos e cloretos, desagregação, dimensões e massas médias de cápsulas, entre outros.

Após a análise da amostra era necessário preencher o Registo de Análise (RA), e colocar os resultados em SCARAB, e o caderno era então corrigido pela revisão para que houvesse emissão do Certificado de Análise (CoA), e a amostra fosse libertada.

d) Autonomia - Inclusão no contexto real do trabalho

Um ponto que merece destaque dentro daqueles que considero como positivos relativamente ao meu estágio curricular em IF, é, sem dúvida, a grande autonomia que senti. Desde muito cedo a equipa foi-me designando tarefas, e sempre soube gerir de forma magnífica aquilo que eram as bases que me dava antes de iniciar uma tarefa nova da margem de manobra que me deviam dar para eu tentar fazer as tarefas por mim própria e ir à descoberta dos conceitos que tinha já menos presentes.

Com o passar do tempo fui eu própria adquirindo a capacidade de ir organizando o meu dia de trabalho, obviamente sempre tendo por base a orientação da supervisão e do quadro de apoio das MPs.

O facto de a equipa me ter integrado tão bem e me ter permitido ganhar ferramentas no sentido de conseguir começar a trabalhar de forma autónoma, dentro das limitações da pouca experiência que tinha, permitiu-me ter uma noção o mais realista possível daquilo que é o trabalho num laboratório de CQ numa IF.

Dada a curta duração do meu estágio, o meu objetivo, para além de adquirir o máximo conhecimento que me fosse possível, era conhecer melhor a realidade da IF, que acaba por não nos ser tão falada na faculdade, e sem dúvida que esse objetivo foi alcançado.

e) Medicina do trabalho

Uma semana antes de começar o meu estágio comecei a ser contactada pela equipa de recursos humanos da Generis® no sentido de fazer um *check-up* médico antes de iniciar o meu estágio curricular. Esta realidade, principalmente quando comparada com a realidade de outras colegas que faziam estágios noutras IF, fez-me, desde logo, sentir como parte integrante da empresa, ainda antes de conhecer a equipa na qual me ia integrar. O cuidado que a empresa tem com cada um dos seus colaboradores deve ser aplaudido, porque infelizmente isso ainda não acontece em todas as empresas.

Considero que todo o cuidado e respeito que a Generis® teve comigo deve ser, e será sempre elegido por mim, como um aspeto positivo. Este é só um dos exemplos do bom tratamento de que fui alvo na minha incapacidade de enumerar todos.

3.2 Fraquezas

a) Duração do estágio

Desde o momento na minha formação académica em que decidi que o caminho que ia escolher era o MICF, a FFUC sempre esteve no meu horizonte como a faculdade na qual me queria formar. Nunca me senti desapontada pela faculdade que escolhi, e um dos motivos que me faz ter a certeza de ter feito a escolha certa é a FFUC permitir aos seus alunos fazer um estágio em IF inserido no estágio curricular, o que não acontece em todas as faculdades de farmácia. Não obstante, um dos aspetos menos bons do meu estágio, que aqui aponto como uma fraqueza, foi indubitavelmente a curta duração do mesmo. O facto do estágio em IF ter uma duração de apenas 3 meses faz com que determinadas técnicas, como seja a Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC), entre outras, não nos sejam introduzidas dado não haver tempo suficiente para adquirirmos as competências necessárias a todas as técnicas, principalmente às mais desafiantes.

b) Baixa rotatividade entre as diferentes equipas do CQ

A segunda fraqueza que tenho a apontar, vem ainda no seguimento, ou como consequência, do estágio em IF ter, na minha opinião, um período de tempo demasiado curto. A verdade é que, num estágio curricular, e numa fase em que estou ainda a finalizar a formação académica, aquilo que procuro é absorver o máximo de conhecimento possível, adquirir alguma experiência, e conhecer tantas realidades quanto possível. Nesse sentido, acho que teria sido muito proveitoso ter conhecido um pouco mais da realidade das outras equipas dentro do laboratório de CQ - análise de estabilidade, novos produtos e produto a granel (*bulk*) - tendo apenas trabalhado na equipa das MPs.

c) Ferramentas de trabalho pouco informatizadas

No laboratório de CQ da Generis®, mais concretamente na equipa das MPs, quando iniciávamos a análise de uma amostra, quer fosse excipiente ou API, o primeiro passo era reunir a documentação e o caderno de laboratório do API/excipiente em análise.

No laboratório regemo-nos pela máxima de que o registo da análise deve ser feito o mais em simultâneo possível com a execução da análise, por ordem cronológica.

Um ponto menos positivo, e que considero que em muito dificulta o trabalho dos analistas é o facto deste registo nos cadernos de laboratórios ser um registo manual que é muito moroso, e inclusive potencia, por vezes, erros. Nesse sentido, têm vindo a ser criados formulários que têm como objetivo facilitar este processo de registo, o que, na minha opinião, é uma excelente iniciativa.

3.3 Oportunidades

a) Aplicação de conhecimentos

Durante 9 semestres do MICF tive diversas unidades curriculares, e muitas delas, como Química Analítica, Química Orgânica, Química Farmacêutica, Métodos instrumentais de Análise, Toxicologia, Tecnologia Farmacêutica, entre outras; foram ao longo da minha formação dando-me as bases de química, do medicamento, e de técnicas de laboratório necessárias para ter a capacidade de ter abraçado um estágio num laboratório de CQ sem me sentir melindrada. Senti inúmeras vezes, ao longo do estágio curricular, que tive a oportunidade de consolidar inúmeros conhecimentos que me foram transmitidos durante o MICF de uma forma mais teórica. Considero desta forma, que o estágio em IF veio complementar e consolidar a minha formação de base.

b) Auditorias Internas

As auditorias internas, que consistem em fiscalizações levadas a cabo pela própria empresa, têm como objetivo potenciar a melhoria contínua da empresa.

As auditorias internas que presenciei várias vezes no laboratório de CQ da Generis® tinham por objetivo confirmar se todo o funcionamento do laboratório corria como o previsto, e se todas as condições estavam de acordo com o suposto, isto é, verificar se tudo estava conforme, ou detetar todas as não conformidades, caso as houvesse, para as poder eliminar.

Considero que foi uma oportunidade presenciar as auditorias no sentido de adquirir uma melhor noção de como funcionam, pois foi algo muito falado na unidade curricular de Garantia de Qualidade, e de perceber de que forma é que após as auditorias podiam ser implementados melhorias.

3.4 Ameaças

a) Baixa representatividade de farmacêuticos

Como finalista de MICF confesso que tinha uma ideia utópica de que durante o meu estágio em IF iria encontrar mais farmacêuticos. No entanto, a realidade do que encontrei no laboratório de CQ não correspondeu a tal, sendo que apenas havia uma mestre em Ciências Farmacêuticas na minha família, na equipa dos novos produtos.

Percebi rapidamente que os profissionais do laboratório, quer fossem químicos, bioquímicos, engenheiros químicos, ou analistas, apesar de não terem uma formação de base focada no medicamento, conseguiam claramente corresponder às exigências através da bagagem de química que era comum a todos os elementos da equipa. Não obstante, considero que há espaço para os farmacêuticos na IF, e mais propriamente, neste caso, no CQ. É indiscutível que os farmacêuticos olham para os medicamentos de uma forma ímpar e diferenciada da dos restantes profissionais. A formação de base que apresentamos permite-nos trabalhar em qualquer segmento do ciclo de vida do medicamento, inclusive no CQ. E em todo e qualquer segmento do ciclo de vida do medicamento deve haver um especialista do medicamento, um farmacêutico.

4. Notas Finais

Findado o meu estágio, e chegado o momento de fazer o grande balanço, não posso começar sem agradecer a toda a equipa das MPs na pessoa do Dr. Mário Patrício. Toda a simpatia, disponibilidade, paciência, todo o conhecimento partilhado e a forma como desde o primeiro momento me fizeram sentir como parte da equipa. Este foi o desafio certo para terminar estes meses de estágio.

O meu estágio em IF foi uma nova experiência imensamente desafiante e enriquecedora. Permitiu-me não só adquirir e sedimentar conhecimento e competências, como, não menos importante, conhecer melhor um dos possíveis papéis do farmacêutico na IF. Por vezes não é fácil sair da nossa zona de conforto, e poderia ter sido mais cómodo fazer apenas o estágio obrigatório. No entanto, para mim faz sempre sentido arriscar, pois foi, e é sempre, uma oportunidade única de aprendizagem, desenvolvimento profissional, e até pessoal. Espero ter, na medida das minhas limitações de alguém que ainda só está a começar, retribuído à Generis® o carinho com o qual fui sempre tratada.

Em suma, posso afirmar com certeza que este estágio me permitiu desenvolver competências que me vão ajudar muito na minha vida profissional. O balanço dificilmente poderia ser mais positivo.

Referências Bibliográficas

1. Sobre Nós | Generis Farmacêutica [Internet]. [cited 2021 Jul 15]. Available from: <https://www.generis.pt/sobre-nos/>
2. Grupo Aurobindo | Generis Farmacêutica [Internet]. [cited 2021 Jul 15]. Available from: <https://www.generis.pt/sobre-nos/grupo-aurobindo/>
3. Atividade Industrial | Generis Farmacêutica [Internet]. [cited 2021 Jul 15]. Available from: <https://www.generis.pt/sobre-nos/atividade-industrial/>

Capítulo III

Monografía

**“Virus-like particles based vaccines and their role
in the COVID-19 pandemic”**

Abstract

In late 2019, in China, a new coronavirus was identified with the emergence of an atypical pneumonia. The world quickly became in alert due to the high speed with which this virus was being transmitted throughout the world. This new outbreak was quickly declared as a pandemic.

From the outset the need arose to create a vaccine capable of putting an end to the pandemic nightmare.

Several platforms were tested for the development of vaccines against the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-COV-2), among which virus like particle (VLP) based vaccines. VLPs, with some examples already on the market such as the vaccines for the hepatitis B and for human papilloma virus, are protein-based nanoparticles that mimic the conformation of the virus, presenting epitopes on their surface. VLP based vaccines have already been shown to have numerous advantages, including the fact that they are safe, do not contain virus genetic material, and very efficient in terms of activating immune system. Despite that, in the formulation of these vaccines they often appear associated with adjuvants.

The knowledge of the structure of the SARS-COV-2 has made it possible for the development of particles that mimic these coronavirus.

At least, five SARS-COV-2 VLP vaccines are already in clinical trials, and show potential to be successful.

In this review text we will recognize the potential of these particles that mimic viruses, and how they activate our immune system, and unravel the advances that VLP based vaccines are having in this fight that the world is facing with the COVID-19. Naturally, for that we have to find out how this deadly virus works.

Keywords: Virus Like Particles; VLP Vaccine; SARS-COV-2; COVID-19;

Resumo

No final de 2019, na China, um novo coronavírus foi identificado com o surgimento de uma pneumonia atípica. O mundo rapidamente ficou em alerta devido à alta velocidade com que este vírus se transmitia em todo o mundo. Este novo surto foi rapidamente declarado como uma pandemia.

Desde o início surgiu a necessidade de criar uma vacina capaz de acabar com o pesadelo da pandemia.

Diversas plataformas foram testadas para o desenvolvimento de vacinas contra a Síndrome Respiratória Aguda Grave Coronavirus 2 (SARS-COV-2), entre as quais vacinas que se baseiam em partículas semelhantes a vírus (VLP). As VLPs, que contam com alguns exemplos já existentes no mercado, como as vacinas para hepatite B e para o vírus do papiloma humano, são nanopartículas com base em proteínas que mimetizam a conformação do vírus, apresentando epítomos à superfície. As vacinas baseadas em VLPs já demonstraram ter inúmeras vantagens, incluindo o fato de serem seguras, não conterem o material genético do vírus e serem muito eficientes em termos de ativação do sistema imunológico. Apesar disso, na formulação destas vacinas muitas vezes aparecem associados adjuvantes.

O conhecimento da estrutura do vírus SARS-COV-2 possibilitou o desenvolvimento de partículas que mimetizam este coronavírus.

Pelo menos cinco vacinas de VLPs contra o SARS-COV-2 já estão em ensaios clínicos e apresentam potencial para serem bem-sucedidas.

Neste texto de revisão, iremos reconhecer o potencial destas partículas que mimetizam os vírus, como elas ativam o nosso sistema imunológico, e desvendar os avanços que as vacinas baseadas em VLPs estão a ter nesta luta que o mundo está a enfrentar contra o COVID-19. Naturalmente, para isso temos que descobrir como funciona este vírus mortal.

Palavras-chave: Partículas Semelhantes a Vírus; Vacina VLP; SARS-COV-2; COVID-19.

Index

Abbreviations	37
1 Introduction	39
2 The virus and its structure	41
3 VLPs Production methods - Expression system	47
3.1. Bacteria - A research opportunity	48
3.2. Yeast - The most proven expression system.....	50
3.3 Baculovirus/Insect Cells - One of the most commonly used	51
3.4 Plants - Are edible vaccines the goal?	52
3.5 Mammalian Cells - The production of the most complex VLPs.....	53
4 SARS-COV-2 VLP Candidate vaccines	55
4.1 Plants as a production system and the Proficia® technology.....	55
4.2 Mammalian cells based vaccine.....	56
4.3 SpyTag/SpyCatcher technology.....	57
4.4 Others	59
5 Conclusion and Future Perspectives	60
6 References	62

Abbreviations

ACE-2 - Angiotensin Converting Enzyme 2

AcMNPV - Autographa californica Multiple Nucleopolyhedrovirus

APCs - Antigen-Presenting Cells

ARDS - Acute Respiratory Distress Syndrome

CHO - Chinese Hamster Ovary

COVID-19 - Coronavirus disease 19

DCs - Dendritic Cells

DNA - Deoxyribonucleic Acid

E.coli - *Escherichia coli*

E Protein - *Envelope Protein*

ER - Endoplasmic Reticulum

ERAP - Endoplasmic reticulum aminopeptidase

eVLP - Enveloped VLP

GSK - GlaxoSmithKline

H. polymorpha - *Hansenula polymorpha*

HBsAg - Hepatitis B Surface Antigen

HPV - Human Papillomavirus

ICTV - International Committee on Taxonomy of Viruses

IRAP - Insulin-Regulated Aminopeptidase

LPS - Lipopolysaccharide

MERS-COV - Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus

MHC I - Major Histocompatibility Complex I

MHC II - Major Histocompatibility Complex II

N. benthamiana - *Nicotiana benthamiana*

P. pastoris - *Pichia pastoris*

PCR - Polymerase Chain Reaction

PLC - Peptide-Loading Complex

M Protein - Membrane Protein

N Protein - Nucleocapsid Protein

RNA - Ribonucleic Acid

S protein - Spike protein

S. cerevisiae - *Saccharomyces cerevisiae*

SARS-COV - Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus

SARS-COV-2 - Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2

TAP - Transporter Associated with Antigen processing

TMPRSS2 - Transmembrane Protease Serine 2

VLPs - Virus-Like Particles

VSV - Vesicular Stomatitis Virus

WHO - World Health Organization

+ssRNA - Single Stranded Positive-sense RNA

I. Introduction

In late 2019, in Wuhan, China, several cases of an atypical viral pneumonia disease were identified. It was noted that the responsible etiologic agent is a virus who belongs to the *Coronaviridae* family, *Coronavirinae* sub-family and *Betacoronavirus* genera. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) named the virus as SARS-COV-2, and the disease caused by the virus as COVID-19 (1).

Globally, as of June 21st 2021, there have been 46 840 783 confirmed cases of COVID-19, including 3 865 738 deaths (2).

It was not the first time that this *Coronaviridae* family was alarming the scientific community and all the world. Before, Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-COV) (2002) and Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-COV) (2012) has infected thousands of people, causing pneumonia symptoms, Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS), sometimes renal failure, and unfortunately, lots of deaths. However, nothing compared with the damage that the new *betacoronaviruses* is causing worldwide (3).

The first cases of SARS-COV-2 all have some connection to the seafood market in Wuhan, which was in line with the theory that the new virus came from a zoonotic source. Due to the similarity between SARS-COV-2 and SARS-COV, it was established that the most likely would have been that the cross-species occurred from a bat. However, it is thought that there must have been an intermediary between bats and humans, since the receptor binding domain is significantly different between these two species, however it is not known which specie was the intermediate (4).

The virus is highly infectious, and animal-to-human transmission was the cause of the outbreak.

SARS-COV-2 has spread quickly throughout the world, so COVID-19 was characterized as a pandemic, in March of 2020, by the World Health Organization (WHO) (5).

Respiratory transmission is the main route of transmission and it can happen in two ways a) contact with virions suspended on droplets, or b) contact with aerosols of an infected person (6,7).

It is important to consider that the environmental conditions are extremely relevant, since closed spaces or open spaces will have higher or lower transmission rates, respectively. In addition, the distance to the infected person also has influence, so, shorter the distance greater the probability of transmission of the virus; this is due to the aerosols and drops mostly spreading over a short distance (8,9).

Another mode of transmission studied was the transmission through fomites. Although, this transmission method does not gather much agreement in the literature. There are authors who argue that infected fomites are relevant in mitigating the disease, as they argue that viruses can remain viable for days on surfaces thanks to SARS-COV-2 environmental resistance, considering, however, that the time in which it maintains viability will be different from surface to surface. (10,11) In contrast, there are also authors who do not consider the transmission of SARS-COV-2 via fomites to be especially relevant, for the reason that they argue that the levels of viral RNA found on surfaces are unlikely enough to cause an infection (9).

Vertical transmission is another possibility. The truth is that there is a lack of evidence to support the mother to fetus transmission. However, there have been reported cases of babies born to mothers with COVID-19 with a positive polymerase chain reaction (PCR) test after birth (12). But there are also reported a lot of cases of infected mothers giving birth babies who do not have the disease, which make us to believe that this kind of transmission is improbable (13). Besides, it should be considered that even if there is no horizontal transmission, a SARS-COV-2 parental infection can have harmful effects on the fetus, such as, for example, an increased risk of premature birth, fetal stress, thrombocytopenia, abnormal liver function, and in the worst scenario, even death (14).

The receptor through which SARS-COV-2 enters the cells is expressed in abundance in the gastrointestinal tract, and therefore the hypothesis that fecal-oral transmission route could have a significant impact on the spread of the virus, was naturally placed on the table. The truth is that the genetic material of SARS-COV-2 was found in stool and colonic biopsy samples (15). In fact, there are reports of patients with COVID-19 in which nasopharyngeal samples are negative earlier than in rectal ones (16,17). Although, there is still much controversy about this route of transmission. There are already literature that show that in addition to ribonucleic acid (RNA) there is the release of live viruses through the feces of infected patients, which implies that SARS-COV-2 could potentially be transmitted via this route (18). With regard sexual transmission and bloodborne transmission, so far the data is that there are no transmission through these methods (9).

There are a lot of measures that we should use to decrease the likelihood of being infected, or to infect others, among which, wear a mask and change it when is needed, disinfect surfaces, respect distances, isolate as soon as we have any symptoms, among others.

After the first contact with the virus, the incubation period is 3-6 days usually, but can reach 14 days. The most common symptoms of COVID-19 are fever, non-productive cough, myalgia, dyspnea, and fatigue, but is also possible that gastrointestinal disorders arise. In more

complicated clinical situations, patients end up developing pneumonia, kidney failure, and even death (19).

In a pandemic situation the best option is vaccination. The need to quickly create a vaccine arose shortly after this virus began to show itself. Right from the start, the entire scientific community began the study of the structure of SARS-COV-2, because only then would be possible to reach the vaccination goal.

2. The virus and its structure

The structural similarities between SARS-COV-2 and the other coronaviruses, especially SARS-COV, are huge, but there are some peculiarities between them.

SARS-COV-2, like the other coronaviruses, is an enveloped virus, is a single stranded positive-sense RNA (+ssRNA) and it has a genome between 26-32 kilobases, which is considered a very large size for the genome of a virus (20). SARS-COV-2 virus presents in its structure four structural proteins: membrane protein (M protein), spike protein (S protein), envelope protein (E protein) and nucleocapsid protein (N protein), as we can see in the Figure 1. It also has 16 non-structural ones which are associated with the replication machinery, and still almost a dozen accessory proteins.

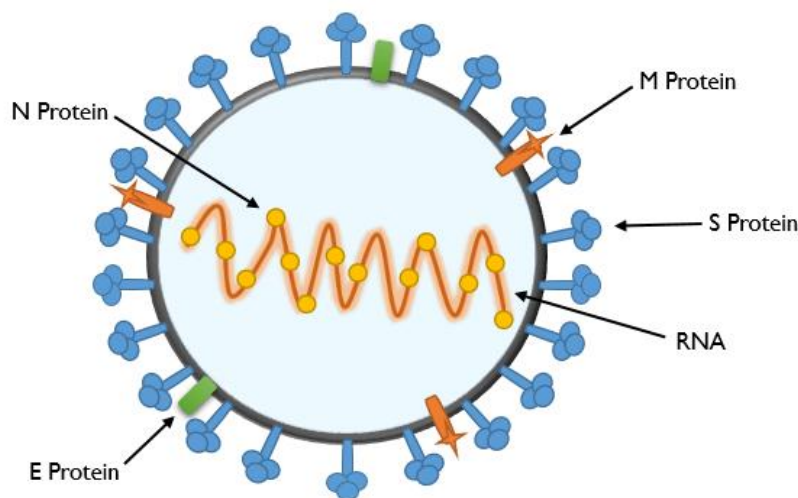


Figure 1. SARS-COV-2 structure. SARS-COV-2 is an enveloped virus and its viral structure is formed by four structural proteins: S, M, E and N protein. N Protein interacts with viral +ssRNA to form the nucleocapsid (Own image).

The virus has to enter into the cells in order to reproduce and cause disease. S protein have the receptor-binding domain that mediates the binding to the host cell (21). Since the open state of the S protein is involved in binding, fusion and, consequently, entry of the virus

into the host cell, it has been, and still is, subject of a lot of research. Due to it, it is the most obvious therapeutic target.

S Protein is composed of two distinct domains with different functions, as we can see in Figure 2. Subunit S1 comprises the receptor-binding domain, that is, it is the portion that will be responsible for the binding to the host cell's receptor, which in the case of SARS-COV-2 is the angiotensin converting enzyme 2 (ACE-2) receptor, similarly to what happens with the SARS-COV. Then, the S2 subunit with the fusion peptides - HR1 and HR2 - mediates the fusion of the coronavirus with the host cell. However, it is necessary that a proteolytic cleavage occurs between S1/S2 site, and in S2 subunit, who suffer a conformational change, so that the fusion of the membranes could happens (22,23).

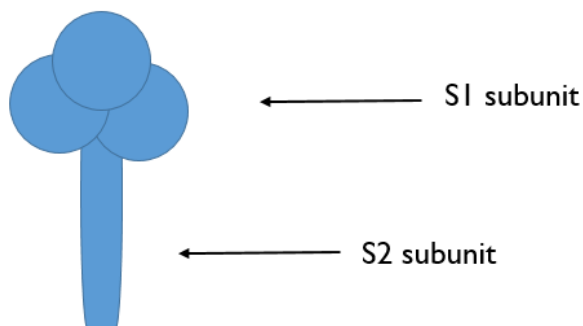


Figure 2. S protein Structure. SARS-COV-2 enters the cell through the S protein on the surface of the virus through the binding with ACE-2 receptor. S protein is composed of two subunits, S1 (which contains the receptor binding domain) and S2, which actively participate, in the binding and fusion, respectively, of the virus to the cell (Own image).

Various mechanisms are described in the literature by which mechanism the proteolytic cleavage of the S protein occurs. The main mechanisms by which cell entry occurs are shown in Figure 3.

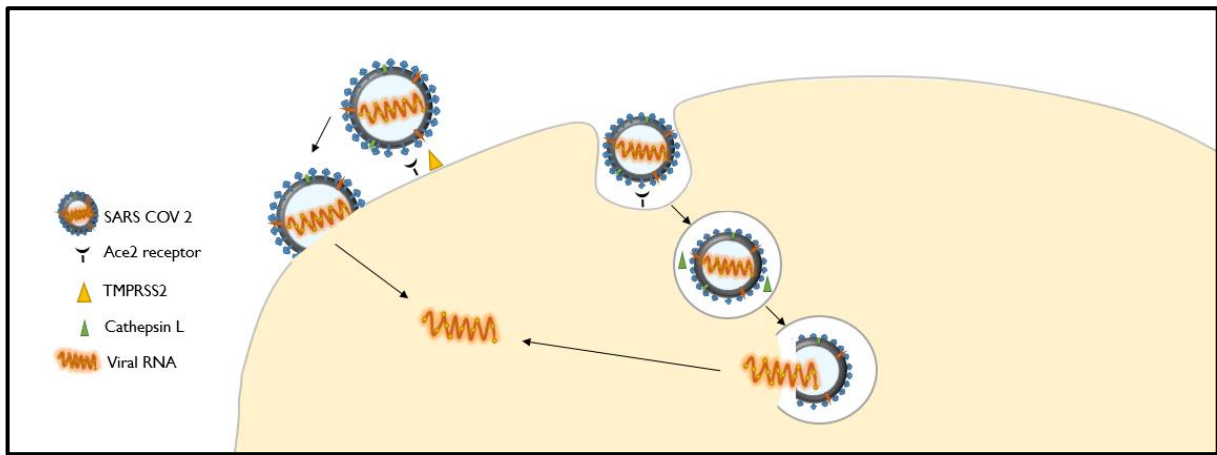


Figure 3 The cell entry mechanism There are more than one mechanism by which the SARS-COV-2 virus is able to enter into the cells and cause infection. The most described, refers to cleavage done by transmembrane protease serine 2 (TMPRSS2), which is being responsible for the conformational change in S protein necessary for entry into the cell to occur (24,25). Another possible way for the virus to enter in the cell is after the binding to the ACE-2 receptor, the virus enters the cell through the endocytosis. In this case, the release of RNA into the cytoplasm occurs after the fusion, where the proteolytic cleavage between the S1/S2 subunits is mediated by the binding who is mediated by the cathepsin L, which is a lysosomal protease (26) **(Own image)**.

In addition to these mechanisms which had also been studied for SARS-COV, a new mechanism was considered for the SARS-COV-2, a unique furin cleavage site in S1/S2. The cleavage is done by the host furin-like enzymes. There are already data to suggest that in the absence of this site, the replicative capacity of the virus is reduced (27). Furin cleavage site has the ability to increase the affinity of S protein for the receptor, and consequently enhance the entry of the virus into the cell (28).

Furin levels are higher in diabetics, obese people, older people, and also are higher in men than in women. This may be an explanation for the increased manifestations of the disease in these populations (29).

Mass immunization, through vaccination, is one of the most important interventions in the health field, while it protects the population from multiple diseases, and has even allowed the eradication of diseases, that is what the world needs in the middle of a pandemic.

Vaccines can be classified according to their composition, in particular depending on the origin or structure of the antigen, often called platforms: Among them, live attenuated virus, inactivated virus, Ribonucleic Acid (RNA), Deoxyribonucleic Acid (DNA), replicating viral vector, non-replicating viral vector, protein subunit, and VLPs are platforms chosen to develop COVID-19 vaccines. The latest generation is no longer antigens isolated directly from pathogens, but rather come from genetic recombination, within these, we will address here the topic of vaccines based on VLPs.

VLP vaccines have long been under the scrutiny of the scientific community. VLPs are a protein based nanostructure able to penetrate inside the cells that contains the antigen, or

antigens, of the viral capsid with a defined arrangement with high density of B and T lymphocyte epitopes. VLPs does not contain genetic material, which makes them non-infectious and unable to replicate; thus VLPs are harmless than others types of candidate vaccines (30–32). Furthermore, VLPs shown to be highly immunogenic, and so they can stimulate innate, humoral, and cellular immune responses (33,34).

VLPs have been extensively studied by the scientific community, since they have attracted a lot of attention due not only to their safety advantages, as also due to their ability to achieve a good immunogenicity from a not very large amount of antigen, which can be especially interesting in certain contexts, such as a pandemic context. The VLP vaccines have some negative points, as the fact that these vaccines are often no single administration and have high costs considering the yield during the production. In order to increase the effectiveness of the vaccine, there is commonly need to add adjuvants to the vaccine formulation, as we will discuss later. However, this need to add adjuvants can also be seen as an extra disadvantage in the production of VLP vaccines, because it complicates the vaccine formulation (35). Moreover, it is necessary to take in consideration that antigen conformational changes and/or particle aggregation can negatively impact on the safety and efficacy of the vaccine (36). VLPs are, by themselves, more immunogenic than isolated proteins and even protein aggregates because their structure presents a repetitive epitope arrangement.

The principle of VLPs is to mimic the structure of the virus, and therefore its structure depends of the virus that causes the disease, either in terms of morphology, biochemical composition and size. Furthermore, according to the virus be enveloped or non-enveloped, the VLP could may or may not be enveloped (37). Normally, the enveloped VLP (eVLP) get the lipid membrane from the host cells through budding and so their composition is more complex and their regulatory approval more difficult due to the uncertainty of host cell components.

The VLPs are normally very immunogenic inducing a good humoral and cellular immune response. We could managed to increase the activity of the particles controlling the VLPs arrangement and avoiding the inclusion of the virus components who are able to inhibit the immune system (37).

Moreover, there are two essential characteristics of VLPs that are crucial for them to be able to interact with the cells of the immune system. These characteristics are the fact that their structure presents a highly repetitive epitope surface, and its size.

Size is important because it facilitates the drainage of VLPs to the lymphoid organs via lymphatic system, since VLPs have the ability to be captured, processed and transported by cells of the immune system, such as, for example, dendritic cells (DCs). In addition, they have

a size similar to virus size indicated for the interaction with the antigen-presenting cells (APCs) (38,39). This capacity for traffic to the secondary lymphoid organs, like the lymphatic nodules, the place where APC's present the antigen to mature CD4+T lymphocytes, via major histocompatibility complex II (MHC II), explains their great capacity to induce the immune responses.

In addition, the activation of CD4+ lymphocytes will also enable the second phase of B lymphocyte activation to take place. Although B lymphocytes are able to recognize the antigen / VLP, they need the interaction with a CD4+ lymphocyte in order to be completely activated and start proliferation. Some of these activated B lymphocytes will differentiate into plasma cells and produce the antibodies (humoral immune response) (40).

The VLPs have already been shown to be able to generate immune responses mediated by CD8+ lymphocytes (41). CD8+ lymphocytes are normally activated via MHC I. It is the endogenous antigens that normally lead to the activation of MHC I, the most common is that misfolds proteins are responsible for this activation (38,42). However, through cross-presentation it is possible for exogenous antigens to activate MHC I, and consequently an immune response mediated by CD8+ lymphocytes can be achieved under these conditions (40).

There are a number of possible mechanisms by which cross-presentation could occur, however, there are two main pathways by which MHC I activation by exogenous antigens occurs: vacuolar pathway and endosome-to-cytosol pathway (43,44). The Figure 4 is a representation of these input mechanisms for the SARS-COV-2 virus.

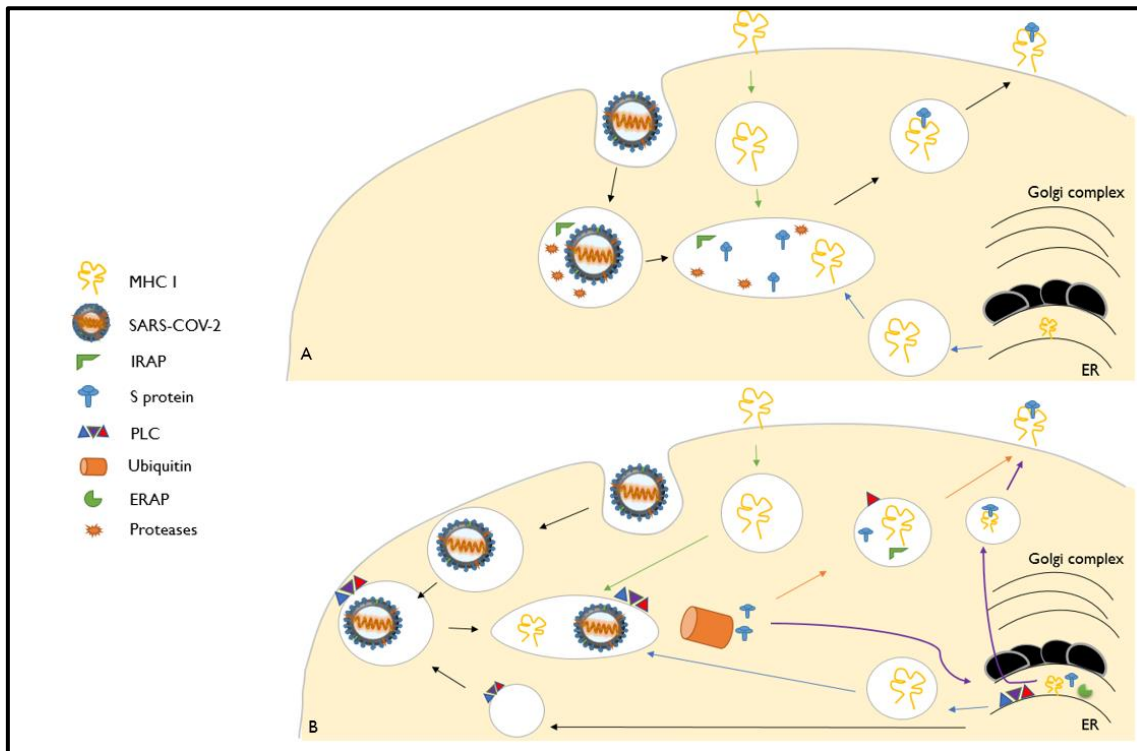


Figure 4 SARS-COV-2 internalization into APC's and cross-presentation mechanisms **A:** Vacuolar pathway According to the vacuolar pathway, the exogenous antigen after being internalized is degraded in the lysosome by proteases, and then the peptides resulting from the cleavages are loaded into MHC I molecules, which will then be presented on the plasma membrane (43,44). *Green arrows/blue arrows are alternative paths to each other.* **B:** Endosome-to-cytoplasm pathway. The antigens after internalization escapes from the endocytic compartment, where the components of the peptide-loading complex (PLC) had already been established, for the cytoplasm. In the cytoplasm, the antigens end up binding to ubiquitin and being degraded. The peptides from this degradation will be transported by Transporter Associated with Antigen processing (TAP) to the endoplasmic reticulum (ER), or back to the endosome, where they will be trimmed by endoplasmic reticulum aminopeptidase (ERAP) or insulin-regulated aminopeptidase (IRAP), respectively. Finally, the peptides will be linked to MHC I and will proceed to the plasma membrane, so that they can then be presented to Tc lymphocytes (43,44). *Green arrows/blue arrows are alternative paths to each other. Orange arrows/Purple arrows are alternative paths to each other (Own image).*

As we can see, APCs, and in particular DCs, plays an important role in generating these immune responses.

The activation of B and T lymphocytes, and then the formation of immunological memory are the main objective of vaccination, and VLPs have shown many times to be able to induce it (45,46).

In order to enhance these immune system responses, VLP vaccines often contain adjuvants in their composition. Adjuvants can be considered a class of immunomodulatory compounds that are capable of enhancing the activity of the immune system by a variety of mechanisms; it could be very useful in children and people over 65 years old, immunocompromised, or people with other comorbidities, who are less responsive to the vaccine due to having a more fragile and/or immature immune system (47).

In addition to boosting immune responses, adjuvants can also have other clinical uses; by improving better responses of the immune system, are able to, in many cases, allow to use smaller doses of antigen per vaccine to obtain a successful immunization, thus, it allows to reduce the costs of the vaccines, and also the number of doses needed to take. Additionally, immunomodulation allows to increase the speed with which the initial response is generated.

When we are producing a vaccine, our objective is for it to provide a long-term protection, and adjuvants are also advantageous in this respect since they have the ability to stimulate immunological memory (37).

It is important to bear in mind that the results obtained with a mixture of an antigen and an adjuvant can not be extrapolated directly to another antigen. Adjuvants should be chosen based on the specific antigen and the type of immune system response required; moreover, several adjuvants may be present in a vaccine (48). Nowadays, the evolution is great and many adjuvants are being studied. Even combinations of adjuvants are under development (49). However, the exact mechanism of action by which each of them works is not always fully understood.

3. VLPs Production methods - Expression system

After knowing the virus properly, there is still a lot of research to be done. To produce VLPs, it is first necessary to define which production system, within the various possibilities, will be the most suitable.

The production methods of VLPs can be quite complex, and a number of expression systems are available. Therefore it is important to take into consideration several factors when choosing the production method that we are going to use to VLPs production. In first place, in order to be able to choose correctly which expression system we are going to use, and because the expression system determine some of their properties, it is essential to consider the particularities of the particles being produced. Namely, we have to know if our particles will need to have post-translational modifications or whether they will have to be enveloped or not (30).

The expression systems we currently have available for the production of VLPs are plants, bacteria, yeasts, insect and mammalian cells.

3.1 Bacteria - A research opportunity

Bacteria have long been used for producing diverse protein compounds. There are several examples, such as the case of a number of hormones, cytokines, and even insulin (recombinant proteins) produced by *Escherichia coli* (*E-coli*). In addition to these, more than a few VLPs have already been produced from bacterial - generally *E-coli*.

E.coli is able to be used as a method of producing VLPs in cases where they are relatively simple, and that it is possible for the correct folding of the protein to occur. Simple VLPs that comprise only one or two proteins in their structure are usually produced by bacteria, or yeasts (31,50).

E.coli, as an expression system, presents several peculiarities that make it an attractive protein expression host, and has a vast potential in terms of applications of simple protein synthesis. This production system has several advantages, but also some limitations, as we can see in Table I. The fact that *E.coli* is capable of presenting high production levels, and being easily scalable, makes it a low-cost production. Thus, low cost productions allow vaccines to reach the poorest countries, and not just developed countries, as is often the case (34). The truth is that the access to vaccination does not occur equally in developed versus developing countries, therefore it should also be a concern that development and production costs of vaccines and medication are as low as possible, in order that the vaccines can be accessed by everyone.

There are some limitations regarding the production of VLPs by *E.coli* that make it sometimes not possible to choose this expression system. One of the problems that the *E.coli* expression system presents is its inability to produce post translational modifications. These modifications are extremely important in the stability, activity and immunogenicity of the produced particles. Furthermore, *E.coli* also presents the ability to produce endotoxins, like the lipopolysaccharide (LPS), and an injectable vaccine contaminated with endotoxins can cause, for example, a septic shock (34,50,51). Moreover, VLPs have also another problem, which is due to the fact that the recombinant proteins are often insoluble and consequently form inclusion bodies that arise due to an inefficient protein folding process. The formation of these protein aggregates can also be enhanced by the high number of proteins in the cytoplasm of the bacterium, since it hinders the current folding. Several strategies have already been studied to deal with these problems including a) use lower expression temperatures, which causes a lower folding kinetics, and reduces the hydrophobic interactions implicated in self-aggregation; b) co-production of chaperones; c) use of fusion partner proteins, being that fusion tags plays an important role both in the solubility of VLPs and in their subsequent

purification, however their mechanism of action is not well understood d) and, of course, the cultivation conditions will have impact (52).

A VLP vaccine produced from *E.coli* is currently on the market. Hecolin is a prophylactic hepatitis E vaccine, approved in China, and manufactured by Xiamen Innovax Biotech Co.. This vaccine is for people over 16 years of age, and it is recommended that it be given to people who are at high risk of developing the infection (53).

Nevertheless, in summary, we must retain the idea that VLPs produced in *E.coli* are still mostly used only in research and pre-clinical studies.

Tabela 1: Summary table of advantages and disadvantages of different expression systems (Adapted/modified from: (34,54))

	E.coli	Yeast	Insect Cells	Plants (55)	Mammalian Cells
Enveloped VLPs	No	Yes	Yes	Yes	Yes
Yield	+++	++	++	++	+
Scaled-up	+++	+++	++	++	++
Production cost	+	+	++	++	+++
VLP complexity	+	++	+++	++	++
Post Translational Modifications					
Disulfide bond	No	Yes	Yes	Yes	Yes
O-glycosylation	No	Yes	Yes	Yes	Yes
N-glycosylation	No	Yes	Yes	Yes	Yes
Phosphorylation	No	Yes	Yes	Yes	Yes
Acylation	No	Yes	Yes	Yes	Yes
γ-Carboxylation	No	No	No	No	Yes

+ low; ++ medium; +++ high

3.2 Yeast - The most proven expression system

Yeasts are an attractive expression system that allows us to produce VLPs. Like *E.coli*, it also has some advantages and disadvantages that have to be measured when we choose the expression system we are going to use.

The yeasts most used in the production of VLP are *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) and *Hansenula polymorpha* (*H. polymorpha*).

Yeasts, contrasting with *E.coli*, are eukaryotic microorganisms, which is reflected in some particularities, and leads to some advantages. Although, in some aspects there are similarities in these two production systems which are, discussed below.

Yeast production tends to be low-cost, the fermentation could be easily scaled-up, so, good production yields are normally achieved (51). These characteristics continue to be compatible with the possibility of producing vaccines with relatively affordable production costs, which is important for them to be used in the least developed countries. Additionally it is also important to consider that the industries for the production of VLP vaccines, even more so as in this case produced in an innocuous system, do not have the same construction requirements, because the containment and safety conditions of the operators, so, are not as demanding as they are in the case of the production of traditional vaccines in which pathogens are being produced.

Another characteristic of VLPs produced in yeasts is the fact that they can undergo some post translational modifications, as described in Table I. Moreover, contrary to what we find that happens with VLPs produced in *E.coli*, with *S. cerevisiae* as a production system, the proteins produced show a greater solubility. This is related to the fact that the ER works as a vigilant in the folding of proteins, which does not happen in *E.coli*, since prokaryotic microorganisms are not endowed with internal membrane structures, and subsequently the formation of inclusion bodies commonly occurs (50,51).

In opposite to what happened with vaccines produced by *E.coli*, which only have vaccines on the Chinese market, there are already several vaccines based on yeast accepted in Europe. These include, Engerix-B and Recombivax HB™, which are vaccines for hepatitis B, produced by, GlaxoSmithKline and Merck, respectively. Also against human papillomavirus (HPV) there are already prophylactic vaccines based on yeast VLPs authorized in Europe, including Gardasil - HPV 16, 6, 11 and 18, and Gardasil 9 - HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 and 58 (56).

3.3 Baculovirus/Insect Cells - One of the most commonly used

Baculovirus are viruses that naturally infect insect cells, and the baculovirus most used as an expression system is *Autographa californica Multiple Nucleopolyhedrovirus (AcMNPV)* (57).

In the last few years baculovirus expression vector system had an enormous growth. Nowadays is one of the most commonly used, and already has several products on the market, including a bivalent VLP vaccine against the HPV - Cervarix, produced by GlaxoSmithKline.

The production based on this eukaryotic expression system is complex since there are many steps prior to the production of the VLPs themselves. In order insect cells be able to produce VLPs, it is necessary that they be previously infected with recombinant baculoviruses, and before that, the baculovirus must be transformed with the purified plasmid to have the genetic material corresponding to our proteins of interest (58). It should be borne in mind the composition of VLPs, so if the particles are composed of more than one protein there are two options a) several baculoviruses can be used and each carries a gene - co-infection b) a single baculovirus presents several genes - co-expression; a combination of these two methods is also possible (59).

Like all other expression systems, baculovirus/ insect cells also have advantages and disadvantages, and are more suitable for some types of VLPs while other expression systems are for the others types. Different VLPs have different particularities, so we must take this into account when choosing which production system we intend to use for production, as said before; thus, it is important to bear in mind that the production of eVLPs is more challenging, compared to non-enveloped VLPs. Despite this, baculovirus expression vector system has proven to be a good choice for the production of eVLPs numerous times (60–62).

A clear advantage of this expression system is the fact that it allows very similar post translational modifications to those obtained through mammalian cells. However, this particularity also leads us to what we may consider a limitation, which is the fact that it is unable to synthesize N-glycans as complex as those produced by mammalian cells, which will impact its function (63).

When we think about production methods, we also have to think about something else: the process length. Imagine a pandemic context: We need to produce many vaccines quickly, therefore the speed of production associated here is without a doubt an advantage. But we do not need to go that far, even the flu vaccines available every year would be much more advantageous if we were able to produce them in a shorter period of time, because that way

we would be able to avoid the possibility of the vaccine does not matched with the circulating virus, because we did not have to start producing it a year in advance, as we currently do. Furthermore the fact that insect cells grow in suspension enhances the production capacity.

In terms of disadvantages, we can point out the fact that production costs are higher, which limits access to vaccination, and the yields achieved are lower compared to what happens with the systems that we discussed before (58).

3.4 Plants - Are edible vaccines the goal?

Although it is not the most used production system, and there is still no VLPs produced through plants on the market, they have been gaining space in the production of recombinant proteins, as recombinant antibodies for example, and, of course, VLPs.

Plants as system host are easily scaled up, low-cost, and capable of obtaining high yield. Moreover the risk of contamination is not high, what makes them a good choice for protein production.

The production of VLP vaccines from plants has a great potential in terms of oral administration. However, the possible administration of edible vaccines requires a great deal of work in establishing the dosages to be administered in order to give an effective vaccination.

In cases where the plants used as a transient protein production system are part of the group we use as food or feed, the purification process tends to be less complex. However, the tobacco plant is the one that most appears in the literature as being the most used in the production of plant-derived VLPs, and in that case, we have the fact that high concentrations of nicotine have to be removed during the downstream steps. Besides, although plants are capable of synthesize post translational modifications, like glycosylation, some post translational modifications differ among plants and mammals, however, it is already possible to overcome these issues through engineering processes, from which it is possible to change these differences (64,65). It should also be considered that prokaryotic cells do not have the capacity to produce glycosylation, and even in yeast and insect cells the ability to produce these post translational modifications is limited. Therefore, even so the glycosylation in plants can be seen as advantageous (Table 1) (66).

For the plant to produce any type of proteins, it is necessary that the genetic material that contains its information be placed in the plant's cells. Stable transformation is an option, however it is important to consider that not all plants are able, or at least not in all plants can be easily done, to add new information to their genome. This adds to the fact that the use of transgenic plants is very much regulated. Due to these limitations, the alternative to the use

of transgenic plants, the transient expression, is increasingly used. For transient expression occurs there are three different delivery systems: a) biolistic bombardment, b) agro-infiltration and c) per virus vector (67).

Although, as already mentioned, there are still no vaccines on the market produced using plants. There are already many published studies that show the efficacy and safety of these vaccines (68,69). Therefore, it is expected that they will soon appear on the market.

3.5. Mammalian Cells - The production of the most complex VLPs

Mammalian cell lines are also an expression system already studied for the production of VLPs.

The biggest advantage of the VLPs produced through mammalian cell lines is the post translational modifications obtained, as we can see in Table I, whose complexity is much higher than the post translational modifications achieved using other methods. However, the production costs and the difficulty of production on a considerable scale are disadvantages that make it difficult to use this production other than in research (70).

In order to produce VLPs through mammalian cells there are two methods that can be used, the generation of stable lines or, transient transfection.

When opting for the generation of a stable cell line for the production of VLPs, the cells should be transduced with an appropriate vector, and after selecting the recombinant cells that produce the protein of interest, the master cell bank should be established (71). From this approach, it has been demonstrated that continuous production of the protein antigen can be achieved over time, and that it can induce antibody titers similar to other vaccines already on the market (72). However, it takes a few months to establish a stable cell line.

Contrary to what happens in the production of VLPs through a stable line, when opting for transient transfection the foreign DNA does not integrate into the host genome, and consequently after some time the cells stop producing the VLP, because they lose the genetic material. For this reason, transient transfection is particularly interesting in pre-clinical trials in which we are still trying to understand the potential of the VLP, as this method of production has the advantage of being able to establish quite quickly, so in a few weeks it is possible to have a reasonable amount of the protein to put the tests in practice (70,73).

Several cell lines for the production of VLPs are described in the literature, for example, vero, HEK 296, and Chinese Hamster Ovary (CHO) cells. VLPs produced through these cell lines have already shown in animal tests to be highly immunogenic (74). Nevertheless there are not VLP vaccines produced according to this technology on the market yet. There may be

several reasons for this, such as the high production costs, for example, and the difficulty of large-scale production.

4. SARS-COV-2 VLP Candidate vaccines

Concerning the SARS-COV-2, there are currently five vaccines based on SARS-COV-2 spike protein (S-protein) VLPs under development in clinical trials (Table 2).

Owing to the fact that S protein plays the crucial role in virus entry into the cells, it is expected to be the key antigen of the vaccines.

Tabela 2 Summary of the main characteristics of the five SARS-COV-2 VLP-based vaccines in clinical trials

Developers	Vaccine	Expression system	Tecnology	Phase of clinical trials	References
Medicago	CoVLP	Plants	Proficia®	Phase 2/3	(77) (79)
VBI Vaccines Inc.	VBI-2902a	Mammalian cells	Not published	Phase 1/2	(84) (87)
Radboud University	ABNCoV2 capsid virus	Not published	SpyTag/SpyCatcher	Phase 1	(94)
Serum Institute of India + Acclagen Pty + SpyBiotech	RBD SARS-CoV-2 HBsAg VLP vaccine	Not published	SpyTag/SpyCatcher	Phase 1/2	(98) (99)
The Scientific and Technological Research Council of Turkey	SARS-CoV-2 VLP vaccine	Not published	Not published	Phase 2	(101)

4.1 Plants as a production system and the Proficia® technology

In March 2020, Medicago, a North American Biotech Company, in partnership with GlaxoSmithKline announced that it had been able to developed SARS-COV-2 VLPs (75). The vaccine has a Coronavirus-like particle with S protein trimers in the lipid bilayer (76).

Concerning the system of expression, Medicago has developed the Proficia® technology. Firstly, this technology was developed as a substitute to conventional egg-based production system for the influenza vaccines production. Briefly, this technology consists in synthesizing a vector containing the genetic information correspondent to the protein(s) of interest; introducing the plasmid into a plant-specific bacterial vector (*Nicotiana benthamiana* (*N. benthamiana*)) through vacuum infiltration when the plants are submerged in a solution who contains the vector; incubating the plants for 4-6 days, allowing for transient protein expression and VLP formation; harvesting the plants to be able to extract and isolate the VLPs; and finally, purifying the VLPs by obtaining the material required for the vaccines production (77,78).

The vaccine based on the VLPs produced by Medicago Inc. is in phase 2/3 of the clinical trials, in a “Randomized, Observer-Blind, Placebo-Controlled, phase 2/3 Study to Assess the Safety, Efficacy, and Immunogenicity of a Recombinant Coronavirus-Like Particle COVID-19 Vaccine in Adults 18 Years of Age or Older”. The volume of 0.5 mL intramuscular vaccine being tested containing 3.75 µg of VLPs adjuvanted with AS03 adjuvant (79).

The results of the phase I are already known and were positive. Regarding safety issues, there were no serious adverse effects to be recorded. The immune responses elicited were strong, having been enhanced by the adjuvant. A satisfactory benefit-risk assessment was obtained (80,81). Phase 2 data have also been already reported. The vaccine being studied with the AS03 adjuvant has shown to be able to induce high antibody titers, both in adults and in the elderly people, even compared to titers in people who were recovering from the COVID-19. In addition, there were no serious adverse effects registered with the administration of the vaccine (82,83). The most common adverse effects were pain at the injection site, fatigue and muscle aches (76).

With these encouraging results, we are now awaiting for the completion of clinical phase 3.

4.2. Mammalian cells based vaccine

VBI vaccines Inc. is already producing a VLP based vaccine against SARS-COV-2, which is currently in the phase 1/2 of clinical studies, where its safety, tolerability and immunogenicity will be studied. VBI-2902a clinical trial is a randomized, observer-blind, dose-escalation (5 µg and 10 µg of S protein), and placebo-controlled study (84).

The vaccine under study is a vaccine based on eVLPs; this vaccine is a monovalent vaccine that presents S protein on the surface the eVLP. In addition, the vaccine also has aluminum phosphate as adjuvant (85).

BVI Vaccines Inc. presents a modified prefusion S protein for the reason that these eVLPs showed a higher yield in previous research, which is a very important factor for large-scale production, and also, they proved to be more immunogenic (86).

Enveloped VLPs for the production of these vaccines were produced using transient transfection in human embryonic kidney cells (293T-3F6). Furthermore, the stabilized prefusion form of S protein was obtained through the mutation of furin cleavage site, from the exchange of amino acids, and a vesicular stomatitis virus (VSV)-G tail was also added to the VLP envelope (87). Previously, in other studies, it had been described that the alteration of other transmembrane domains by that of the VSV-G protein envelope had helped in pseudotyped, and therefore increased yield (88). A favorable yield is always very important in

large-scale production, but even more so in an epidemic context where it is necessary to quickly produce a large number of doses.

VBI-2902a vaccine, in preclinical studies, has shown to be potent, decreasing the clinical disease and lung inflammation in hamsters, mainly when administered two doses, although it has already been shown to be effective with a single dose (87). There are already published results regarding the portion I of phase I/2 of the clinical trial, being that the vaccine proved to be well tolerated, and was able to induce antibody titers in all participants (89).

A disadvantage of this vaccine has to do with the fact that it needs storage and distribution conditioned in freezing temperatures, which makes the logistics of large-scale vaccination harder, due to the greater requirement in distribution.

The ongoing clinical study is expected to be completed in June 2022 (84).

4.3. SpyTag/SpyCatcher technology

The density of antigens bound to the VLP and their orientation binding to the VLP, impacts the effectiveness of the VLP vaccines.

The SpyTag/SpyCatcher technology emerged as an option to overcome these challenges, and is owned by SpyBiotech.

SpyTag/SpyCatcher protein “superglue” technology is based on the establishment of a stable and irreversible link between SpyTag (peptide) and SpyCatcher (protein - that binds to the VLP), as we can see in Figure 5. That is, the Spy-VLPs and the antigen, that also have to be modified in order to have a SpyTag or SpyCatcher, when are mixed and incubate, befalls the attachment of the antigen to the VLP through a connection between SpyTag and SpyCatcher (90–92).

This new technology brings undoubted advantages to the production of VLPs and promises to be simpler, and to increase the density of antigen presentation.

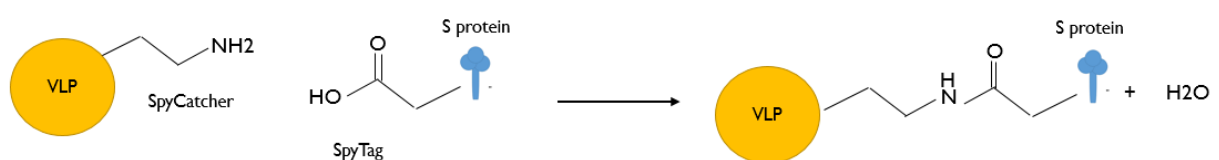


Figure 5 SpyTag/SpyCatcher bound. The VLP is bound to the SpyCatcher, and the antigen (in this case, S protein) is bound to the SpyTag. SpyCatcher and SpyTag have the ability to covalently bind, so, the VLP and the antigen are also bound to each other. The VLP will function as a carrier for the antigen (**Own Image**).

There are already two vaccines against COVID-19 in clinical trials based on this technology.

Preclinical studies of vaccines based on this technology showed that with low doses it was possible to induce robust antigen responses in mice and pigs (93). They also have the advantage

of easily allowing conjugation with other antigens, if necessary. In addition to showing high immunogenicity, also shows the advantages of being thermostable, and the possibility of being lyophilized and after reconstitution not showing a relevant decrease in activity. If this characteristic is generically transversal to all vaccines obtained from SpyTag/SpyCatcher technology, we may have an opportunity here to produce vaccines that are easier to transport and consequently have lower costs (93).

Radboud University is currently in charge of a clinical trial of a capsid VLP based vaccine – ABNCoV2. Behind this vaccine is a consortium - AdaptVac, ExpreS2ion Biotechnologies, Leiden University Medical Center, Institute for Tropical Medicine at University of Tübingen, the Radboud University Medical Center, the Department of Immunology and Microbiology at University of Copenhagen, and the Laboratory of Virology at Wageningen University.

Clinical trial is in phase I, whose objective is to study safety and the possible manifestation of adverse effects. In addition, also try to understand if there is indeed an immune response derived from the administration of the vaccine. Ascending doses (6 µg - 70 µg) will be studied, in seven groups (n=6), as well as formulations with and without MF59 adjuvant. All volunteers will receive two inoculations, and the dose-escalation will proceed only in absence of protocol-defined safety signals (94).

It is the first time that this vaccine is being studied in humans, and it is even in recruiting phase, but studies on models and animals have already been developed (95). Preclinical data demonstrated strong immunogenicity results. There was the formation of neutralizing antibodies in higher doses both with adjuvant and without, and in lower doses with adjuvant (96).

Also Serum Institute of India, Accelagen and SpyBiotech are developing a vaccine that is already in clinical trials based on SpyTag/SpyCatcher technology. The RBD SARS-CoV-2 HBsAg VLP vaccine that is being developed by Serum Institute of India, Accelagen and SpyBiotech is in phase I/2 of two clinical studies (97).

The first to be submitted with a registration number of ACTRN12620000817943. This clinical trial is a randomized, multicentric, placebo-controlled, with the placebo containing an aluminum hydroxide suspension. Participants will receive the study vaccine (or placebo) via the intramuscular route on days 0 and 28. Two doses will be tested, 50 µg and 250 µg (98).

The other clinical trial with registration number ACTRN12620001308987 is also a randomized, multicenter, placebo-controlled trial. In this trial there are also two different doses, 20 µg and 50 µg and still with two different adjuvants: alum adjuvant alone, alum adjuvant

plus CpG 1018 (150 mcg¹), or Alum adjuvant plus CpG1018 (1500 mcg¹). Vaccine/placebo is administered on days 0 and 28 via intramuscular injection (99).

The VLP vaccine who is being produced has S protein on the surface of HBsAg VLPs. The intention here is to take advantage of the fact that there are already HBsAg VLPs on the market and that we know that they are safe and have a good profile in terms of immunogenicity (100).

4.4 Others

The Scientific and Technological Research Council of Turkey is also behind the development of a vaccine against COVID-19. The Turkish vaccine is currently in phase I of clinical trials, where safety, tolerability, and immunogenicity will be evaluated.

The clinical trial is based on the administration of the vaccine injected subcutaneously in two different dosages (3.75 µg or 15 µg) against a placebo. The adjuvants used are alum and CpGODN-K3 (101).

Although there is no available data yet, Prof. Dr. Hasan Mandal, president of The Scientific and Technological Research Council of Turkey, has already come to guarantee that the goal is for the VLP vaccine to be available at the end of 2021 after completing the clinical phases, and also that the vaccines can be produced by Turkish companies (102).

¹ The decision was made to transcribe the information as it appears in the literature, even though they are not units of the SI (international system), as we know that in the literature the correspondence to SI is not correct.

5. Conclusion and Future Perspectives

More and more often, VLPs, which are particles that resemble a virus without containing genetic material, are being considered a favorable option for vaccine formulations. The main goals of vaccines are efficacy and safety, and VLP vaccines perfectly meet these requirements. Besides, these vaccines, as we have seen, have already shown very promising effects in terms of activation of the immune system. For that reason, it is expected that VLPs based vaccines will gain more and more space in the market.

Many expression systems have already been used for the production of VLPs, and each one shows its peculiarities, so, these must be studied continuously more, and the system used must be adapted to the VLP to be produced and to its purpose. They all have advantages and disadvantages, which we should take full advantage of.

It is expected that a lot of progress will continue to be made in VLPs production, and we will be able to adapt the systems continuously, and optimize them. I also want to believe that with the progress, we will be able to produce vaccines at increasingly lower costs, both in terms of particles production and factories costs. As vaccine production becomes increasingly innocuous with the expected arrival of VLP vaccines to the market, this way, the low cost production of vaccines would growingly allow countries with fewer resources to have greater access to vaccination.

Of course, this evolution in vaccines, including VLP vaccines was greatly enhanced by the COVID-19 pandemic situation. A pandemic situation is, naturally, a situation in which all world is on alert, and almost instantaneously it is asked to the scientific community to produce a vaccine that quickly contain the situation. This same thing happened in the pandemic caused by the SARS-COV-2, a virus that turned out to be highly infectious and that caused millions of deaths across the globe.

The fact that researchers had previous experiments with coronaviruses as MERS-COV and SARS-COV viruses increased the speed with which vaccines have been brought to market. None of the vaccines for COVID-19, that are already on the market are based on VLPs. However, five VLP vaccines are already in clinical trials, and the results that are known are encouraging.

Everything is still very uncertain, including the long-term results of the vaccines that are already being administered around the world, so that, new inoculations may be necessary, as

is the case with vaccines against the influenza virus, which occur once a year. Therefore, it is possible that there is still a place for SARS-COV-2 VLP-based vaccines on the market.

Increasingly, vaccines based on VLPs are expected to make a difference, both in fighting the pandemic we are facing and in so many other diseases that we continue to have to fight.

6. References

1. SHEREEN MA, KHAN S, KAZMI A, BASHIR N, SIDDIQUE R. COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. *J Adv Res* [Internet]. 2020;24:91–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.03.005>
2. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard | WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard With Vaccination Data [Internet]. [cited 2021 Jun 22]. Available from: <https://covid19.who.int/>
3. SHANMUGARAJ B, MALLA A, PHOOLCHAROEN W. Emergence of novel coronavirus 2019-nCoV: Need for rapid vaccine and biologics development. *Pathogens*. 2020;9(2):1–10.
4. KONDA M, DODDA B, KONALA VM, NARAMALA S, ADAPA S. Potential Zoonotic Origins of SARS-CoV-2 and Insights for Preventing Future Pandemics Through One Health Approach. *Cureus*. 2020;12(6).
5. WHO Director-General’s opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020 [Internet]. [cited 2021 Jun 3]. Available from: https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020?fbclid=IwAR0-6j0d70at8muH_rAHOkhhRo0c9xEAThdvgEnL-PkNFUww9AjpPULFzmA
6. SANTARPIA JL, HERRERA VL, RIVERA DN, RATNESAR-SHUMATE S, REID SP, DENTON PW, et al. The infectious nature of patient-generated SARS-CoV-2 aerosol [Internet]. *medRxiv*. 2020. Available from: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.07.13.20041632v2>
7. Lednicky JA, Lauzard M, Fan ZH, Jutla A, Tilly TB, Gangwar M, et al. Viable SARS-CoV-2 in the air of a hospital room with COVID-19 patients. *Int J Infect Dis* [Internet]. 2020;100:476–82. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.09.025>
8. HU M, LIN H, WANG J, XU C, TATEM AJ, MENG B, et al. Risk of Coronavirus Disease 2019 Transmission in Train Passengers: an Epidemiological and Modeling Study. *Clin Infect Dis*. 2021;72(4):604–10.
9. MEYEROWITZ EA, RICHTERMAN A, GANDHI RT, SAX PE. Transmission of SARS-CoV-2: A Review of Viral, Host, and Environmental Factors. *Ann Intern Med* [Internet]. 2021;174(1):69–79. Available from: <https://www.acpjournals.org/doi/10.7326/M20-5008>
10. TRENDS S. Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. 2020;

11. Pastorino B, Touret F, Gilles M, de Lamballerie X, Charrel RN. Prolonged Infectivity of SARS-CoV-2 in Fomites. *Emerg Infect Dis.* 2020;26(9):2256–7.
12. ALZAMORA MC, PAREDES T, CACERES D, WEBB CM, VALDEZ LM, Valdez LM, et al. Severe COVID-19 during Pregnancy and Possible Vertical Transmission. *Am J Perinatol.* 2020;37(8):861–5.
13. LI Y, ZHAO R, ZHENG S, CHEN X, WANG J, SHENG X, et al. Lack of vertical transmission of severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2, China. *Emerg Infect Dis.* 2020;26(6):1335–6.
14. ZHU H, WANG L, FANG C, PENG S, ZHANG L, CHANG G, et al. Clinical analysis of 10 neonates born to mothers with 2019-nCoV pneumonia. *Transl Pediatr.* 2020; 9(1):51–60.
15. Cuicchi D, Lazzarotto T, Poggioli G. Fecal-oral transmission of SARS-CoV-2: review of laboratory-confirmed virus in gastrointestinal system. *Int J Colorectal Dis.* 2021;36(3):437–44.
16. HINDSON J. COVID-19: faecal–oral transmission? [Internet]. Vol. 17, *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology.* Nature Research; 2020 [cited 2021 Apr 14]. p. 259. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41575-020-0295-7>
17. ZHANG B, LIU S, DONG Y, ZHANG L, ZHONG Q, ZOU Y, et al. Positive rectal swabs in young patients recovered from coronavirus disease 2019 (COVID-19). *J Infect* [Internet]. 2020;81(2):e49–52. Available from: [https://www.journalofinfection.com/article/S0163-4453\(20\)30233-4/fulltext](https://www.journalofinfection.com/article/S0163-4453(20)30233-4/fulltext)
18. WANG W, XU Y, GAO R, LU R, HAN K, WU G, et al. Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. *JAMA - J Am Med Assoc* [Internet]. 2020;323(18):1843–4. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2762997>
19. CHAKRABORTY C, SHARMA AR, SHARMA G, BHATTACHARYA M, LEE SS. SARS-CoV-2 causing pneumonia-associated respiratory disorder (COVID-19): Diagnostic and proposed therapeutic options. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2020;24(7):4016–26.
20. LI G, FAN Y, LAI Y, HAN T, LI Z, ZHOU P, et al. Coronavirus infections and immune responses. *J Med Virol.* 2020;92(4):424–32.
21. HARRISON AG, LIN T, WANG P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. *Trends Immunol* [Internet]. 2020;41(12):1100–15. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.10.004>
22. WANG MY, ZHAO R, GAO LJ, GAO XF, WANG DP, CAO JM. SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Front Cell Infect*

- Microbiol. 2020;10(November):1–17.
23. POMPLUN S. Targeting the SARS-CoV-2-spike protein: From antibodies to miniproteins and peptides. *RSC Med Chem* [Internet]. 2021;12(2):197–202. Available from:
<https://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleLanding/2021/MD/D0MD00385A#!divAbstract>
 24. ROSSI GA, SACCO Oliviero, Enrica M, CRISTIANI L, MIDULLA F. Differences and similarities between SARS-CoV and SARS-CoV-2: spike receptor-binding domain recognition and host cell infection with support of cellular serine proteases. [Internet]. 2020. p. 665–9. Available from: <https://techspirited.com/differences-similarities-between-grid-cluster-computing>
 25. Hoffmann M, KLEINE-WEBER H, SCHROEDER S, KRUGER N, HERRLER T, ERICHSEN S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*. 2020;181(2):271-280.e8.
 26. GOMES CP, FERNANDES DE, CASIMIRO F, MATA GF, PASSOS MT, VARELA P, et al. Cathepsin L in COVID-19: From Pharmacological Evidences to Genetics. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10(December):1–10.
 27. JOHNSON BA, XIE X, KALVERAM B, LOKUGAMAGE KG, MURUATO A, ZOU J, et al. Furin Cleavage Site Is Key to SARS-CoV-2 Pathogenesis. *bioRxiv Prepr Serv Biol* [Internet]. 2020 Aug 26 [cited 2021 Jun 3];2020.08.26.268854. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32869021>
 28. KADAM SB, SUKHRAMANI GS, BISHNOI P, PABLE AA, BARVKAR VT. SARS-CoV-2, the pandemic coronavirus: Molecular and structural insights [Internet]. Vol. 61, *Journal of Basic Microbiology*. Wiley-VCH Verlag; 2021 [cited 2021 Jul 5]. p. 180–202. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33460172/>
 29. ABDELMASSIH AF, YE J, KAMEL A, MISHRIKY F, ISMAIL HA, RAGAB HA, et al. A multicenter consensus: A role of furin in the endothelial tropism in obese patients with COVID-19 infection. *Obes Med* [Internet]. 2020;19(July):100281. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.obmed.2020.100281>
 30. FUENMAYOR J, GODIA F, CERVERA L. Production of virus-like particles for vaccines [Internet]. Vol. 39, *New Biotechnology*. Elsevier B.V.; 2017. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1871678416325511?via%3Dihub>
 31. ROLDÃO A, Mellado MCM, CASTILHO LR, CARRONDO MJ, ALVES PM. Virus-like particles in vaccine development. *Virus-like Part Vaccine Dev* [Internet]. 2010;1149–1176. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1586/erv.10.115>
 32. COVID-19 Programs [Internet]. [cited 2021 Jan 14]. Available from:

- <https://www.medicago.com/en/covid-19-programs/>
33. TAN M, JIANG X. Subviral particle as vaccine and vaccine platform. *Curr Opin Virol* [Internet]. 2014;6(1):24–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coviro.2014.02.009>
 34. HUANG X, WANG X, ZHANG J, XIA N, ZHAO Q. Escherichia coli-derived virus-like particles in vaccine development [Internet]. Vol. 2, *npj Vaccines*. Springer US; 2017. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41541-017-0006-8>
 35. SCOTTI N, RYBICKI EP. Virus-like particles produced in plants as potential vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2013;12(2):211–24.
 36. JAIN NK, SAHNI N, KUMRU OS, JOSHI SB, VOLKIN DB, RUSSELL MIDDAUGH C. Formulation and stabilization of recombinant protein based virus-like particle vaccines. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2015;93:42–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2014.10.023>
 37. CIMICA V, GALARZA JM. Adjuvant formulations for virus-like particle (VLP) based vaccines. *Clin Immunol*. 2017;183:99–108.
 38. MOHSEN MO, GOMES AC, VOGEL M, BACHMANN MF. Interaction of viral capsid-derived virus-like particles (VLPs) with the innate immune system. *Vaccines*. 2018;6(3):1–12.
 39. GRGSCIC EVL, ANDERSON DA. Virus-like particles: Passport to immune recognition. *Methods*. 2006;40(1):60–5.
 40. SEIFERT M, KUPPERS R. Human memory B cells. *Leukemia*. 2016;30(12):2283–92.
 41. CUBAS R, ZHANG S, KWON S, SEVICK-MURACA EM, LI M, CHEN C, et al. Virus-like particle (VLP) lymphatic trafficking and immune response generation after immunization by different routes. *J Immunother*. 2009;32(2):118–28.
 42. STORNI T, BACHMANN MF. Loading of MHC Class I and II Presentation Pathways by Exogenous Antigens: A Quantitative In Vivo Comparison. *J Immunol*. 2004;172(10):6129–35.
 43. EMBGENBROICH M, BURGDORF S. Current concepts of antigen cross-presentation. *Front Immunol*. 2018;9(JUL).
 44. CRUZ FM, COLBERT JD, MERINO E, KRIEGSMAN BA, ROCK KL. The biology and underlying mechanisms of cross-presentation of exogenous antigens on MHC-I molecules. *Annu Rev Immunol*. 2017;35(December 2016):149–76.
 45. LEE SH, CHU KB, KANG HJ, QUAN FS. Virus-like particles containing multiple antigenic proteins of *Toxoplasma gondii* induce memory T cell and B cell responses. *PLoS One*. 2019;14(8):1–15.

46. OISSON SE, VILLA LL, COSTA RLR, PETTA CA, ANDRADE RP, MALM C, et al. Induction of immune memory following administration of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus (HPV) types 6/11/16/18 LI virus-like particle (VLP) vaccine. *Vaccine*. 2007;25(26):4931–9.
47. COFFMAN RL, SHER A, SEDER RA. Vaccine adjuvants: Putting innate immunity to work. *Immunity* [Internet]. 2010;33(4):492–503. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2010.10.002>
48. COMMITTEE FOR MEDICINAL PRODUCTS FOR HUMAN USE (CHMP) GUIDELINE ON ADJUVANTS IN VACCINES FOR HUMAN USE DATE FOR COMING INTO OPERATION [Internet]. 2003 [cited 2021 May 16]. Available from: <http://www.emea.eu.int>
49. WEINBERGER B. Adjuvant strategies to improve vaccination of the elderly population. *Curr Opin Pharmacol* [Internet]. 2018;41(Table 1):34–41. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.coph.2018.03.014>
50. ZELTINS A. Construction and characterization of virus-like particles: A review. *Mol Biotechnol*. 2013;53(1):92–107.
51. KIM HJ, KIM HJ. Yeast as an expression system for producing virus-like particles: what factors do we need to consider? *Lett Appl Microbiol*. 2016;64(2):1–33.
52. COSTA S, ALMEIDA A, CASTRO A, DOMINGUES L. Fusion tags for protein solubility, purification, and immunogenicity in *Escherichia coli*: The novel Fh8 system. *Front Microbiol* [Internet]. 2014;5(FEB). Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2014.00063/full>
53. Group HEVW. Hepatitis E Vaccine : Composition , Safety , Immunogenicity and Efficacy A document prepared for Strategic Advisory Group of Experts on Immunization (SAGE) by the Hepatitis E Vaccine Working Group [Internet]. 2014 [cited 2021 Mar 21]. p. 1–30. Available from: <http://www.innovax.cn/en/proI.aspx?CatelD=52#103>
54. DENG F, WANG H, DAI S. Advances and challenges in enveloped virus-like particle (VLP)-based vaccines. *J Immunol Sci*. 2018;2(2):36–41.
55. GOMORD V, FAYE L. Posttranslational modification of therapeutic proteins in plants. *Curr Opin Plant Biol*. 2004;7(2):171–81.
56. Ema N, Agency T, States M, Agency T, Risk P, Committee A. HPV vaccines : EMA confirms evidence does not support that they cause CRPS or POTS Reports after HPV vaccination consistent with what would be expected in this [Internet]. Vol. 44. 2016 [cited 2021 Mar 28]. p. 5–8. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/documents/press-release/hpv-vaccines-ema-confirms-evidence-does-not-support-they-cause-crps->

57. CHAMBERS AC, AKSULAR M, GRAVES LP, IRONS SL, POSSEE RD, KING LA. Overview of the Baculovirus Expression System. *Curr Protoc Protein Sci* [Internet]. 2018;91(1):5.4.1-5.4.6. Available from: <https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cpps.47>
58. FELBERBAUM RS. The baculovirus expression vector system: A commercial manufacturing platform for viral vaccines and gene therapy vectors. *Biotechnol J*. 2015;10(5):702–14.
59. SOKOLENKO S, GEORGE S, WAGNER A, TULADHAR A, ANDRICH JMS, AUCOIN MG. Co-expression vs. co-infection using baculovirus expression vectors in insect cell culture: Benefits and drawbacks. *Biotechnol Adv* [Internet]. 2012;30(3):766–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.01.009>
60. HO Y, LIB PH, LIU CY, LEE SP, CHAO YC. Assembly of human severe acute respiratory syndrome coronavirus-like particles. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;318(4):833–8.
61. METZ SW, GARDNER J, GEERTSEMA C, LE TT, GOH L, VLAK JM, et al. Effective Chikungunya Virus-like Particle Vaccine Produced in Insect Cells. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(3).
62. DAI S, ZHANG Y, ZHANG T, ZHANG B, WANG H, DENG F. Establishment of baculovirus-expressed VLPs induced syncytial formation assay for flavivirus antiviral screening. *Viruses*. 2018;10(7):1–19.
63. LIU F, WU X, LI L, LIU Z, WANG Z. Use of baculovirus expression system for generation of virus-like particles: Successes and challenges. *Protein Expr Purif* [Internet]. 2013;90(2):104–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2013.05.009>
64. ABRANCHES R, MARCEL S, ARCALIS E, ALTMANN F, FEVEREIRO P, STOGER E. Plants as bioreactors: A comparative study suggests that *Medicago truncatula* is a promising production system. *J Biotechnol*. 2005;120(1):121–34.
65. FISCHER R, STOGER E, SCHILLBERG S, CHRISTOU P, TWYMAN RM. Plant-based production of biopharmaceuticals. *Curr Opin Plant Biol*. 2004;7(2):152–8.
66. Burnett MJB, Burnett AC. Therapeutic recombinant protein production in plants: Challenges and opportunities. *Plants, People, Planet*. 2020;2(2):121–32.
67. CANTO T. Transient expression systems in plants: Potentialities and constraints. *Adv Exp Med Biol*. 2016;896:287–301.
68. PILLET S, COUILLARD J, TRÉPANIÉ S, POULIN JF, YASSINE-DIAB B, GUY B, et al. Immunogenicity and safety of a quadrivalent plant-derived virus like particle influenza

- vaccine candidate—Two randomized Phase II clinical trials in 18 to 49 and 50 years old adults. *PLoS One*. 2019;14(6).
69. CHICHESTER JA, GREEN BJ, JONES RM, SHOJI Y, MIURA K, LONG CA, et al. Safety and immunogenicity of a plant-produced Pfs25 virus-like particle as a transmission blocking vaccine against malaria: A Phase I dose-escalation study in healthy adults. *Vaccine* [Internet]. 2018;36(39):5865–71. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.08.033>
 70. FUENMAYOR J, GODIA F, CERVERA L. Production of virus-like particles for vaccines. Vol. 39, *New Biotechnology*. Elsevier B.V.; 2017. p. 174–80.
 71. FONTANA D, KRATJE R, ETCHEVERRIGARAY M, PRIETO C. Rabies virus-like particles expressed in HEK293 cells. *Vaccine* [Internet]. 2014;32(24):2799–804. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.02.031>
 72. FONTANA D, KRATJE R, ETCHEVERRIGARAY M, PRIETO C. Immunogenic virus-like particles continuously expressed in mammalian cells as a veterinary rabies vaccine candidate. *Vaccine* [Internet]. 2015;33(35):4238–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.03.088>
 73. CERVERA L, GUTIÉRREZ-GRANADOS S, MARTÍNEZ M, BLANCO J, GÒDIA F, SEGURA MM. Generation of HIV-1 Gag VLPs by transient transfection of HEK 293 suspension cell cultures using an optimized animal-derived component free medium. *J Biotechnol* [Internet]. 2013;166(4):152–65. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.05.001>
 74. BUFFIN S, PEUBEZ I, BARRIÈRE F, NICOLAI MC, TAPIA T, Dhir V, et al. Influenza A and B virus-like particles produced in mammalian cells are highly immunogenic and induce functional antibodies. *Vaccine* [Internet]. 2019;37(46):6857–67. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.09.057>
 75. Medicago announces production of a viable vaccine candidate for COVID-19 [Internet]. [cited 2021 Jun 20]. Available from: <https://www.medicago.com/en/media-room/medicago-announces-production-of-a-viable-vaccine-candidate-for-covid-19/>
 76. GOBEIL P, PILLET S, SÉGUIN A, BOULAY I, MAHMOOD A, VINH DC, et al. Interim Report of a Phase 2 Randomized Trial of a Plant-Produced Virus-Like Particle Vaccine for Covid-19 in Healthy Adults Aged 18-64 and Older Adults Aged 65 and Older. *medRxiv* [Internet]. 2021 May 17 [cited 2021 Aug 17];2021.05.14.21257248. Available from: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2021.05.14.21257248v1>
 77. VLP Technologies and Production Platform [Internet]. [cited 2021 Apr 18]. Available from: <https://www.medicago.com/en/technologies/>

78. COVID-19 Programs [Internet]. [cited 2021 Apr 18]. Available from: <https://www.medicago.com/en/covid-19-programs/>
79. Study of a Recombinant Coronavirus-Like Particle COVID-19 Vaccine in Adults - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet]. [cited 2021 Apr 18]. Available from: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04636697?term=medicago&cond=covid-19&draw=2&rank=1>
80. WARD BJ, GOBEIL P, SÉGUIN A, ATKINS J, BOULAY I, CHARBONNEAU P-Y, et al. Phase I trial of a Candidate Recombinant Virus-Like Particle Vaccine for Covid-19 Disease Produced in Plants. medRxiv [Internet]. 2020 [cited 2021 Jun 6]; Available from: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.11.04.20226282v1>
81. Medicago announces positive Phase I results for its COVID-19 vaccine candidate [Internet]. 2020 [cited 2021 Jun 6]. Available from: <https://www.medicago.com/en/media-room/medicago-announces-positive-phase-1-results-for-its-covid-19-vaccine-candidate/>
82. Medicago e GSK anunciam resultados provisórios positivos de Fase 2 para vacina candidata COVID-19 com adjuvante [Internet]. [cited 2021 Jun 20]. Available from: <https://www.medicago.com/en/media-room/medicago-and-gsk-announce-positive-interim-phase-2-results-for-adjuvanted-covid-19-vaccine-candidate/>
83. GOBEIL P, PILLET S, SÉGUIN A, BOULAY I, MAHMOOD A, VINH DC, et al. Title: Interim Report of a Phase 2 Randomized Trial of a Plant-Produced Virus-Like Particle. medRxiv [Internet]. 2021 May 17 [cited 2021 Jun 20];2021.05.14.21257248. Available from: <https://doi.org/10.1101/2021.05.14.21257248>
84. Safety, Tolerability, and Immunogenicity of the COVID-19 Vaccine Candidate (VBI-2902a) - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet]. [cited 2021 May 4]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04773665>
85. Our Pipeline: A Broad Spectrum of Vaccines & Immunotherapeutics | VBI Vaccines Inc. [Internet]. [cited 2021 May 4]. Available from: <https://www.vbivaccines.com/our-pipeline/#prophylactic>
86. Vbi Vaccines Inc/bc 2020 Current Report 8-K [Internet]. 2020 [cited 2021 May 8]. Available from: <https://sec.report/Document/0001493152-20-016722/>
87. Fluckiger A, Ontsouka B, Bozic J, Diress A, Ahmed T, Berthoud T, et al. An enveloped virus-like particle vaccine expressing a stabilized prefusion form of the SARS-CoV-2 spike protein elicits potent immunity after a single dose. 2021; Available from: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.04.28.441832v1>
88. GARRONE P, FLUCKIGER AC, MANGEOT PE, GAUTHIER E, DUPEYROT-LACAS P,

- Mancip J, et al. A prime-boost strategy using virus-like particles pseudotyped for HCV proteins triggers broadly neutralizing antibodies in macaques. *Sci Transl Med.* 2011;3(94).
89. VBI Vaccines Announces Initial Positive Phase I Data for its eVLP Vaccine Candidate Against COVID-19 | VBI Vaccines [Internet]. [cited 2021 Sep 5]. Available from: <https://www.vbivaccines.com/press-releases/covid-19-vaccine-phase-1-data/>
 90. THRANE S, JANITZEK CM, MATONDO S, RESENDE M, GUSTAVSSON T, JONGH WA, et al. Bacterial superglue enables easy development of efficient virus-like particle based vaccines. *J Nanobiotechnology.* 2016;14(1):1–16.
 91. JANITZEK CM, MATONDO S, THRANE S, NIELSEN MA, KAVISHE R, MWAKALINGA SB, et al. Bacterial superglue generates a full-length circumsporozoite protein virus-like particle vaccine capable of inducing high and durable antibody responses. *Malar J.* 2016;15(1):1–9.
 92. Technology [Internet]. [cited 2021 Jun 26]. Available from: <https://www.spybiotech.com/technology/>
 93. TAN TK, RIJAL P, RAHIKAINEN R, KEEBLE AH, SCHIMANSKI L, HUSSAIN S, et al. A COVID-19 vaccine candidate using SpyCatcher multimerization of the SARS-CoV-2 spike protein receptor-binding domain induces potent neutralising antibody responses. *Nat Commun.* 2021;12(1):1–40.
 94. Safety and Tolerability of COVID-19 Vaccine (ABNCoV2) - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet]. [cited 2021 May 11]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT04839146>
 95. The vaccine - Radboudumc [Internet]. [cited 2021 May 11]. Available from: <https://www.radboudumc.nl/en/trials/coronavirus-vaccine-research/the-vaccine>
 96. Nordic B, Bava ASOMX, Bvnyr OTC. Bavarian Nordic Reports Encouraging Preclinical Data for COVID-19 Vaccine Candidate Ahead of First-in-Human Trial. 2021;(16). Available from: <https://www.globenewswire.com/news-release/2021/03/08/2188309/0/en/Bavarian-Nordic-Reports-Encouraging-Preclinical-Data-for-COVID-19-Vaccine-Candidate-Ahead-of-First-in-Human-Trial.html>
 97. COVID-19 vaccine tracker and landscape [Internet]. 2021 [cited 2021 Jun 6]. Available from: <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>
 98. Taylor N. ANZCTR - Registration [Internet]. Australia New Zealand Clinical Trial Registry. 2019 [cited 2021 Jun 8]. p. <https://www.anzctr.org.au/Trial/Registration/Trial>. Available from: <https://anzctr.org.au/Trial/Registration/TrialReview.aspx?id=380145&is>

Review=true

99. Taylor N. ANZCTR - Registration [Internet]. Australia New Zealand Clinical Trial Registry. 2019 [cited 2021 Jun 8]. p. <https://www.anzctr.org.au/Trial/Registration/Trial>. Available from: <https://anzctr.org.au/Trial/Registration/TrialReview.aspx?ACTRN=12620001308987>
100. SpyBiotech and Serum Institute of India announce that the first subjects have been dosed in a Phase I/II trial of a novel virus-like particle vaccine targeting COVID-19 [Internet]. 2020 [cited 2021 Jun 10]. Available from: <https://www.spybiotech.com/news/-/>
101. Study of a Severe Acute Respiratory Syndrome CoV-2 (SARS-CoV-2) Virus-like Particle (VLP) Vaccine in Healthy Adults - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet]. [cited 2021 Jun 6]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04818281?cond=NC T04818281&draw=2&rank=1>
102. TUBITAK Presidente Prof. Dr. Hasan Mandal Faz Avaliações de Estudos de Vacinas e Medicamentos COVID-19 | INSTITUIÇÃO DE PESQUISA CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DA TURQUIA [Internet]. 2021 [cited 2021 Jun 8]. Available from: <https://www.tubitak.gov.tr/tr/haber/tubitak-baskani-prof-dr-hasan-mandal-covid-19-asi-ve-ilac-calismalariyla-ilgili-degerlendirmelerde>