UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA DE VACINA DE POLISSACARÍDEO MENINGOCÓCICO C CONJUGADO E ENCAPSULADO EM LIPOSSOMO

Glauber da Costa de Brito

Dissertação de Mestrado em Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Isaías Raw

Trabalho desenvolvido no Centro de
Biotecnologia do Instituto Butantan

São Paulo

2002

"Avaliação Imunológica de Vacina de Polissacarídeo Meningocócico C Conjugado e Encapsulado em Lipossomo"

GLAUBER DA COSTA DE BRITO

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências – Área: Bioquímica.

Aprovado por:

Profa. Dra. MARTHA MASSAKO TANIZAKI
IB
(Presidente)

Profa. Dra. ANA MARIA CARMONA RIBEIRO
IQ – USP

Profa. Dra. MAGDA MARIA SALES CARNEIRO SAMPAIO
ICB – USP

SÃO PAULO
12 DE DEZEMBRO 2002.

Aos meus pais,
Eurico Gracindo de Brito e
Lindaura da Costa de Brito.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADH – Diidrazida do ácido adípico.

CHP – Complexo de histocompatibilidade principal.

CRM_{197} – Mutante da toxina diftérica.

DM – Doença meningocócica.

EDAC – Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida.

ELISA – Ensaio imuno-enzimático.

MHC – Complexo de histocompatibilidade principal.

MPB – Solução-tampão (fosfato (20 mM), manitol (295 mM), pH 7,2).

OMP – Proteína de membrana externa.

OMS – Organização Mundial de Saúde.

OMV – Vesícula de membrana externa.

PBS – Solução-tampão (Na_2HPO_4 (8,1 mM), KH_2PO_4 (1,47 mM), NaCl (137 mM), KCl (2,7 mM), pH 7,4).

PBS-T – Solução-tampão PBS + Tween 20® a 0,05% (v/v).

PorA – Proteína da membrana externa de *Neisseria meningitidis* responsável pela atribuição do subtipo.

PorB – Proteína da membrana externa de *Neisseria meningitidis* responsável pela atribuição do sorotipo.

PSC – Polissacarídeo capsular de *Neisseria meningitidis* sorogrupo C.

T_a – Temperatura ambiente.

T_c – Temperatura de transição gel-líquido cristalino.

TH – Célula T auxiliar.

TNBS – Ácido 2,4,6-trinitrobenzenossulfônico.

TT – Toxóide tetânico.

RESUMO:

A tecnologia de conjugação melhorou a imunogenicidade de vacinas constituídas de polissacarídeo, especialmente em crianças. Polissacarídeos conjugados a proteínas carregadoras, como o toxóide tetânico, induzem resposta imunológica dependente de célula T e memória imunológica de longa duração. No entanto, esta tecnologia apresenta custo elevado. Assim, foi investigada a capacidade dos lipossomos de aumentar a resposta imunológica ao polissacarídeo C de *Neisseria meningitidis* (PSC). Camundongos foram imunizados com lipossomos contendo PSC, conjugado toxóide tetânico-PSC ou PSC livre como controle, com dose de reforço constituída de PSC livre. Foram gerados anticorpos IgG e IgM contra PSC nos camundongos imunizados com conjugado ou lipossomo. Os resultados mostram que lipossomos contendo PSC têm potencial para substituir a vacina conjugada toxóide tetânico-PSC.

ABSTRACT:

Conjugation technology has improved the immunogenicity of polysaccharide vaccines, specially in small children. Polysaccharides conjugated to various carrier proteins, e.g. tetanus toxoid, stimulate a T cell-dependent antibody response and induce a long-term immunological memory. However, protein-polysaccharide conjugation technology is expensive and this could constitute an important drawback. Thus, immunopotentiation of *Neisseria meningitidis* serogroup C polysaccharide (PSC) by use of liposomes as an alternative to protein-polysaccharide C conjugates was investigated. Mice were immunized with liposomes containing PSC or tetanus toxoid–PSC conjugate or free PSC as control and boosted with free PSC. Immunogenicity of these different preparations was compared with each other. Conjugate and liposome containing PSC induced both IgG and IgM antibodies against the polysaccharide. These results show that liposomes containing entrapped PSC have potential to be used as an alternative to tetanus toxoid–PSC conjugate vaccine.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS vii

RESUMO viii

ABSTRACT ix

1. INTRODUÇÃO 2

1.1. MICROBIOLOGIA 2
1.2. EPIDEMIOLOGIA 5
1.3. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS 8
1.4. RESPOSTA IMUNOLÓGICA A *N. MENINGITIDIS* 9
1.5. CONJUGAÇÃO 14
1.6. IMUNOGENICIDADE DO CONJUGADO 16
1.6.1. Tamanho da cadeia do polissacarídeo conjugado *17*
1.6.2. Natureza da proteína utilizada como carregador *17*
1.6.3. Proporção polissacarídeo/proteína *19*
1.6.4. Química de conjugação *19*
1.6.5. Presença de molécula espaçadora *20*
1.7. LIPOSSOMOS 20
1.8. VACINAS ANTIMENINGOCÓCICAS ATUAIS 22

2. OBJETIVOS 26

3. MATERIAIS E MÉTODOS 27

3.1. OBTENÇÃO DO CONJUGADO POLISSACARÍDEO C/TOXÓIDE TETÂNICO 27
3.1.1. Obtenção do polissacarídeo C *27*
3.1.2. Obtenção do toxóide tetânico *27*
3.1.3. Reação de conjugação *27*
3.1.4. Caracterização química dos conjugados *29*
3.1.4.1. Dosagem de polissacarídeo 30
3.1.4.2. Dosagem de proteína 30
3.1.4.3. Dosagem de ADH 31
3.2. OBTENÇÃO DOS LIPOSSOMOS COM POLISSACARÍDEO C INCORPORADO 32
3.2.1. Caracterização química dos lipossomos *32*
3.3. ESQUEMA DE IMUNIZAÇÃO 33
3.4. DETERMINAÇÃO DE ANTICORPOS IGG E IGM ANTI-POLISSACARÍDEO C 34

4. RESULTADOS 36

4.1. CARACTERIZAÇÃO DO CONJUGADO 36
4.2. CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMOS 38
4.3. DETERMINAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-POLISSACARÍDEO C 39

5. DISCUSSÃO 41

6. CONCLUSÕES 50

7. REFERÊNCIAS 51

1. INTRODUÇÃO

A doença meningocócica, cujo agente etiológico é o diplococo aeróbio *Neisseria meningitidis*, continua sendo uma das infecções mais temidas devido à sua tendência a causar surtos e epidemias, constituindo assim um sério problema de saúde pública mundial. No Brasil, são notificados cerca de 5.000 casos da doença por ano segundo o Centro de Vigilância Epidemiológica, que também informa uma taxa de mortalidade de aproximadamente 20%. A mortalidade decorrente de septicemia meningocócica pode alcançar de 20% a 50% (Morley & Pollard, 2002). Em níveis endêmicos, o pico de incidência da doença ocorre em crianças entre 6 meses e um ano de idade. A imunização contra o diplococo *Neisseria meningitidis* é provavelmente a única medida que pode reduzir a morbidade e mortalidade da doença, e nesse sentido o desenvolvimento de novas vacinas com eficácia elevada contra os diversos sorogrupos pode ter efeito considerável sobre a epidemiologia da doença meningocócica.

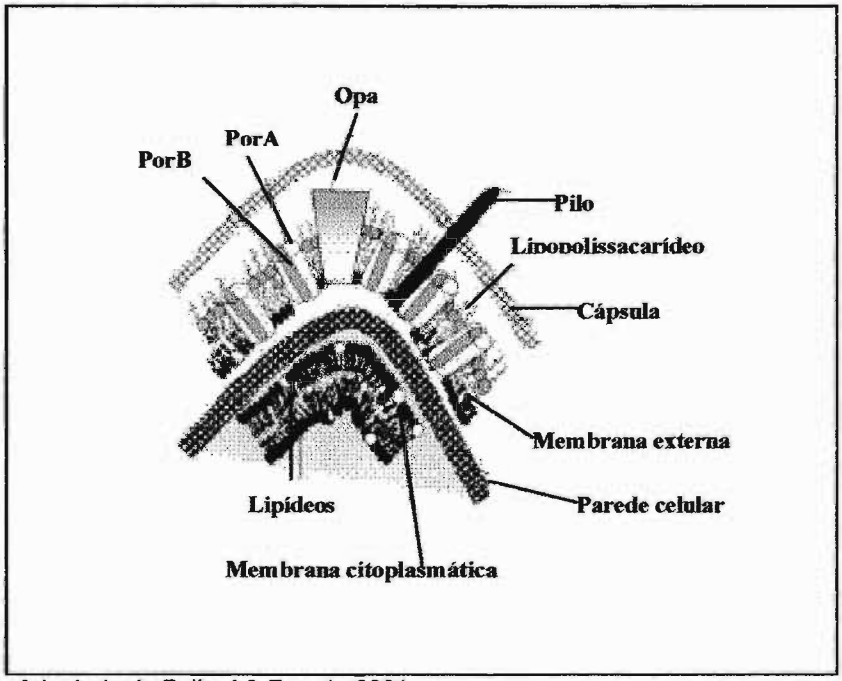
1.1. Microbiologia

N. meningitidis é um diplococo gram-negativo encapsulado cuja presença na nasofaringe humana ocorre em 10% dos adultos, mas que raramente coloniza as vias respiratórias de crianças saudáveis (Pollard & Frasch, 2001). A contaminação entre indivíduos exige contato próximo e a

colonização resulta da exposição ao aerosol de secreções nasofaríngicas de indivíduos portadores.

O meningococo *N. meningitidis* possui uma membrana citoplasmática e uma membrana externa separadas por uma parede celular de peptideoglicano (vide **Figura 1** a seguir).

Figura 1 – Estruturas da superfície celular de *N. meningitidis*.



Adaptado de Pollard & Frasch, 2001.

A membrana externa está circundada por uma cápsula essencial para patogenicidade, visto que a mesma confere resistência à fagocitose e à lise celular mediada por complemento (Vogel & Frosch, 1999; Jarvis, 1995). Esta cápsula é constituída de polissacarídeos aniônicos de alto peso molecular, cuja estrutura é a base para a classificação fenotípica da bactéria em

sorogrupos. O polissacarídeo do sorogrupo C (PSC) é composto por monômeros de ácido siálico, sendo imunogênico quando apresenta peso molecular acima de 100 kDa (Ala'Aldeen, 1996). Cepas isoladas de pacientes com doença meningocócica geralmente se mostram capsuladas, indicando a importância dessa estrutura na virulência da bactéria. Além disso, a membrana externa contém várias estruturas protéicas que capacitam o microrganismo a interagir e aderir a células do hospedeiro. Estas estruturas da membrana externa agem também como proteínas de transporte, permitindo o controle do ambiente intracelular e juntamente com o polissacarídeo capsular, formam os principais antígenos de superfície do meningococo. A membrana externa possui também lipopolissacarídeo (endotoxina) que colabora na resistência sérica (Vogel & Frosch, 1999) e está envolvido na patogênese da doença meningocócica. Várias lipoproteínas funcionalmente importantes (por exemplo, LbpB e TbpB) (Prinz e col., 1999; Petterson e col., 1998) estão fracamente ancoradas à superfície externa da membrana externa. Os antígenos de superfície do meningococo são altamente variáveis, com a variação provavelmente determinada por fatores ambientais e do hospedeiro (Achtman, 1997; Bart e col., 1999; Froholm e col., 2000; Jelfs e col., 2000; Linz e col., 2000; Rokbi e col., 2000), criando diferentes variações antigênicas.

Tradicionalmente, os meningococos têm sido classificados utilizando métodos sorológicos baseados na antigenicidade das estruturas de superfície. O organismo pode ser classificado em um sorogrupo dependendo de qual das 12 cápsulas de polissacarídeo antigenicamente e quimicamente distintas ele

expressa (A, B, C, H, I, K, L, W135, X, Y, Z e 29E) (Jennings & Pon, 1997). Virtualmente, todos os isolados de doenças pertencem a cinco sorogrupos (A, B, C, W135 e Y). A classificação adicional dos meningococos depende das diferenças antigênicas das proteínas de membrana externa PorB (sorotipo) e PorA (subtipo) (Frasch e col., 1985).

1.2. Epidemiologia

Os sorogrupos A, B e C de *N. meningitidis* são responsáveis por mais de 90% dos casos de doença meningocócica em todo o mundo. Na África, os meningococos do sorogrupo A são responsáveis pela maioria dos casos da doença, enquanto o sorogrupo B predomina nos casos da doença nos países desenvolvidos (Jennings & Pon, 1997; Zollinger, 1997). No Brasil, atualmente, a maioria dos casos notificados é causada por meningococos dos sorogrupos B e C (dados da Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz).

Em 1906, foram observados os primeiros casos de doença meningocócica no Brasil. A primeira grande epidemia da doença causada pela *N. meningitidis* do sorogrupo A foi relatada entre 1945 e 1951 (Milagres & Melles, 1993).

A partir da década de 70, ocorreram duas grandes epidemias em São Paulo, atingindo coeficientes de 100 a 200 casos/100.000 habitantes. A primeira epidemia foi causada por *N. meningitidis* do sorogrupo C e a segunda, pelo sorogrupo A. Ambas epidemias foram controladas com sucesso com

vacinas de polissacarídeo produzidas pelo Instituto Mérieux (Taunay e col., 1974).

Foram descritas epidemias causadas pela *N. meningitidis* B em vários Estados do país entre os anos de 1988 a 1992, motivando o uso da vacina cubana VA-MENGOC-BC® em campanhas de vacinação em massa (Moraes e col., 1992). Esta vacina, no entanto, não apresentou eficácia satisfatória, sendo que crianças vacinadas apresentaram títulos de anticorpo sérico semelhantes aos de crianças não-vacinadas (Carbonare e col., 1995).

No ano de 1988, 90% dos casos de doença meningocócica foram referentes ao sorogrupo B, mas a partir de 1990, o sorogrupo C passou a ser prevalente em mais de 40% dos casos de DM relatados. A partir deste ano, esse quadro se manteve pelo menos até o fim da década de 90, apresentando morbidade superior a 5 casos/100.000 habitantes na Região da Grande São Paulo e no Município do Rio de Janeiro (Fukasawa, 2000). Infelizmente, inexiste uma fonte de dados epidemiológicos da doença meningocócica atualizados em nível nacional.

Todos os países apresentam problemas com a doença meningocócica, cujo pico de incidência atinge crianças com menos de cinco anos de idade. O padrão e freqüência da doença variam amplamente entre as diferentes regiões do mundo. Em países de clima temperado, o padrão usual é de doença endêmica com incidência anual entre 1 e 10 por 100.000 habitantes (Rosenstein e col., 1999; Connoly & Noah, 1999). Estes países geralmente apresentam sazonalidade, com a maioria dos casos ocorrendo durante o

inverno (Ramsay e col., 1997). Períodos hiper-endêmicos, com incidência de até 20 casos por 100.000 habitantes, podem ocorrer com a expansão de novos clones virulentos na população não-imune (Martin e col., 1998; Krizova & Musilek, 1995; Whalen e col., 1995) ou em populações específicas com suscetibilidade aumentada devido a más condições de higiene (Baker e col., 2000) ou influências genéticas (Bremner e col., 1999). Na maioria das nações industrializadas, os agentes etiológicos predominantes são do sorogrupo B seguidos de perto pelo sorogrupo C, sendo raros os casos de epidemia (Connoly & Noah, 1999; Jefferies e col., 1999; Kaczmarski, 1997; Hussey e col., 1997).

Surtos da doença são particularmente associados a certos clones de meningococo C, sendo reconhecidos por uma taxa aumentada de doença numa comunidade discreta (Rosenstein e col., 1999). Isto contrasta acentuadamente com o padrão observado em alguns países em desenvolvimento, especialmente no "polígono da meningite" na África Sub-saariana (Morley & Pollard, 2002). O polígono da meningite se estende de Gâmbia no oeste a Etiópia no leste, uma área caracterizada por um elevado índice pluviométrico. Epidemias de doença meningocócica sorogrupo A ocorrem nesta região em ciclos de 5-10 anos e quase exclusivamente na estação seca (Morley & Pollard, 2002).

1.3. Características clínicas

Considerando que a exposição a *Neisseria meningitidis* ocorre normalmente através de gotículas e que no mais das vezes isto resulta na presença assintomática do microrganismo na nasofaringe, a prevalência de portadores é normalmente avaliada por cultura de secreções da nasofaringe, embora alguns autores, utilizando técnicas de imunofluorescência, sugiram que a técnica de cultura do meningococo subestima sua presença (Sim e col., 2000).

Aproximadamente 10% dos adultos e até 30% dos adolescentes apresentam culturas nasofaríngicas positivas, sendo esses valores bem menores em lactentes, os quais são portadores mais provavelmente de *Neisseria lactamica* - um organismo geneticamente próximo, mas não-patogênico. Estes indivíduos podem adquirir imunidade contra meningococo por meio da exposição repetida a antígenos semelhantes presentes em *N. lactamica* e outras bactérias (Coen e col., 2000; Simmons e col., 2000).

Não se sabe ainda o motivo da progressão do estado de latência para doença invasiva em alguns indivíduos, mas provavelmente isto depende das características do hospedeiro e do organismo infectante. As manifestações clínicas da doença meningocócica são diversas e variam do portador assintomático à meningococemia fulminante, a qual pode progredir muito rapidamente, resultando freqüentemente em morte após 12-48 horas do início

dos sintomas. A doença meningocócica sintomática também se manifesta na forma de meningite com febre e erupção purpúrica características. A maioria dos casos apresenta um quadro septicêmico com ou sem meningite e uma proporção menor - 30% a 50% - apresenta apenas meningite.

As crianças estão sob risco maior de contrair doença meningocócica, embora os lactentes com menos de 6 meses de idade pareçam possuir alguma proteção contra a doença, presumivelmente anticorpos herdados da mãe. A maior incidência, portanto, ocorre entre crianças com 6 a 24 meses de idade, com declínio da incidência com o aumento da idade até a adolescência (Rosenstein e col., 1999; Campagne e col., 1999), quando pode haver um pequeno pico secundário (Kaczmarski, 1997). Os fatores de risco da doença incluem idade (Rosenstein e col., 1999; Kaczmarski, 1997), superpopulação (Baker e col., 2000; Moodley e col., 1999), más condições de higiene e migração de populações (Neal e col., 1999; Berild e col., 1980). Indivíduos com deficiência de complemento (Nielsen e col., 1989; Fijen e col., 1999), hipogamaglobulinemia (Salit, 1981) e hiposplenismo (Locker e col., 1995) estão também sob risco aumentado.

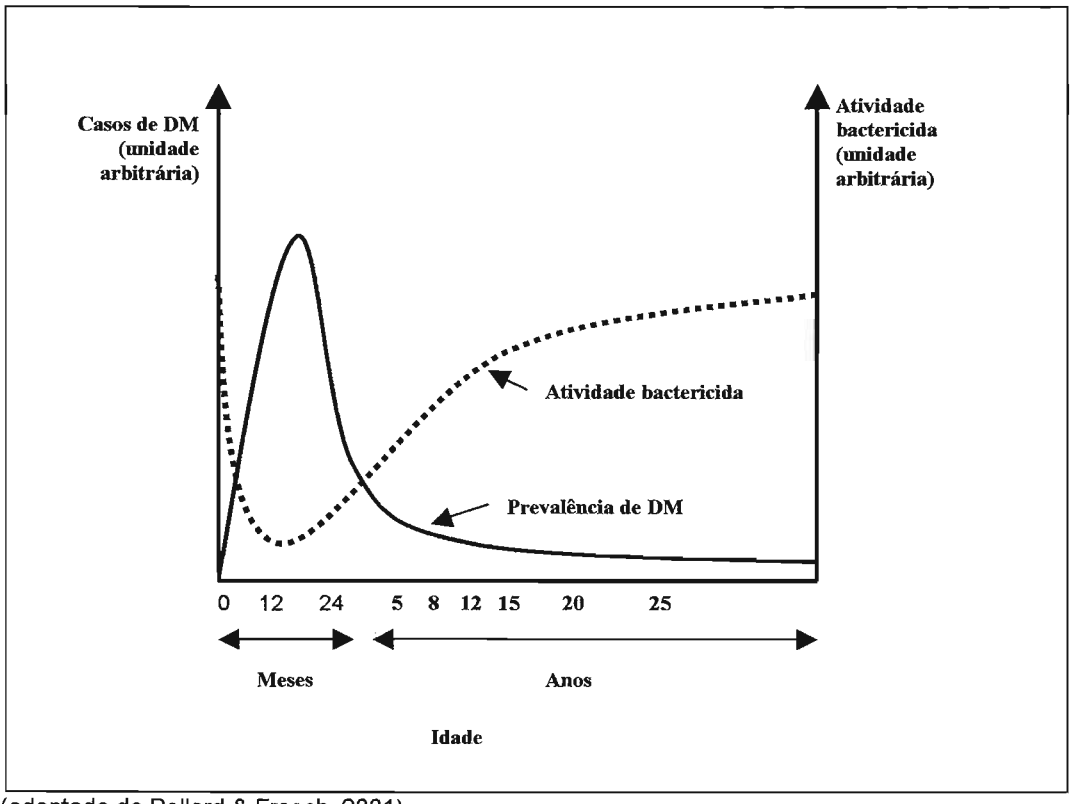
1.4. Resposta imunológica a *N. meningitidis*

Em 1912, Matsunami e Kolmer (Pollard & Frasch, 2001) mostraram que a atividade bactericida do sangue de vários animais de laboratório apresentava relação com a resistência destes animais à infecção por *N. meningitidis.* Eles

mostraram também que a atividade bactericida do soro de crianças era menor do que a atividade do soro adulto, fornecendo assim a primeira evidência de que a imunidade contra os meningococos era dependente da idade.

O papel dos anticorpos na proteção contra a doença meningocócica foi demonstrado indiretamente em função da relação direta entre o título de anticorpos antimeningocócicos ou atividade bactericida do soro e a incidência de doença meningocócica de acordo com a idade (vide **Figura 2** a seguir) (Pollard & Frasch, 2001).

Figura 2 – Prevalência de doença meningocócica (DM) em relação à atividade bactericida do soro.



(adaptado de Pollard & Frasch, 2001)

A importância dos anticorpos foi também demonstrada por meio da eficácia da terapia com soro antes do advento dos antibióticos. A taxa de mortalidade de doença meningocócica não-tratada estava entre 60% e 80%. A introdução da terapia com soro de cavalo logo após 1900 reduziu a mortalidade para 13-30% em pacientes tratados, dependendo do estágio da doença em que a terapia era aplicada (Pollard & Frasch, 2001).

Uma outra evidência da importância dos anticorpos na imunidade contra meningococos vem de indivíduos com hipogamaglobulinemia que apresentam risco aumentado de infecção meningocócica invasiva (Pollard & Frasch, 2001).

O sistema complemento também é considerado como fundamental para proteção contra doença meningocócica. Estudos mostram que metade dos indivíduos com deficiência de componentes do sistema complemento (C5-C9) desenvolve doença meningocócica e metade destes apresenta recidiva. É importante salientar que há uma deficiência destes componentes na infância, o que pode explicar em parte a maior suscetibilidade à doença meningocócica neste grupo etário (Pollard & Frasch, 2001).

A resposta imunológica celular a antígenos meningocócicos é extremamente importante no contexto da indução de anticorpos protetores. No entanto, a cápsula de polissacarídeo dos meningococos é considerada um antígeno T-independente, visto que células T auxiliares não são consideradas necessárias à indução de anticorpos contra antígenos sacarídicos (Pollard & Frasch, 2001). Esta característica é parcialmente atribuída à ausência, em macrófagos, de enzimas necessárias à clivagem de polissacarídeos,

resultando em fraca ligação de seus epítopos às glicoproteínas do complexo de histocompatibilidade principal (CHP) e reduzida ativação de células T (Jennings & Pon, 1997; Milagres & Melles, 1993; Harding e col., 1991). De fato, sabe-se que a vacinação com polissacarídeo do grupo A não apresenta em humanos efeito proliferativo sobre linfócitos (Pollard & Frasch, 2001).

Além disso, foi sugerido que após ligação cruzada a imunoglobulinas de superfície, os polissacarídeos induzem a diferenciação de células B polissacarídeo-específicas em células plasmáticas de meia-vida curta produtoras de anticorpo. Na ausência de células T, os sinais de proliferação e diferenciação são mediados por citocinas produzidas por macrófagos, monócitos e células epiteliais (Jennings & Pon, 1997). Desse modo, a imunização com polissacarídeo não permite a geração de células de memória duradouras - pois não há sinal proveniente de célula T - e portanto resulta numa depleção das células B de memória polissacarídeo-específicas (Pollard & Frasch, 2001).

A ontogenia da capacidade de desenvolver resposta imunológica aos antígenos polissacárides ocorre tarde (1 a 4 anos em humanos). Um estudo recente demonstrou que as células B específicas são ativadas através de uma co-ligação entre os epítopos e os fragmentos C3d (sistema complemento) presentes no polissacarídeo aos receptores de membrana e ao receptor de complemento 2 (CR2 ou CD21) das células B, respectivamente. As crianças neonatas apresentam células B com baixa expressão de moléculas de CD21,

resultando na baixa imunidade observada frente aos antígenos polissacárides (Rijkers e col., 1998).

Em consequência da natureza timo-independente dos antígenos de polissacarídeo, são induzidos predominantemente anticorpos IgM e uma segunda dose desse antígeno não resulta em reações do tipo "reforço", caracterizando ausência de memória imunológica. Além disso, os anticorpos formados são de curta duração e baixa afinidade (Jennings & Pon, 1997; Milagres & Melles, 1993; Stein, 1992). Por outro lado, a resposta imunológica às proteínas é timo-dependente, diferentemente da natureza timo-independente dos polissacarídeos. Além disso, são geradas células T e B de memória, as quais induzem uma rápida resposta imunológica do organismo após reestimulação com o mesmo antígeno. Como a capacidade de desenvolver imunidade aos antígenos timo-dependentes ocorre cedo na ontogenia (2 meses), as proteínas são escolhidas para a constituição de vacinas de uso pediátrico (Jennings & Pon, 1997).

Com a finalidade de reverter as desvantagens imunológicas dos antígenos de polissacarídeos, esses têm sido ligados covalentemente a proteínas carregadoras timo-dependentes. O polissacarídeo do glicoconjugado interage com receptores de superfície presentes em células B e o complexo formado é endocitado, permitindo o processamento do componente protéico e reexpressão dos peptídeos em associação com as moléculas de CHP de classe II, levando à ativação de células T auxiliares (TH). A resposta imunológica aos polissacarídeos conjugados apresentam características

semelhantes à resposta induzida por um antígeno timo-dependente. Há expansão clonal e seleção de células TH específicas e de células B polissacarídeo e proteína-específicas após imunização primária com o gliconjugado, resultando na diferenciação em células secretoras de anticorpos e células TH e B de memória. Ocorre também aumento da afinidade e produção de anticorpos de vários isotipos. Uma reexposição ao polissacarídeo conjugado induz uma rápida resposta imunológica através das ações sinérgicas das células TH de memória proteína-específicas e das células B de memória polissacarídeo-específicas, resultando em rápida produção e secreção de anticorpos, predominantemente do isotipo IgG (Jennings & Pon, 1997).

1.5. Conjugação

Recentemente, com a apresentação dos resultados obtidos em estudos clínicos em crianças entre 15 a 24 meses que receberam vacina de polissacarídeo C conjugado a CRM_{197}, um mutante não-tóxico da toxina diftérica, foi constatado que as vacinas constituídas somente de polissacarídeos induziam um estado hiporresponsivo a esses antígenos, o qual persistiu por pelo menos 12 meses (Leach e col., 1997; MacDonald e col., 1998). Existem estudos mostrando que este estado hiporresponsivo ao polissacarídeo C poderia também ser estendido a adolescentes e adultos, persistindo por 1 a 4 anos (Granoff e col., 1998; Leach e col., 1997). Assim, o

emprego de vacinas de polissacarídeo livre para uso em crianças menores de 2 anos não tem sido recomendado, reforçando a importância do desenvolvimento de tecnologias de conjugação para obtenção de vacinas mais eficazes (Cadoz, 1998).

Sabe-se que os polissacarídeos quando conjugados, ou seja, quando ligados covalentemente a proteínas T-dependentes, tornam-se imunógenos eficientes em crianças, de modo que essa estratégia vem sendo empregada nos últimos quinze anos para o desenvolvimento de vacinas contra bactérias encapsuladas. Há que se considerar o sucesso desta tecnologia na produção da vacina contra *Haemophilus influenzae* tipo b, a qual praticamente erradicou a doença em países onde foi utilizada.

O processo de conjugação entre polissacarídeos e proteínas é constituído de diversas etapas e reações polifuncionais e polidispersas. O polissacarídeo é um polímero de alto peso molecular e cada unidade constitutiva de sua estrutura química apresenta pelo menos um grupo funcional (hidroxilas ou carboxilas). Além disso, cada molécula de proteína apresenta grupos carboxílico e amínico livres para a conjugação com o polissacarídeo.

Desta forma, vários parâmetros devem ser controlados para garantir reprodutibilidade do processo a fim de obter conjugados com características físico-químicas definidas. Tais parâmetros envolvem: (i) razão polissacarídeo/proteína; (ii) grau de derivatização do polissacarídeo; (iii) tempo e temperatura de reação; (iv) controle do pH das reações e o (v) método de

conjugação a ser empregado (Peeters e col., 1996; Kniskern & Marburg, 1994).

O método de conjugação utilizado neste trabalho consistiu da utilização de um agente espaçador homobifuncional contendo grupos hidrazida nas duas extremidades, a diidrazida do ácido adípico (ADH), com o objetivo de conjugar o polissacarídeo de *N. meningitidis* sorogrupo C ao toxóide tetânico (TT) (Staros e col., 1986). Em uma primeira etapa, os grupos carboxílicos do polissacarídeo são ativados com EDAC (etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida), formando um intermediário que reage com os grupos amínicos do espaçador ADH . A seguir, o polissacarídeo derivatizado reage com as moléculas de proteínas previamente ativadas com EDAC para a formação do conjugado (Bartoloni e col., 1995; Kniskern & Marburg, 1994).

1.6. Imunogenicidade do conjugado

O processo de conjugação de um polissacarídeo a uma proteína com o objetivo de obter uma vacina imunologicamente eficaz depende de vários fatores, os quais incluem (i) tamanho da cadeia do polissacarídeo conjugado, (ii) natureza da proteína utilizada como carregador, (iii) proporção polissacarídeo/proteína, (iv) a química de conjugação e (v) presença de molécula espaçadora.

1.6.1. Tamanho da cadeia do polissacarídeo conjugado

Jennings e col. (1992) observaram que o tamanho ideal do fragmento de polissacarídeo a ser acoplado à proteína carregadora era um oligossacarídeo consistindo de 14 unidades repetidas de sacarídeo. Eles utilizaram polissacarídeo de estreptococo grupo B tipo III conjugado ao toxóide tetânico e injetaram a vacina em coelhos, observando que quanto menor o oligossarídeo, menor a estabilização conformacional do epítodo. Observaram também que um comprimento maior do oligossacarído poderia resultar numa maior independência de células T para geração de resposta imunológica por parte da vacina.

Estudos mostram que na verdade o conjugado deve apresentar uma cadeia sacarídica com um número mínimo de unidades repetitivas não-modificadas em sequência a fim de não afetar sua imunogenicidade. Todos esses estudos indicam que os conjugados são capazes de induzir anticorpos com atividade bactericida somente quando os epítopos da forma nativa do polissacarídeo são preservados (Bartoloni e col., 1995; Jennings, 1992; Devi e col., 1991; Anderson e col., 1986).

1.6.2. Natureza da proteína utilizada como carregador

As proteínas mais utilizadas nos processos de conjugação são: toxóides tetânico e diftérico, toxóide diftérico detoxificado por mutação (CRM197) e as proteínas de vesículas de membrana externa (OMV) de *N. meningitidis* B

(Donnelly & Liu, 1994). Os toxóides tetânico e diftérico apresentam a grande vantagem de já serem utilizados na vacina tríplice e portanto já demonstraram ser imunógenos eficientes e seguros aprovados para uso humano. Entretanto, esses toxóides apresentam algumas desvantagens, principalmente relacionadas ao seus processos de detoxificação. O processo de detoxificação química destas toxinas bacterianas produz variações lote a lote e, portanto, as propriedades físico-químicas dos toxóides resultantes podem apresentar inúmeras variações a cada lote, comprometendo a reprodutibilidade do processo de conjugação (Peeters e col., 1996).

Além disso, pode-se empregar como carregadores, proteínas derivadas da bactéria homóloga da qual foi extraído o polissacarídeo com o objetivo de obter uma ação sinérgica entre os anticorpos anti-proteína e anti-polissacarídeo contra o microrganismo alvo. Tais proteínas incluem: as proteínas de vesículas de membrana externa (OMV) e proteínas recombinantes de classe 3 de *N. meningitidis* B e pneumolisina, uma toxina de *Streptococcus pneumoniae* (Fusco e col., 1998; Michon e col., 1998; Donnelly & Liu, 1994).

A toxina tetânica, uma neurotoxina potente, é sintetizada intracelularmente por *Clostridium tetani* como um polipeptídeo de 150.500 Da. O toxóide tetânico, utilizado neste trabalho como proteína carregadora, é obtido por detoxificação da toxina tetânica com formaldeído.

1.6.3. Proporção polissacarídeo/proteína

A capacidade de induzir resposta imunológica de um conjugado depende da proporção entre polissacarídeo e proteína. Ocorre diminuição da resposta imunológica contra o conjugado quando há presença de polissacarídeo livre na formulação da vacina conjugada. Além disso, o tempo de armazenagem de polissacarídeos conjugados pode resultar em despolimerização ou desacoplamento da proteína carregadora, afetando a razão polissacarídeo/proteína.

A proporção polissacarídeo/proteína reflete a estrutura química do conjugado. Um alto valor da razão polissacarídeo/proteína pode indicar que uma grande quantidade de sacarídeos estejam ligados às proteínas, escondendo do sistema imunológico epítopos essenciais do carregador, dificultando assim o reconhecimento do conjugado como um antígeno T-dependente (Peeters e col., 1996).

1.6.4. Química de conjugação

O método de conjugação a ser escolhido depende da estrutura química do conjugado que se pretende obter e da disponibilidade dos grupos funcionais presentes nos polissacarídeos e nas proteínas. Os grupos funcionais dos polissacarídeos compreendem as hidroxilas ou as carboxilas, sendo os grupos funcionais das proteínas, as ε-aminas da lisina ou os grupos carboxílicos dos ácidos áspartico e glutâmico (Kniskern & Marburg, 1994).

1.6.5. Presença de molécula espaçadora

O emprego de uma molécula espaçadora aumenta a eficiência do processo de conjugação e impede o ocultamento estérico dos epítopos do polissacarídeo pela presença de um grupamento volumoso, ou seja, a proteína carregadora (Peeters e col., 1996).

1.7. Lipossomos

Apesar do caráter T-dependente da resposta imunológica aos conjugados polissacarídeo-proteína, e sua comprovada eficácia na proteção contra doença meningocócica, a tecnologia de conjugação apresenta baixo rendimento, em termos de polissacarídeo, e custos elevados. Assim, existe uma demanda por métodos alternativos economicamente viáveis que também aumentem a memória imunológica de antígenos T-independentes.

Os lipossomos são vesículas constituídas de uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas alternadas com espaços aquosos (Gregoriadis, 1994). Os componentes lipídicos são normalmente fosfolipídeos ou outros anfifílicos, como surfactantes não-iônicos, normalmente suplementados com colesterol e outros lipídeos carregados. As bicamadas podem estar em um estado "fluido" ou "rígido" a temperatura ambiente (Ta), dependendo da natureza do anfifílico. O estado fluido é obtido com anfifílicos que apresentam temperatura de

transição gel-líquido cristalino (Tc) – a temperatura em que ocorre fusão das cadeias acil – menor que a Ta, enquanto que o estado rígido exige anfifílicos com uma Tc maior que a Ta.

Os lipossomos têm sido utilizados como sistema de liberação para uma grande variedade de agentes farmacologicamente ativos devido à sua capacidade de reter água e moléculas solúveis em lipídeo nas fases aquosa e lipídica, respectivamente. A possibilidade do uso de lipossomos como adjuvantes para aumentar a resposta imunológica a antígenos foi primeiro estabelecida em 1974, quando então foi observada, após injeção em camundongos, uma forte resposta humoral ao toxóide diftérico encapsulado em lipossomo. Diferentemente de outros adjuvantes, não foram observados granulomas ou reações de hipersensibilidade (Gregoriadis, 1994).

Nos últimos 10 anos, alguns artigos relataram o uso de lipossomos como adjuvantes para vários antígenos (Burgeot e col., 2001). Os lipossomos induzem níveis muito elevados de anticorpos, superando a capacidade imunoestimulatória de muitos outros adjuvantes. Além disso, foi investigada a capacidade dos lipossomos de agir como carregadores de epítopos de células T e B por meio da incorporação não-covalente dos antígenos na estrutura lipossômica, eliminando assim a necessidade de uma proteína carregadora (Gregoriadis, 1994).

Foi proposto que o efeito adjuvante dos lipossomos ocorre em função da formação de depósitos no local de injeção, captura seletiva de antígenos lipossômicos nos linfonodos locais e apresentação mais eficiente de antígeno

devido à captura massiva de antígenos por células apresentadoras de antígeno (Cox & Couter, 1997; Gregoriadis, 1997; Alving, 1995).

1.8. Vacinas antimeningocócicas atuais

Várias companhias farmacêuticas desenvolveram vacinas glicoconjugadas sorogrupo C, sendo que o desenvolvimento de vacinas contra outros sorogrupos (A, B, Y e W135) está bem avançado (vide **Tabela 1** a seguir). As vacinas atualmente licenciadas contêm toxóide tetânico ou CRM_{197} como proteínas carregadoras, as quais também têm sido utilizadas em vacinas contra *H. influenzae* b. Estas proteínas carregadoras apresentam imunogenicidade equivalente e segurança comprovada (Decker e col., 1992).

Tabela 1 – Vacinas meningocócicas glicoconjugadas em uso ou em estudo*

Fabricante	Polissacarídeo	Carregador	Estudo Clínico	Licença
Baxter	C	Toxóide tetânico	Fase III finalizada	Reino Unido
Baxter	B	PorB recombinante	Fase I em andamento	-
Chiron	C	CRM_{197}	Fase III finalizada	Reino Unido, Irlanda, União Européia, Espanha e Canadá
Chiron	A/Y/W135	Dado não-disponível	Dado não-disponível	Dado não-disponível
Wyeth	C	CRM_{197}	Fase III finalizada	Reino Unido, Irlanda, Portugal, Bélgica, Hungria, Grécia

				Luxemburgo, Alemanha e Argentina
Wyeth	Sacarídeos do cerne	CRM e toxóide tetânico	Dado não-disponível	Dado não-disponível
Aventis Pasteur	A/C/Y/W135	Dado não-disponível	Fase III em andamento	Dado não-disponível

Fonte: Morley & Pollard, 2002.

* Estão ausentes desta tabela as vacinas cubana VA-MENGOC-BC® e norueguesa Folkehelsa® (vide texto).

No Reino Unido, as vacinas conjugadas sorogrupo C foram adotadas no programa de vacinação infantil com base apenas em estudos de imunogenicidade (Richmond e col., 2001; Borrow e col., 2001). Informações preliminares das autoridade do Reino Unido mostram um declínio bastante acentuado da doença sorogrupo C em todas as faixas de idade (Morley & Pollard, 2002).

É difícil antecipar o efeito de uma campanha nacional de vacinação que elimine eficazmente apenas um entre vários sorogrupos meningocócicos prevalentes. A vacina meningocócica conjugada C não oferece nenhuma proteção contra os outros sorogrupos, em especial o sorogrupo B, um dos mais prevalentes no Brasil. Considerando que os meningococos apresentam grande plasticidade gênica em face de seleção imunológica, permitindo a troca de genes de antígenos (incluindo antígenos sorogrupo-específicos) (Linz e col., 2000; Jolley e col., 2000; Kriz e col., 1999), é possível que a pressão imunológica gerada por vacinas possa forçar os clones sorogrupo-específicos a desenvolver outras cápsulas com antigenicidade diferente. Esta possibilidade seria minimizada através da vacinação contra outros sorogrupos. Desse modo,

a ausência de uma vacina eficaz contra o sorogrupo B pode resultar em aumento de clones patogênicos deste sorogrupo (Maiden & Spratt, 1999).

O processo de conjugação parece ser ineficaz no desenvolvimento de uma vacina contra o sorogrupo B, embora haja a conversão do polissacarídeo B num antígeno T-dependente, aumento de anticorpos bactericidas e produção de anticorpos IgG (Devi e col., 1997; Bartoloni e col., 1995). No entanto, esta resposta é direcionada contra um epítopo sintético originado no processo de conjugação (Bartoloni e col. 1995). Essa baixa imunogenicidade é também atribuída à semelhança antigênica do polissacarídeo B com glicolipídeos e glicoproteínas presentes em células humanas, à sensibilidade a neuraminidases do organismo humano e à instabilidade tridimensional da molécula (Goldblatt, 1998; Jennings & Pon, 1997; Milagres & Melles, 1993).

Diferentemente da doença meningocócica sorogrupos A e C, os anticorpos bactericidas gerados pela doença B são direcionados contra antígenos não-capsulares (Morley & Pollard, 2002), os quais consistem principalmente de proteínas da membrana externa e lipopolissacarídeo, considerados hoje fortes candidatos a antígenos de uma futura vacina. Desta forma, todas as estratégias para o desenvolvimento de vacinas contra o meningococo B estão direcionadas para as proteínas de membrana externa (OMPs) ou vesículas de membrana externa (OMVs).

Vários estudos de eficácia foram realizados utilizando vacinas constituídas de OMVs. As duas vacinas mais estudadas foram desenvolvidas nos anos 80 em resposta a surtos da doença em Cuba (VA-MENGOC-BC®) e

Noruega (Folkehelsa®) (Morley & Pollard, 2002). A vacina de OMV produzida pelo Instituto Finlay de Cuba - comercialmente conhecida como VA-MENGOC-BC® - é produzida a partir da cepa B:4:P1.19,15 complexada não-covalentemente ao polissacarídeo sorogrupo C (Morley & Pollard, 2002). Esta vacina foi utilizada numa campanha de vacinação em Cuba, o que resultou num acentuado declínio da incidência da doença meningocócica no país.

No entanto, essas vacinas têm demonstrado eficácia limitada entre os indivíduos vacinados. Essa limitação se deve, em parte, à grande variedade antigênica das proteínas de membrana externa (OMPs) que geram resposta imunológica sorosubtipo-específica ao meningococo. Como exemplo, a vacina cubana, a qual foi também empregada no controle das últimas epidemias em várias cidades brasileiras. Essa vacina apresentou eficácia de acordo com a faixa etária, sendo inferior a 30% em crianças menores de 2 anos. Esse baixo desempenho da vacina foi atribuído ao fato de que somente uma parcela da população vacinada entrou em contato com cepas de *N. meningitidis* B pertencentes à mesma classificação da cepa da qual foi extraída a vacina (Milagres e col., 1998). Assim, é importante desenvolver vacinas antimeningocócicas utilizando cepas e sorogrupos prevalentes no país.

2. OBJETIVOS

2.1. Obtenção de uma vacina conjugada de polissacarídeo capsular de *Neisseria meningitidis* sorogrupo C e toxóide tetânico;

2.2. Caracterização química dos conjugados polissacarídeo C/toxóide tetânico;

2.3. Caracterização química dos lipossomos obtidos por incorporação dos polissacarídeos C;

2.4. Comparação da imunogenicidade em camundongos dos conjugados polissacarídeo C/toxóide tetânico com polissacarídeo C encapsulado em lipossomos e polissacarídeo C livre.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Obtenção do conjugado polissacarídeo C/toxóide tetânico

3.1.1. Obtenção do polissacarídeo C

Foi utilizado um polissacarídeo capsular sorogrupo C extraído e purificado pelo laboratório segundo método descrito por Tanizaki e col. (1996) a partir da cepa IMC 2135 (C:2a:P1.5,2) de *Neisseria meningitidis* sorogrupo C proviniente do Instituto Adolfo Lutz.

3.1.2. Obtenção do toxóide tetânico

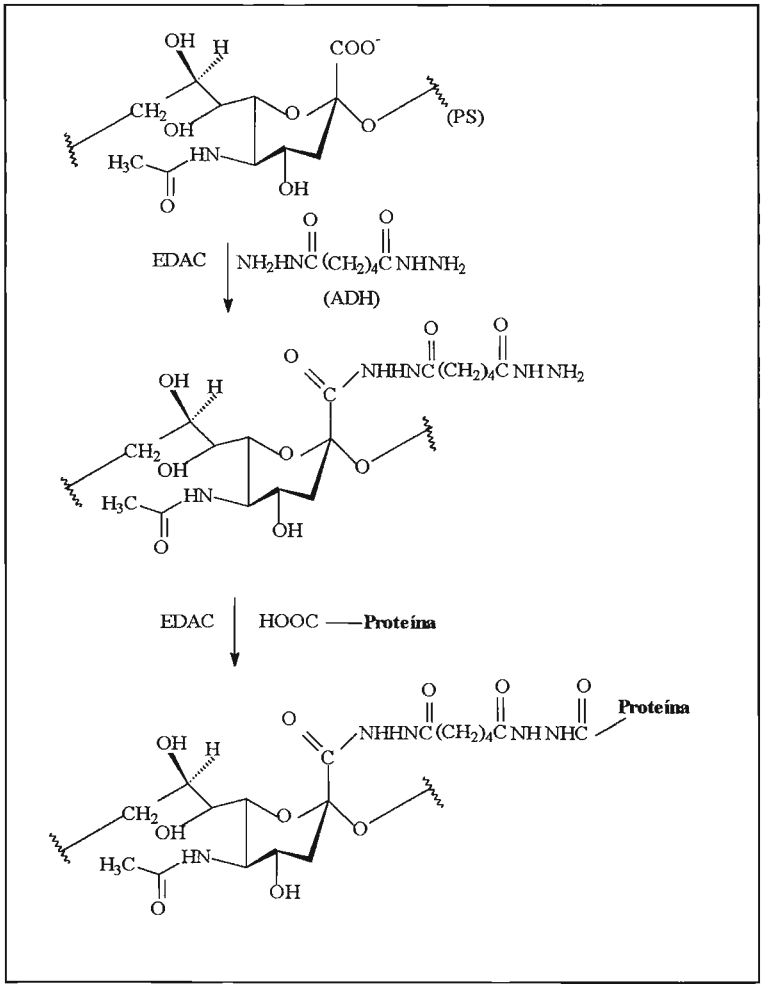
O toxóide tetânico foi obtido na Seção de Produção de Vacina Tríplice do Instituto Butantan. O mesmo foi dialisado, em seguida liofilisado e ressuspenso em NaCl 0,2 M na concentração final desejada.

3.1.3. Reação de conjugação

Os conjugados foram obtidos segundo metodologia descrita anteriormente (Fukasawa, 2000) (vide **Figura 3** na página 29). Neste ensaio, 0,5 ml de polissacarídeo (21,28 mg/ml dissolvidos em cloreto de sódio 0,2 M, pH 7,5) reagiu com EDAC (etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) e ADH (diidrazida do ácido adípico) em concentrações finais de 0,1 M e 0,5 M, respectivamente, em pH 7,0 por 3 horas a temperatura ambiente. Em seguida,

procedeu-se diálise a exaustão contra uma solução de NaCl 0,2 M contendo timerosal a 0,01% (v/v) em pernoite a 4-8°C. Após a diálise, foram misturados 0,5 ml do polissacarídeo derivatizado e 1 ml de toxóide tetânico (5 mg/ml) na presença de EDAC e ADH (0,1 M e 0,5 M, respectivamente), em pH 7,5 durante 3 horas a temperatura ambiente. O produto foi dialisado contra NaCl 0,2 M a exaustão. O produto da diálise foi liofilizado até secura. Em seguida, o mesmo foi ressuspenso num volume menor, ou seja, em 1 ml de NaCl 0,2 M. O resultado da conjugação foi monitorado através da análise das frações de cromatografia de exclusão (gel-filtração) utilizando uma coluna Sepharose 4B (Pharmacia) com NaCl 0,2 M como solvente e um fluxo de 0,5 ml/minuto com um volume de amostra de 1 ml. A conjugação foi indicada por um aumento progressivo de um pico de proteína na região do Vo, bem como pela presença concomitante de polissacarídeo na mesma fração.

Figura 3 – Processo de conjugação de polissacarídeo (PS) a proteína.



3.1.4. Caracterização química dos conjugados

A fim de realizar a caracterização química do conjugado e o cálculo de rendimento, foram reunidas as frações de gel-filtração correspondentes ao material de alto peso molecular, isto é, as frações correspondentes ao Vo da coluna, e que apresentavam concomitantemente proteína e polissacarídeo.

3.1.4.1. Dosagem de polissacarídeo

Para dosagem de polissacarídeo conjugado a proteína, foi utilizado o método do resorcinol adaptado por Fukasawa (2000) com algumas modificações. Neste ensaio, a amostra de conjugado foi diluída 10 vezes num volume final de 1,0 ml. Em seguida, foi adicionado 1,0 ml de reagente resorcinol preparado há menos de 4 horas (10 ml de resorcinol (2,0 g/ml), 0,25 ml de sulfato de cobre 0,1 M, 80 ml de ácido clorídrico fumegante, água q.s.p. 100 ml). A mistura foi aquecida em banho-maria por 15 minutos, após o que foram adicionados 2,5 ml de álcool isoamílico. Em seguida, a mistura foi mantida em gelo por 15 minutos e centrifugada a 4°C a 1000 rpm por 3 minutos. A fase orgânica sobrenadante foi recolhida e determinada sua absorbância a 580 nm.

Para construção da curva-padrão, foi utilizado ácido siálico na faixa de concentração de 10-100 μg/ml. A concentração das amostras foi calculada utilizando a curva-padrão, considerando o fator de diluição.

3.1.4.2. Dosagem de proteína

O teor de proteína do conjugado foi determinado pelo método descrito por Lowry e col. (1951) com algumas modificações. Neste ensaio, 1,0 ml de amostra foi incubado por 10 minutos à temperatura ambiente com 3,0 ml de um reagente constituído de tartarato de sódio 2,0% (p/v) e sulfato de cobre 1,0% (p/v) diluídos 1:100 em solução de carbonato de sódio 2,0% (p/v) e

hidróxido de sódio 0,1 M. A seguir, foram adicionados 300 μl de reagente Folin 1,0 N, deixando em respouso por 30 minutos à temperatura ambiente. A mistura foi transferida para cubetas de vidro e a absorbância foi lida em espectrofotômetro a 750 nm. A curva-padrão foi determinada utilizando albumina sérica bovina (Sigma) em concentrações variando entre 50 a 250 μg/ml. A concentração das amostras foi calculada através da curva-padrão, considerando-se o fator de diluição.

3.1.4.3. Dosagem de ADH

O teor de ADH presente nos conjugados foi determinado pelo método do ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS) descrito por Schneerson e col. (1982) com algumas modificações. Neste ensaio, foi adicionado 0,5 ml de amostra a 0,5 ml de uma solução saturada de borato de sódio e em seguida, foi adicionado 1,0 ml de uma solução de TNBS a 0,4% (p/v), incubando por 40 minutos à temperatura ambiente. A seguir, foi adicionado 1,5 ml de carbonato de sódio 0,1 M/bicarbonato de sódio 0,1 M. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 500 nm e a curva-padrão foi determinada utilizando ADH (Sigma) em concentrações variando entre 4 a 20 μg/ml. A concentração das amostras foi calculada por meio da curva-padrão, considerando-se o fator de diluição.

3.2. Obtenção dos lipossomos com polissacarídeo C incorporado

Os lipossomos foram fornecidos pelo Laboratório da Dra. Maria Helena Bueno da Costa do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan.

Resumidamente, os lipossomos unilamelares (0,1 μm) foram preparados por congelamento e descongelamento seguidos de extrusão seqüencial em filtro. A composição básica dos lipossomos foi fosfatidilcolina de soja (200 mg/ml), colesterol (25 mg/ml), D,L-α-tocoferol (1,2 mg/ml). Os lipídeos foram dissolvidos em diclorometano:metanol 1:1 e submetidos a evaporação rotatória a 40°C. O filme de lipídeo seco foi emulsificado com tampão MPB (fosfato (20 mM), manitol (295 mM), pH 7,2) contendo polissacarídeo C. Em seguida, a mistura foi submetida a 3 ciclos de congelamento-descongelamento, seguidos por 5 extrusões através de filtros Nucleopore (0,1 μm). Os lipossomos assim obtidos foram em seguida filtrados sob condições estéreis e armazenados a –20°C.

3.2.1. Caracterização química dos lipossomos

O teor de fosfato dos lipossomos foi determinado segundo método descrito por Rouser e col. (1970): uma amostra de 25 μl foi seca completamente a 120°C em um tubo de ensaio. Adicionou-se em seguida 0,4 ml de ácido perclórico 70%. A mistura permaneceu a 180°C por 1 hora. Após resfriamento das amostras, foi adicionado 1 ml de água destilada e 0,4 ml de molibdato de amônio 10 mmol/l. As misturas foram agitadas em vórtex.

Seguiram: adição de 0,4 ml de ácido ascórbico a 176 mmol/l, agitação vigorosa e aquecimento por 5 minutos a 80°C. A absorbância foi medida a 797 nm em espectrofotômetro.

Para avaliação da taxa de incorporação de polissacarídeo no lipossomo, 1 ml de solução de lipossomo foi submetido a centrifugação a 2000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido, e ao precipitado foi adicionado 1 ml de tampão MPB, após o que foi realizada outra centrifugação nas mesmas condições da anterior. Este ciclo foi repetido três vezes. Em seguida, foi determinada a concentração de polissacarídeo no precipitado e sobrenadante segundo método descrito na **seção 3.1.4.1**.

3.3. Esquema de imunização

Foram utilizados 3 grupos de 3 camundongos C3H/Hepas machos de 35 dias. Cada grupo recebeu 1 dose via subcutânea das seguintes preparações:

Grupo I: 50 μg de polissacarídeo C conjugado a toxóide tetânico dissolvidos em 0,1 ml de solução salina isotônica.

Grupo II: 50 μg de polissacarídeo C livre dissolvidos em 0,1 ml de solução salina isotônica.

Grupo III: 50 μg de polissacarídeo C incorporado em lipossomo dissolvidos em 0,1 ml de solução salina isotônica.

Foi administrada uma dose de 50 μg de PSC como reforço 45 dias após a primeira dose. A sangria dos animais foi realizada via plexo orbital 20 e 45 dias após a inoculação da primeira dose e 6 e 27 dias após a dose de reforço. Os soros obtidos de cada animal foram amazenados a –20ºC.

3.4. Determinação de anticorpos IgG e IgM anti-polissacarídeo C

Os anticorpos IgG e IgM anti-polissacarídeo C foram determinados por ELISA segundo método descrito por Fukasawa e col. (2000) com algumas modificações. Os títulos de anticorpo foram calculados tomando a diluição correspondente a 20% da absorbância máxima da curva absorbância versus $\log_2$(diluição).

Neste ensaio, foram utilizados anti-IgG e anti-IgM totais de camundongo conjugados a peroxidase. Placas de poliestireno de 96 cavidades (Nunc Immunoplate Maxisorp, Rocksilde) foram incubadas com 100 μl de uma solução de 5,0 μg/ml de poli-L-lisina (Sigma) em PBS, pH 7,2 por cavidade por 30 minutos a 37ºC e lavadas três vezes com água destilada. As placas foram incubadas "overnight" a 4-8ºC com 100 μl (por cavidade) de uma solução de 20 μg/ml de polissacarídeo C em tampão de carbonato 0,05 M – bicarbonato 0,05 M, pH 9,6. As placas foram lavadas três vezes com PBS contendo Tween 20® a 0,05% (v/v) (PBS-T) e bloqueadas com 200 μl de uma solução de leite desnatado (Molico®) a 10% (p/v) por cavidade por 1 hora a 37ºC. Após o bloqueio, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T. Os soros a serem

testados (em duplicata) foram diluídos em PBS-T contendo leite desnatado a 1,0% (p/v), submetidos à diluição seriada (razão 2) e levados à incubação por 1 hora a 37ºC. Na seqüência, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T e incubadas por 1 hora a 37ºC com 100 μl por cavidade de uma solução contendo anti-IgG ou anti-IgM de camundongo conjugado a peroxidase (Sigma) diluído 1:1000 no mesmo tampão empregado na etapa anterior. A seguir, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T e incubadas por 15 minutos em ambiente escuro com 100 μl de uma solução a 400 μg/ml de orto-fenilenediamina (Sigma) e 0,5 μl/ml de peróxido de hidrogênio 30% (Aldrich) em tampão de citrato de sódio 0,1 M – fosfato de sódio monobásico 0,2 M, pH 5,0 por cavidade. A atividade enzimática foi bloqueada com ácido sulfúrico 8 N (50 μl por cavidade) e a absorbância lida a 492 nm em um leitor de ELISA (Titertek Multiskan MCC/340, MKII Labsystems).

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização do conjugado

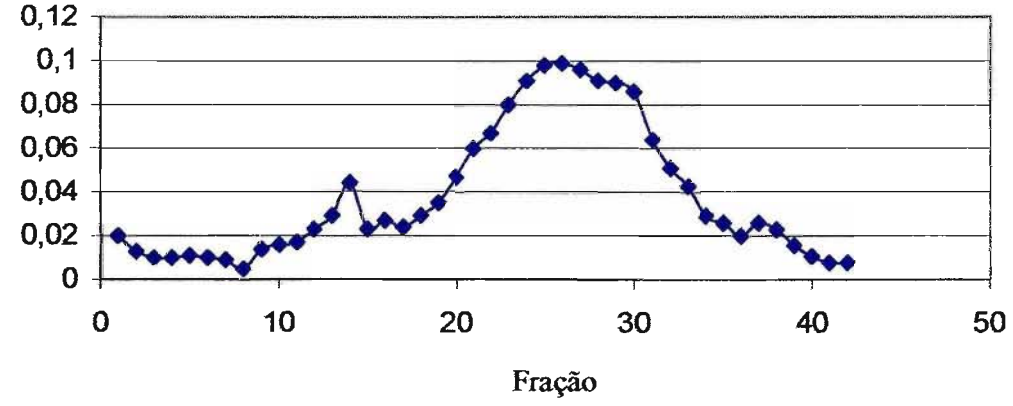
O produto da reação de conjugação apresentou um perfil de eluição com dois picos sobrepostos de proteína e polissacarídeo nas frações correspondentes a um peso molecular elevado, que coincide com o Vo da coluna. Isto sugere a ocorrência de conjugação quando também comparamos o padrão de eluição do toxóide tetânico e polissacarídeo C livres com o perfil de eluição do conjugado (**Figuras 4, 5** e **6** a seguir).

O rendimento da conjugação em função do polissacarídeo C (PSC) utilizado foi de 5,6% ± 0,25%. O rendimento em função do toxóide tetânico (TT) foi de 10% ± 0,30%. A relação PSC/TT (em massa) foi de 0,57 ± 0,08.

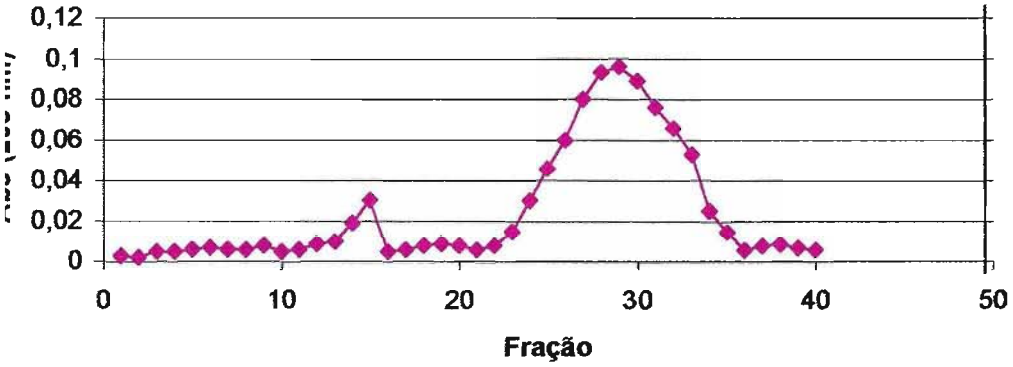
O grau de derivatização do polissacarídeo foi estimado através do doseamento da molécula espaçadora (ADH) a partir de alíquotas obtidas após as reações de acoplamento do ADH ao PSC. Em média, para cada 10,5 unidades de ácido siálico, havia 1 molécula de ADH covalentemente ligada à estrutura polissacarídica.

Os lotes de polissacarídeo apresentavam níveis de lipopolissacarídeo (testes de pirogênio em coelhos satisfatórios), de ácidos nucléicos (10 mg/g de polissacarídeo) e grupos O-acetil (1,5 mmol/g de polissacarídeo) indicados pela OMS (WHO: Requeriments for meningococcal polysaccharide vaccine). Os níveis de proteínas dos lotes (20 mg/g de polissacarídeo) encontravam-se superiores ao recomendado (10 mg/g de polissacarídeo).

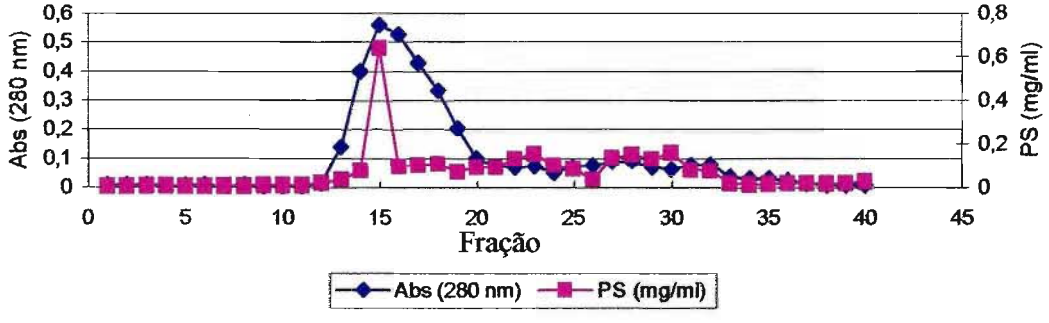
gura 4 – Perfil de eluição do toxóide tetânico livre



gura 5 – Perfil de eluição do polissacarídeo C livre



gura 6 – Perfil de eluição do conjugado (PS = polissacarídeo)



4.2. Caracterização dos lipossomos

A fim de avaliar o grau de incorporação de polissacarídeo na estrutura lipossômica, a concentração de polissacarídeo dentro dos lipossomos foi avaliada por diferença entre a sua concentração total e a sua concentração no meio externo ao lipossomo. Assim, foram obtidos os seguintes valores:

	Concentração de PSC incorporado em lipossomo		
Concentração de PSC livre (mg/mL)	**Base seca (g/g)**	**Base úmida (mg/mL)**	**Concentração total de PSC (mg/mL)**
1,055 ± 0,050	0,511 ± 0,050	0,363 ± 0,030	1,417 ± 0,050

PSC = polissacarídeo C

As doses de lipossomo injetado foram calculadas com base na concentração total de polissacarídeo presente da solução de lipossomos. Desse modo, na solução injetada havia tanto polissacarídeo livre como polissacarídeo incorporado. O grau de incorporação de polissacarídeo C em lipossomo foi de 25,6%.

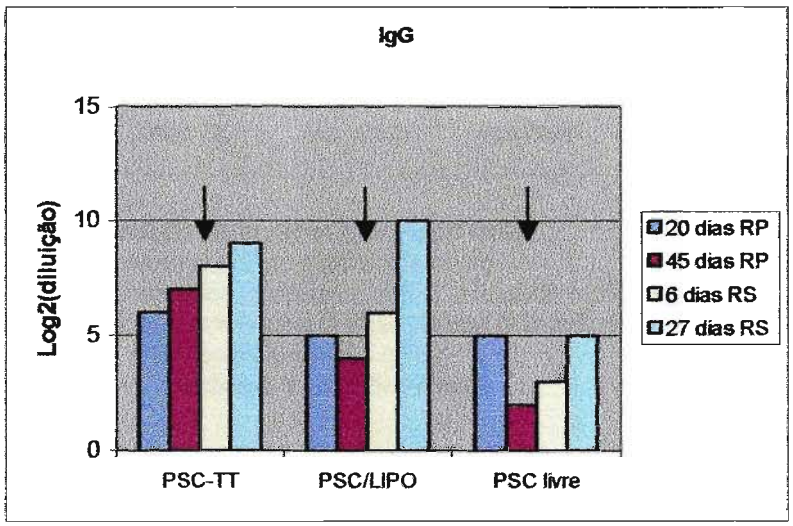
Como o fosfolipídeo utilizado na preparação do lipossomo continha exatamente um mol de fósforo por mol de fosfolipídeo, a concentração de fosfolipídeo pôde ser derivada diretamente da medida da concentração de fósforo presente na amostra e dosado na forma de fosfato. A concentração de fosfolipídeo foi de 57 mM, obtida a partir da solução de lipossomo injetada.

4.3. Determinação de anticorpos anti-polissacarídeo C

Os títulos de anticorpos IgM e IgG anti-polissacarídeo C foram determinados no soro dos grupos imunizados com o objetivo de verificar a eficiência do conjugado e do lipossomo em induzir anticorpos anti-polissacarídeo C e memória imunológica. O controle utilizado consistiu de animais imunizados com polissacarídeo C livre.

Tanto o grupo imunizado com conjugado como o grupo imunizado com polissacarídeo C em lipossomo apresentaram níveis mais elevados de anticorpos IgG em relação ao grupo controle (vide **Figura 7**).

Figura 7 - Título de anticorpos IgG anti-polissacarídeo C de "pool" de soros de camundongos imunizados com diversas preparações.

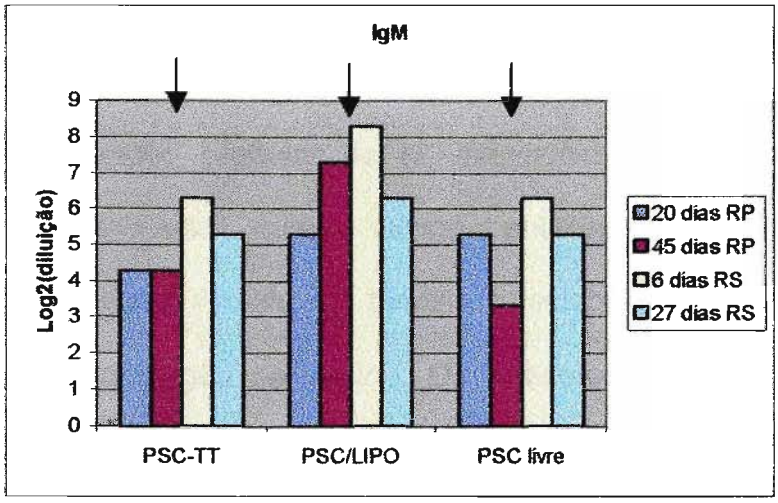


RP: resposta primária (após a primeira dose)
RS: resposta secundária (após o reforço)
PSC-TT: conjugado polissacarídeo C e toxóide tetânico
PSC/LIPO: polissacarídeo C incorporado a lipossomo
PSC livre: polissacarídeo C em salina
Obs.: as setas indicam a dose de reforço

Além disso, foi possível observar um efeito reforço, ou resposta secundária, nos dois primeiros grupos (PSC-TT e PSC/LIPO), mas não no grupo controle (PSC livre), sugerindo a geração de memória imunológica.

Os níveis de anticorpos IgM anti-polissacarídeo C não apresentaram diferença significativa entre os grupos imunizados (**Figura 8**).

Figura 8 - Título de anticorpos IgM anti-polissacarídeo C de "pool" de soros de camundongos imunizados com diversas preparações.



RP: resposta primária (após a primeira dose)
RS: resposta secundária (após o reforço)
PSC-TT: conjugado polissacarídeo C e toxóide tetânico
PSC/LIPO: polissacarídeo C incorporado a lipossomo
PSC livre: polissacarídeo C em salina
Obs.: as setas indicam a dose de reforço

5. DISCUSSÃO

Está bem estabelecido que anticorpos desempenham uma função extremamente importante na proteção contra infecção meningocócica por meio da ligação a estruturas da superfície bacteriana e ativação de complemento, resultando em fagocitose ou efeito bactericida direto. As estruturas imunogênicas da superfície celular dos meningococos que podem induzir respostas imunológicas protetoras na infância são fundamentais para o desenvolvimento de uma vacina antimeningocócica.

O polissacarídeo capsular de *N. meningitidis* é a mais importante estrutura para inclusão numa vacina antimeningocócica porque é antigenicamente compartilhada por todos os membros de cada sorogrupo, simplificando a formulação da vacina. Os anticorpos IgG e IgM contra a cápsula de polissacarídeo de meningococo sorogrupo A e C são encontrados no soro de adultos e protegem contra doença invasiva quando presentes. Durante a infância, há evidência indireta de que os anticorpos anti-polissacarídeo são protetores (Pollard & Frasch, 2001).

A classe de anticorpo produzido em resposta à infecção meningocócica tem sido estudada com algum detalhe. Anticorpos IgG, IgM e IgA aumentam após infecção sistêmica com *N. meningitidis*. Anticorpos IgG são predominantemente das subclasses IgG1 e IgG3. O aumento de anticorpo total após infecção apresenta perfil muito semelhante em lactentes e crianças mais velhas em recuperação de doença meningocócica, de modo que estes

anticorpos são bactericidas neste último grupo etário. Por outro lado, nenhum anticorpo bactericida anti-polissacarídeo B é detectado após infecção em lactentes (Pollard & Frasch, 2001). Talvez por isso todas as vacinas contra meningococos sorogrupo B em testes clínicos sejam baseadas em vesículas de membrana externa (OMVs) (Jennings & Pon, 1997; Zollinger, 1997).

Foi considerando os aspectos acima que propusemos, num primeiro momento, uma vacina conjugada constituída de polissacarídeo C conjugado a uma proteína, o toxóide tetânico. Este conjugado foi comparado ao polissacarídeo incorporado em lipossomo quanto à capacidade de induzir memória imunológica, sugerida por uma resposta secundária aumentada de anticorpos IgG anti-polissacarídeo C.

Antes de imunizar os camundongos com as respectivas preparações de vacina, procedemos (i) a caracterização química do polissacarídeo derivatizado, (ii) a caracterização química do conjugado e (iii) a caracterização dos lipossomos, considerando que vários fatores inerentes às preparações influenciam a resposta imunológica observada, justiificando assim a utilização de condições ótimas de conjugação necessárias para obtenção de proteção imunológica adequada.

O método de conjugação utilizado consistiu da formação de uma ligação covalente indireta entre o polissacarídeo e a proteína, utilizando como molécula espaçadora o ADH (diidrazida do ácido adípico). Essa conjugação é inicialmente realizada com a derivatização do polissacarídeo, ou seja, com a ligação covalente do ADH à uma molécula de ácido siálico do polissacarídeo, o

qual, após a derivatização, é covalentemente conjugado à proteína, no caso, o toxóide tetânico.

O grau de derivatização do polissacarídeo, ou seja, o grau de espaçamento entre duas unidades de ácido siálico ligado covalentemente a uma molécula de ADH, é um fator extremamente importante para imunogenicidade do conjugado. Jennings e col. (1985) mostraram que os epítopos do polissacarídeo C são constituídos por 5 unidades repetidas de ácido siálico não-modificado. Assim, o grau de derivatização do polissacarídeo deve ser tal que não haja perda desses epítopos, o que significa dizer que o grau de derivatização deve ser maior que 5, ou seja, o espaçamento entre as unidades de ácido siálico ligado ao ADH deve ser maior que 5 unidades ou moléculas de ácido siálico. Neste trabalho, obtivemos um grau de derivatização igual a 10,5, o que permitiu uma certa margem de segurança quanto à preservação dos epítopos do polissacarídeo C. Este grau de derivatização foi obtido empiricamente por meio do ajuste da concentração de ADH e EDAC.

Embora tenhamos obtido uma indução de anticorpos significativa com este grau de derivatização, alguns resultados obtidos em outros estudos contrastam bastante com a idéia de um epítopo de polissacarídeo C constituído de 5 unidades de ácido siálico. Por exemplo, Fukasawa (2000) relatou que, mesmo utilizando um conjugado cujo grau de derivatização era de 2,61, foram induzidos títulos de anticorpos bactericidas anti-meningococo C semelhantes aos induzidos por um outro conjugado com grau de derivatização

de 5,59 obtido por outra metodologia. Cabe salientar que a proteína utilizada como carregadora foi a OMV de *N. meningitidis.* Um outro estudo (Bartoloni e col., 1995) mostrou que os conjugados de polissacarídeo sorogrupo B e toxóide diftérico mutante (CRM_{197}) com menor grau de derivatização induziram maiores títulos de anticorpo IgG anti-polissacarídeo. Ainda nesse sentido, um outro estudo (Devi e col., 1991) mostrou que os conjugados de polissacarídeo de *E. coli* K92 com toxóide tetânico com menor grau de derivatização induziram maiores níveis de anticorpos IgG anti-polissacarídeo C de *N. meningitidis.* Portanto, devido ao grau de derivatização do polissacarídeo ser uma medida estatística da distribuição de moléculas espaçadoras ao longo da cadeia polissacarídica, parece que este índice não reflete na prática a manutenção de alguns epítopos intactos e somente empiricamente é possível afirmar a viabilidade de utilizar determinado polissacarídeo derivatizado.

Quanto à caracterização química do conjugado, foi utilizada nas reações uma proporção ideal de polissacarídeo e proteína determinada por estudos realizados durante o mestrado de Fukasawa (2000), considerando o grau de derivatização do polissacarídeo, a razão final polissacarídeo C/proteína e o rendimento das reações de conjugação.

O rendimento da conjugação em função do polissacarídeo C utilizado foi de 5,6% $\pm$ 0,25%. Este rendimento foi menor do que o obtido por Fukasawa (2000) (12,4% $\pm$ 0,9%) e muito próximo do obtido com a vacina conjugada de polissacarídeo de *H. influenzae* b com proteínas de OMV de *N. meningitidis* B (aproximadamente 6,0%) (Marburg e col., 1989; Marburg e col.; 1986). Este

rendimento é influenciado pela ocorrência de ligações cruzadas proteína-proteína em função da competição entre os grupos aminas da proteína e polissacarídeo ativado – ou seja, grupos amina do espaçador ADH ligado covalentemente à cadeia polissacarídica (vide **Figura 3** na página 29) – pela ligação aos grupos carboxílicos ativados da proteína.

O rendimento em função do toxóide tetânico foi de 10% ± 0,30%. Cabe destacar que, em termos de produção, o custo maior de matéria-prima fica por conta do polissacarídeo em relação ao toxóide tetânico, e portanto o rendimento é considerado em função do primeiro.

O método de conjugação utilizado resultou em um conjugado com razão média de polissacarídeo C/proteína de 0,57 ± 0,05. As vacinas conjugadas contra *H. influenzae* b produzida pela Merck & Co. e contra *N. meningitidis* produzida pela Chiron apresentam razões médias de polissacarídeo C/proteína de 0,06 e 0,25, respectivamente, embora obtidas por outros métodos de conjugação (Marburg e col., 1989). Considerando os valores destas vacinas comprovadamente imunogênicas, talvez fosse vantajoso para o rendimento, diminuir a razão polissacarídeo C/proteína obtida na conjugação, desde que isto não resulte em diminuição da imunogenicidade do conjugado.

A razão polissacarídeo C/proteína do conjugado indica a quantidade de polissacarídeo acoplado à proteína. Um valor muito alto – reflexo do excesso de polissacarídeo em relação à proteína – pode resultar no ocultamento de epítopos presentes na proteína, de modo que o polissacarídeo conjugado pode não ser reconhecido como um antígeno T-dependente.

Tanto as preparações de conjugado como de lipossomo induziram títulos elevados de anticorpos anti-polissacarídeo C, mais especificamente anticorpos IgG. Vale salientar a resposta secundária acentuada observada com o lipossomo 6 e 27 dias após a dose de reforço (vide **Figura 7** na página 39), resposta esta maior até que a do próprio conjugado, se considerarmos os títulos de IgG antes e após a dose de reforço, ou seja, se considerarmos a amplitude da diferença entre as repostas primárias e secundárias.

A diferença entre os títulos obtidos com o lipossomo e o polissacarídeo livre (controle) chega a 32 vezes o título deste último após 27 dias da segunda dose e 16 vezes no caso do conjugado em relação ao controle. Esta resposta secundária característica sugere que as preparações, tanto de lipossomo como de conjugado, foram eficazes na conversão do polissacarídeo C em um antígeno dependente de célula T.

Embora Guttormsen e col. (1999) tenham sugerido que a indução de anticorpos IgM pode ser um evento T-dependente, não foi observado aumento significativo dos títulos de IgM do conjugado e lipossomo em relação ao polissacarídeo C livre, um antígeno caracteristicamente T-independente, mas que usualmente se torna T-dependente por meio de conjugação (vide **Figura 8** na página 40). O perfil de indução de IgM foi semelhante nas três preparações, com o lipossomo apresentando no geral títulos desta imunoglobulina um pouco mais elevados.

O papel de células T na resposta de IgM a polissacarídeos capsulares de bactéria conjugados a proteínas é realmente controverso: alguns

investigadores observaram níveis substancialmente maiores de IgM polissacarídeo-específico após conjugação do polissacarídeo capsular a carregadores, enquanto outros observaram diferença mínima ou nula. Cabe observar que nestes estudos, os níveis de IgM polissacarídeo-específico foram substancialmente maiores quando utilizados polissacarídeos de alto peso molecular como antígeno, diferentemente de polissacarídeos de baixo peso molecular, que apresentaram níveis baixos (Guttormsen e col., 1999).

O mecanismo pelo qual os lipossomos aumentam a resposta imunológica antígeno-específica não está completamente esclarecido. Estudos *in vivo* com lipossomos mostram claramente que os mesmos são capturados eficientemente por macrófagos do sistema retículo-endotelial no sangue e tecidos, incluindo fígado e baço. Como os macrófagos são considerados predominantente responsáveis pelo processamento e apresentação dos antígenos encapsulados, a formulação de lipossomo possibilita uma abordagem excelente para melhorar a apresentação do antígeno em vacinas para o estímulo imunológico humoral e celular. Além dos macrófagos, que apresentam os antígenos principalmente no contexto do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) classe II (para crescimento de célula B antígeno-específica), a liberação de antígeno para algumas células dendríticas e endoteliais pode aumentar a apresentação do antígeno no contexto do MHC classe I na mediação de respostas imunológicas celulares, incluindo célula T citotóxica (ad,2; 58).

A maturação da resposta imunológica é caracterizada por (i) uma alteração da expressão de anticorpo do isotipo IgM para o isotipo predominante IgG, (ii) o desenvolvimento de uma resposta de anticorpo de alta afinidade e (iii) a presença de linfócitos de memória que montarão uma resposta rápida após um segundo desafio antigênico. Este processo geralmente ocorre após pelo menos duas doses de antígeno. No entanto, a exposição prolongada ao antígeno, induzida pelos lipossomos, permite a ocorrência de maturação imunológica. Embora a ação de células dendríticas foliculares e lipossomos na facilitação deste processo tenha sido demonstrada, o papel dos lipossomos precisa ainda ser avaliado. Além disso, o mecanismo de liberação controlada resulta em níveis baixos de antígeno ao longo do tempo, de modo que esta disponibilidade limitada de antígeno estimula primeiramente a proliferação de clones de alta afinidade. A indução de respostas de anticorpo de alta afinidade através do uso de doses baixas de antígeno já foi anteriormente demonstrada (del. Syst 2; 23-25).

Nos lipossomos, a produção de anticorpos IgG e IgM pode ser influenciada pela forma como os antígenos estão associados à estrutura lipídica. Assim, quando dentro do compartimento aquoso interno, os antígenos incorporados em lipossomos induzem preferencialmente anticorpos IgG; quando associados à bicamada, estes mesmos antígenos induzem principalmente anticorpos IgM (Sharum & Thérien, 1994). Neste sentido, os resultados observados sugerem que o polissacarídeo se encontrava na fase

aquosa do lipossomo, considerando a prevalência da resposta de IgG sobre IgM.

6. CONCLUSÕES

6.1. A conjugação do polissacarídeo C de *N. meningitidis* ao toxóide tetânico foi eficaz na conversão do primeiro, um antígeno caracteristicamente T-independente, num antígeno dependente de célula T.

6.2. Como esperado, o toxóide tetânico foi eficiente como proteína carregadora de polissacarídeo C.

6.3. Os resultados obtidos indicam que os lipossomos apresentam potencial como adjuvante numa vacina constituída de polissacarídeo C, sendo capazes de induzir resposta secundária em grau equivalente ao conjugado polissacarídeo/proteína, o que sugere indução de memória imunológica.

6.4. É necessário compatibilizar o rendimento da reação de conjugação, em termos de polissacarídeo, de modo a obter maior rendimento possível com resposta imunológica adequada.

7. REFERÊNCIAS

ACHTMAN, M. Microevolution and epidemic spread of serogroup A *Neisseria meningitidis*—a review. Gene, 192(1): 135–40, 1997.

ALA'ALDEEN, D.A. Vaccines against *Neisseria meningitidis*: past, present and future. Biotecnol. Apl., 13(1): 1-7, 1996.

ALVING, C.R. Liposomal vaccines: clinical status and immological presentation for humoral and cellular immunity. Ann. N.Y. Acad. Sci., 754: 143–52, 1995.

ANDERSON, P.; PICHICHERO, M.E.; INSEL, R.A.; BETTES, R.; EBY, R.; SMITH, D.H. Vaccines consisting of periodate cleavage oligosaccharides from the capsule of *Haemophilus influenzae* type b coupled to a protein carrier: structural and temporal requirements for priming in the human infant. J. Immunol., 137(4): 1181-6, 1986.

BAKER, M.; MCNICHOLAS, A.; GARRETT, N. et al. Household crowding a major risk factor for epidemic meningococcal disease in Auckland children. Pediatr. Infect. Dis. J., 19(10): 983–90, 2000.

BART, A.; DANKERT, J.; VAN DER ENDE, A. Antigenic variation of the class 1 outer membrane protein in hyperendemic *Neisseria meningitidis* strains in The Netherlands. Infect. Immun., 67(8): 3842–6, 1999.

BARTOLONI A, NORELLI F, CECCARINI C, RAPPUOLI R, COSTANTINO P. Immunogenicity of meningococcal B polysaccharide conjugated to tetanus toxoid or CRM197 via adipic acid dihydrazide. Vaccine, 13(5): 463–70, 1995.

BARTOLONI, A.; NORELLI, F.; CECCARINI, C.; RAPPUOLI, R.; COSTANTINO, P. Immunogenicity of meningococcal B polysaccharide conjugatled to tetanus toxoid or CRM197 via adipic acid dihydrazide. Vaccine, 13(5): 463-70, 1995.

BERILD, D.; GEDDE-DAHL, T.W.; ABRAHAMSEN, T. Meningococcal disease in the Norwegian Armed Forces 1967–1979: some epidemiological aspects. NIPH Ann., 3(2): 23–30, 1980.

BJUNE G, HOIBY EA, GRONNESBY JK, et al. Effect of outer membrane vesicle vaccine against group B meningococcal disease in Norway. Lancet, 338(8775): 1093–6, 1991.

BORROW, R.; ANDREWS, N.; GOLDBLATT, D.; MILLER, E. Serological basis for use of meningococcal serogroup C conjugate vaccines in the UK: reevaluation of correlates of protection. Infect. Immun., 69(3): 1568–73, 2001.

BREMNER, C.; LENNON, D.; MARTIN, D.; BAKER, M.; RUMKE, H. Epidemic meningococcal disease in New Zealand: epidemiology and potential for prevention by vaccine. N. Z. Med. J., 112(1091): 257–9, 1999.

BURGEOT, C.; GILBERT, F.B.; POUTREL, B. Immunopotentiation of *Staphylococcus aureus* type 5 capsular polysaccharide co-entrapped in liposomes with α-toxin. Vaccine, 19: 2092-9, 2001.

CADOZ, M. Potential and limitations of polysaccharide vaccines in infancy. Vaccine, 16 (14-15): 1391-5, 1998.

CAMARGO, M.C. & HIDALGO, N.T.R. A doença meningocócica na Grande São Paulo. Imunizações, 3: 4-7, 1990.

CAMPAGNE, G.; SCHUCHAT, A.; DJIBO, S.; OUSSEINI, A.; CISSE, L.; CHIPPAUX, J.P. Epidemiology of bacterial meningitis in Niamey, Niger, 1981–1996. Bull. World Health Organ., 77(6): 499–508, 1999.

CARBONARE, S.B.; ARSLANIAN, C.; SILVA, M.L.; FARHAT, C.K.; CARNEIRO-SAMPAIO, M.M. The antimeningococcal vaccine VAMENGOC B-C® induced poor serum and salivary antibody response in young Brazilian children. Pediatr. Infect. Dis. J. 14(9): 797-803, 1995.

Centro de Vigilância Epidemiológica. Ministério da Saúde, Governo Federal do Brasil, 1995.

COEN, P.G.; CARTWRIGHT, K.; STUART, J. Mathematical modelling of infection and disease due to *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica*. Int. J. Epidemiol., 29(1): 180–8, 2000.

CONNOLLY, M.; NOAH, N. Is group C meningococcal disease increasing in Europe? A report of surveillance of meningococcal infection in Europe 1993–1996: European Meningitis Surveillance Group. Epidemiol. Infect.,122(1): 41–9, 1999.

COX, J.C.; COULTER, A.R. Adjuvants - a classification and review of their modes of action. Vaccine, 15: 248–56, 1997.

DECKER, M.D.; EDWARDS, K.M.; BRADLEY, R.; PALMER, P. Comparative trial in infants of four conjugate *Haemophilus influenzae* type b vaccines. J. Pediatr., 120(Pt 1): 184–9, 1992.

DEVI SJ, ZOLLINGER WD, SNOY PJ, et al. Preclinical evaluation of group B *Neisseria meningitidis* and *Escherichia coli* K92 capsular polysaccharide–protein conjugate vaccines in juvenile rhesus monkeys. Infect. Immun., 65(3): 1045–52, 1997.

DEVI, S.J.N.; ROBBINS, J.B.; SCHNEERSON, R. Antibodies to poly[(2→8)-α-N-acetylneuraminic acid] and poly[(2→9)-α-N-acetylneuraminic acid] are elicited by immunization of mice with *Escherichia coli* K92 conjugates: potencial vaccines for groups B and C meningococci and *E. coli* K1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 7175-9, 1991.

DONNELLY, J.J. & LIU, M.A. Immunobiology of protein carriers. In: Development and clinical uses of *Haemophilus* b conjugate vaccines. Ed. R.W. Ellis, D.M. Granoff. New York, Marcel Dekker, 1994. p. 71-90.

FIJEN, C.A.; KUIJPER, E.J.; TE BULTE, M.T.; DAHA, M.R.; DANKERT, J. Assessment of complement deficiency in patients with meningococcal disease in The Netherlands Clin. Infect. Dis., 28(1): 98–105, 1999.

FRASCH, C.E.; ZOLLINGER, W.D.; POOLMAN, J.T. Serotype antigens of *Neisseria meningitidis* and a proposed scheme for designation of serotypes. Rev. Infect. Dis., 7: 504–10, 1985.

FROHOLM, L.O.; KOLSTO, A.B.; BERNER, J.M.; CAUGANT, D.A. Genomic rearrangements in *Neisseria meningitidis* strains of the ET-5 complex. Curr. Microbiol., 40(6): 372–9, 2000.

FUKASAWA, L.C. Obtenção e avaliação imunológica de vacina conjugada antimeningocócica sorogrupos B e C. São Paulo, 2000. 109p. [Dissertação de mestrado - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo].

FUSCO, P.C.; MICHON, F.; LAUDE-SHARP, M.; MINETTI, C.A.; HUANG, C.H.; HERON, I.; BLAKE, M.S. Preclinical studies on a recombinant group B meningococcal porin as a carrier for a novel *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine. Vaccine, 16(19): 1842-9, 1998.

GOLDBLATT, D. Recent developments in bacterial conjugate vaccines. J. Med. Microbiol., 47: 563-7, 1998.

GRANOFF, D.M.; GUPTA, R.K.; BELSHE, R.B.; ANDERSON, E.L. Induction of refractoriness in adults by meningococcal C polysaccharide vaccination. J. Infect. Dis., 178: 870-4, 1998.

GREGORIADIS, G. The immunological adjuvant and vaccine carrier properties of liposomes. J. Drug Target., 2: 351-6, 1994.

GREGORIADIS, G.; MCCORMACK, B.; OBRENOVIC, M.; PERRIE, Y.; SAFFIE, R. Liposomes as immunological adjuvants and vaccine carriers. In: Methods in molecular medicine: vaccine adjuvants. Ed. D.T. O'Hagan, Totowa, Humana Press, 1999. p. 137-150.

GUTTORMSEN, H.; SHARP, A.H.; CHANDRAKER, A.K; BRIGTSEN, A.K.; SAYEGH, M.H.; KASPER, D.L. Cognate stimulatory B-cell-T-cell interactions are critical for T-cell help recruited by glycoconjugate vaccines. Infec. and Immun. 67(12): 6375-84, 1999.

HARDING, C.V.; ROOF, R.W.; ALLEN, P.M.; UNANUE, E.R. Effects of pH and polysaccharides on peptide binding to class II major histocompatibility complex molecules. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 2740-4, 1991.

HUSSEY, G.; SCHAAF, H.; HANSLO, D. et al. Epidemiology of post-neonatal bacterial meningitis in Cape Town children. S. Afr. Med. J., 87(1): 51–6, 1997.

JARVIS, G.A. Recognition and control of neisserial infection by antibody and complement. Trends in Microbiol., 3(5): 198-201, 1995.

JEFFERIES, C.; LENNON, D.; STEWART, J.; MARTIN, D. Meningococcal disease in Auckland, July 1992–June 1994. N. Z. Med. J., 112(1085): 115–7, 1999.

JELFS, J; MUNRO, R.; WEDEGE, E.; CAUGANT, D.A. Sequence variation in the *porA* gene of a clone of *Neisseria meningitidis* during epidemic spread. Clin. Diagn. Lab. Immunol., 7(3): 390–5, 2000.

JENNINGS, H.J. & PON, R.A. Polysaccharides and glycoconjugates as human vaccines. In: Polysaccharides in medicinal aplications. Ed. S. Dumitriu. New York, Marcel Dekker, 1997. p. 443-79.

JENNINGS, H.J. Further approaches for optimizing polysaccharide-protein conjugate vaccines for prevention of invasive bacterial disease. J. Infect. Dis., 165 (suppl. 1): S156-9, 1992.

JOLLEY, K.A.; KALMUSOVA, J.; FEIL, E.J. et al. Carried meningococci in the Czech Republic: a diverse recombining population. J. Clin. Microbiol., 38(12): 4492–8, 2000.

KACZMARSKI, E.B. Meningococcal disease in England and Wales: 1995. Commun. Dis. Rep. CDR Rev., 7(4): R55–9, 1997.

KNISKERN, P.J. & MARBURG, S. Conjugation: design, chemistry and analysis. In: Development and clinical uses of *Haemophilus* b conjugate vaccines. Ed. R.W. Ellis, D.M. Granoff. New York, Marcel Dekker, 1994. p. 37-69.

KRIZ, P.; GIORGINI, D.; MUSILEK, M.; LARRIBE, M.; TAHA, M.K. Microevolution through DNA exchange among strains of *Neisseria meningitidis* isolated during an outbreak in the Czech Republic. Res. Microbiol., 150(4): 273–80, 1999.

KRIZOVA, P.; MUSILEK, M. Changing epidemiology of meningococcal invasive disease in the Czech Republic caused by new clone *Neisseria meningitidis* C:2a:P1.2(P1.5), ET-15/37. Cent. Eur. J. Public Health, 3(4): 189–94, 1995.

LEACH, A.; TWUMASI, P.A.; KUMAH, S.; BANYA, W.S.; JAFFAR, S.; FORREST, B.D.; GRANOFF, D.M.; LIBUTTI, D.E.; CARLONE, G.M.; PAIS, L.B.; BROOME, C.V.; GREENWOOD, B.M. Induction of immunological memory in gambian children by vaccination in infancy with a group A plus group C meningococcal polysaccharide-protein conjugate vaccine. J. Infect. Dis., 175: 200-4, 1997.

LINZ, B.; SCHENKER, M.; ZHU, P.; ACHTMAN, M. Frequent interspecific genetic exchange between commensal Neisseriae and *Neisseria meningitidis*. Mol. Microbiol., 36(5): 1049–58, 2000.

LOCKER, G.J.; WAGNER, A.; PETER, A. et al. Lethal Waterhouse–Friderichsen syndrome in post-traumatic asplenia. J. Trauma, 39(4): 784–6, 1995.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-275, 1951.

MACDONALD, N.E.; HALPERIN, S.A.; LAW, B.J.; FORREST, B.; DANZIG, L.E.; GRANOFF, D.M. Induction of immunology memory by conjugated vs plain meningococcal C polysaccharide vaccine in toddlers. JAMA, 280(19): 1685-9, 1998.

MAIDEN, M.C.; SPRATT, B.G. Meningococcal conjugate vaccines: new opportunities and new challenges. Lancet, 354(9179): 615–6, 1999.

MARBURG, S.; KNISKERN, P.J.; TOLMAN, R.L. Covalently-modified bacterial polysaccharides, stable covalent conjugates of such polysaccharides and immunogenic proteins with bigeneric spacers and methods of preparing such polysaccharides and conjugates and confirming covalency. Pat. USA. 4.882.317, november 21, 1989.

MARBURG, S.; JORN, D.; TOLMAN, R.L.; ARISON, B.; MCCAULEY, J.; KNISKERN, P.J.; HOGOPIAN, A.; VELLA, P.P. Bimolecular chemistry of macromolecules: synthesis of bacterial polysaccharide conjugates with

Neisseria meningitidis membrane protein. J. Am. Chem. Soc., 108: 5282-7, 1986.

MARTIN, D.R.; WALKER, S.J.; BAKER, M.G.; LENNON, D.R. New Zealand epidemic of meningococcal disease identified by a strain with phenotype B:4:P1.4. J. Infect. Dis., 177(2): 497–500, 1998.

MICHON, F.; FUSCO, P.C.; MINETTI, C.A.S.A.; LAUDE-SHARP, M.; UITZ, C.; HUANG, C.H.; D'AMBRA, A.J.; MOORE, S.; REMETA, D.P.; HERON, I.; BLAKE, M.S. Multivalent pneumococcal capsular polysaccharide conjugate vaccines employing genetically detoxified pneumolysin as a carrier protein. Vaccine, 16(18): 1732-41, 1998.

MILAGRES, L.G.; GORLA, M.C.O.; SACCHI, C.T.; RODRIGUES, M.M. Specificity of bactericidal antibody response to serogroup B meningococcal strains in brazilian children after immunization with an outer membrane vaccine. Infect. Immun., 66(10): 4755-4761, 1998.

MILAGRES, L.M. & MELLES, C.E.A. Immunity confered by anti-meningococci vaccines. Rev. Saúde Pública, 27(3): 221-6, 1993.

MOODLEY, J.R.; COETZEE, N.; HUSSEY, G. Risk factors for meningococcal disease in Cape Town. S. Afr. Med. J., 89(1): 56–9, 1999.

MORAES, J.C.; PERKINS, B.A.; CAMARGO, M.C.C.; HIDALGO, N.T.R.; BARBOSA, H.A.; SACCHI, C.T.; GRAL, I.M.L.; GATTAS, V.L.; VASCONCELOS, H.G.; PLIKAYTIS, B.D.; WENGER, J.D.; BROOME, C.V. Protective efficacy of serogroup B meningococcal vaccine in São Paulo. Lancet, 340: 1074-8, 1992.

MORLEY, S.L.; POLLARD, A.J. Vaccine prevention of meningococcal disease, coming soon? Vaccine, 20: 666-87, 2002.

NEAL, K.R.; NGUYEN-VAN-TAM, J.; MONK, P.; O'BRIEN, S.J.; STUART, J.; RAMSAY, M. Invasive meningococcal disease among university undergraduates: association with universities providing relatively large amounts of catered hall accommodation. Epidemiol. Infect., 122(3): 351–7, 1999.

NIELSEN, H.E.; KOCH, C.; MAGNUSSEN, P.; LIND, I. Complement deficiencies in selected groups of patients with meningococcal disease. Scand. J. Infect. Dis., 21(4): 389–96, 1989.

PEETERS, C.C.A.M.; LANGERMAN, P.R.; WEERS, O.; OOMEN, L.A.; HOOGERHOUT, P.; BEURRET, M.; POOLMAN, J.T. Polysaccharide-protein conjugate vaccines. In: Methods in molecular medicine: vaccine protocols. Ed. A. Robinson, G. Farrar, C. Wiblin, Totowa, Humana Press, 1996. p. 111-127.

PETTERSSON, A.; PRINZ, T.; UMAR, A.; VAN DER BIEZEN, J.; TOMMASSEN, J. Molecular characterization of LbpB, the second lactoferrin-binding protein of *Neisseria meningitidis*. Mol. Microbiol., 27(3): 599–610, 1998.

POLLARD, A.J.; FRASCH, C. Development of natural immunity to *Neisseria meningitidis*. Vaccine, 19: 1327-46, 2001.

PRINZ, T.; MEYER, M.; PETTERSSON, A.; TOMMASSEN, J. Structural characterization of the lactoferrin receptor from *Neisseria meningitidis*. J. Bacteriol., 181(14): 4417–9, 1999.

RAMSAY, M.; KACZMARSKI, E.; RUSH, M.; MALLARD, R.; FARRINGTON, P.; WHITE, J. Changing patterns of case ascertainment and trends in meningococcal disease in England and Wales. Commun. Dis. Rep. CDR Rev., 7(4): R49–54, 1997.

RICHMOND, P.; BORROW, R.; GOLDBLATT, D. et al. Ability of three different meningococcal C conjugate vaccines to induce immunologic memory after a single dose in UK toddlers. J. Infect. Dis., 183(1): 160–3, 2001.

RIJKERS, G.T.; SANDERS, E.A.M.; BREUKELS, M.A.; ZEGERS, B.J.M. Infant B cell responses to polysaccharide determinants. Vaccine, 16(14-15): 1396-1400, 1998.

ROKBI, B.; RENAULD-MONGENIE, G.; MIGNON, M. Allelic diversity of the two transferrin binding protein B gene isotypes among a collection of *Neisseria meningitidis* strains representative of serogroup B disease: implication for

the composition of a recombinant TbpB-based vaccine. Infect. Immun., 68(9): 4938–47, 2000.

ROSENSTEIN, N.E.; PERKINS, B.A.; STEPHENS, D.S.. The changing epidemiology of meningococcal disease in the United States, 1992–1996. J. Infect. Dis.,180(6): 1894–901, 1999.

ROUSER, G.; FLEISCHER, S.L.; YAMAMOTO, A.Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination by phosphorus analysis of spots. Lipids, 5:494-6, 1970.

SALIT, I.E. Meningococcemia caused by serogroup W135: association with hypogammaglobulinemia. Arch. Int. Med., 141(5): 664–5, 1981.

SCHNEERSON, R.; BARRERA, O.; SUTTON, A.; ROBBINS, J.B. Preparation, characterization and immunogenicity of Haemophilus influenzae type b polysaccharide-protein conjugates. J. Exp. Med., 152: 361-76, 1982.

SHARUM, E.; THÉRIEN, H-M. Correlation between *in vitro* and *in vivo* behaviour of liposomal antigens. Vaccine, 12:1125-31, 2002.

SIM, R.J; HARRISON, M.M.; MOXON, E.R.; TANG, C.M. Underestimation of meningococci in tonsillar tissue by nasopharyngeal swabbing. Lancet, 356(9242): 1653–4, 2000.

SIMMONS, G.; MARTIN, D.; STEWART, J.; BREMNER, D. Carriage of *N. lactamica* in a population at high risk of meningococcal disease. Epidemiol. Infect., 125(1): 99–104, 2000.

STAROS, J.V.; WRIGHT, R.W.; SWINGLE, D.M. Enhancement by N-hidroxysulfosuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions. Anal. Biochem., 156: 220-2, 1986.

STEIN, K.E. Thymus-independent and thymus-dependent responses to polysaccharide antigens. J. Infect. Dis., 165(suppl.): S49-52, 1992.

TANIZAKI, M.M.; GARCIA, L.R.; RAMOS, J.B.; FURUTA, J.A.; LEITE, L.C.C.; HISS, H.; CABRERA-CRESPO, J.; RAW, I. Purification of meningococcal group C polysaccharide by a procedure suitable for scale-up. J. Microbiol. Methods, 27: 19-23, 1996.

TAUNAY, A.E.; GALVÃO, P.A.; MORAIS, J.S.; GOTSCHLICH, E.C.; FELDMAN, R.A. Disease prevention by meningococcal serogoup C polysaccharide vaccine in preschool children: results after eleven months in São Paulo, Brazil. Pediatr. Res., 8: 429-35, 1974.

VOGEL, U.; FROSCH, M. Mechanisms of *Neisseria* serum resistance. Mol. Microbiol., 32(6): 1133–9, 1999.

WHALEN, C.M.; HOCKIN, J.C.; RYAN, A.; ASHTON, F. The changing epidemiology of invasive meningococcal disease in Canada, 1985 through 1992: emergence of a virulent clone of *Neisseria meningitidis*. JAMA, 273(5): 390–4, 1995.

ZOLLINGER, W.D. New and improved vaccines against meningococcal disease. In: New generation of vaccines. Ed. G.L. Woodrow, J.B. Kaper, G.S. Cobon, New York, Marcel Dekker, 1997. p. 469-488.