DOUGLAS BORGES DE FIGUEIREDO

Desenvolvimento e produção de uma nova vacina pneumocócica de nanopartículas formulada para administração em pó por via pulmonar

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

São Paulo

2019

RESUMO

FIGUEIREDO, D. B. **Desenvolvimento e produção de uma nova vacina pneumocócica de nanopartículas formulada para administração em pó por via pulmonar.** 2019. 208 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Doenças pneumocócicas são a principal causa de óbitos entre crianças menores de 5 anos em todo o mundo. Dado o crescente número de cepas de *Streptococcus pneumoniae* resistentes a antibióticos, a vacinação é a forma mais eficiente de prevenir doenças causadas por esta bactéria. Embora existam várias vacinas pneumocócicas no mercado, todas são baseadas no polissacarídeo capsular do pneumococo. Estas vacinas têm cobertura limitada, já que é inviável incluir os polissacarídeos dos mais de 90 sorotipos diferentes de *S. pneumoniae*, e promovem a substituição de sorotipos na população por aqueles não cobertos pela vacina. Uma alternativa que contornaria este problema seria a produção de vacinas baseadas em antígenos conservados entre todos os sorotipos. Destes, proteínas de *S. pneumoniae* têm se mostrado candidatas promissoras. O objetivo deste trabalho é produzir e avaliar *in vitro* e *in vivo* uma vacina pneumocócica composta por proteínas de *S. pneumoniae* carregadas em nanopartículas poliméricas visando a imunização pela via pulmonar. As proteínas escolhidas foram a pneumolisina geneticamente detoxificada (PdT), e um fragmento da proteína A de superfície do pneumococo do clado 4 (PspA4Pro). O gene da PdT foi expresso em *Escherichia coli* e a proteína produzida foi reconhecidas por anticorpos produzidos contra a célula inteira de pneumococo via *western blot*. Estoques produtores de PdT foram preparados para experimentos futuros. A PspA4Pro foi purificada através da lise da biomassa em homogeneizador de alta pressão, precipitação de contaminantes com detergente catiônico, cromatografias de troca iônica e crioprecipitação em pH ácido. Ferramenta de planejamento experimental foi utilizada para otimizar a etapa de precipitação com detergente. A PspA4Pro foi inserida em nanopartículas de poli-(glicerol adipato-co- ω -pentadecalactona) (PGA-co-PDL) ou de polímero X produzidas com ou sem diferentes tipos de quitosana. Estas nanopartículas foram encapsuladas em micropartículas de L-leucina pela técnica de *spray dry*. As

nanopartículas produzidas apresentaram tamanho menor do que 200 nm, ideal para a internalização por células dendríticas, baixa polidispersão e baixa toxicidade. As proteínas liberadas das nanopartículas mantiveram sua integridade, a capacidade de ligar à lactoferrina humana e foram reconhecidas por anticorpos anti-PspA. O ensaio de aerolização das micropartículas mostraram que estas são capazes de chegar às vias aéreas inferiores de humanos e ensaios *in vitro* mostraram que as micropartículas foram capazes de ativar células dendríticas extraídas da medula óssea de camundongos. Camundongos imunizados por via pulmonar com duas doses das micropartículas produziram mais IgG anti-PspA do que animais imunizados via subcutânea ou via pulmonar com PspA4Pro e tiveram taxas de sobrevivência mais alta quando desafiados com *S. pneumoniae*. Tanto as nanopartículas de PGA-co-PDL quanto as de X se mostraram promissoras para serem utilizadas como veículos para vacinas pneumocócicas dado seu potencial adjuvante e por permitirem o transporte a seco das proteínas sem degradação e mantendo sua imunogenicidade.

Palavras-Chave: Proteína A de superfície do pneumococo (PspA), pneumolisina detoxificada (PdT), nanopartículas, polímeros biocompatíveis, vacinação pulmonar.

ABSTRACT

FIGUEIREDO, D. B. **Development and production of a new pneumococcal nanoparticle vaccine formulated for pulmonary powder administration.** 2019. 208 p. Thesis (Ph. D. thesis in Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Pneumococcal diseases are the leading cause of death among children under 5 years of age worldwide. Given the growing number of antibiotic resistant *Streptococcus pneumoniae* strains, vaccination is the most efficient way to prevent diseases caused by this bacterium. Although there are several pneumococcal vaccines on the market, they are all based on the pneumococcal capsular polysaccharide. These vaccines have limited coverage since it is unfeasible to include the polysaccharides from more than 90 different *S. pneumoniae* serotypes, and promote the replacement of serotypes in the population by those not covered by the vaccine. An alternative that would circumvent this problem would be the production of vaccines with antigens conserved among all serotypes. Of these, *S. pneumoniae* proteins have been shown to be promising candidates. The objective of this work is to produce and evaluate *in vitro* and *in vivo* a pneumococcal vaccine composed of proteins of *S. pneumoniae* loaded in polymeric nanoparticles aiming the immunization by the pulmonary route. The proteins chosen were genetically detoxified pneumolysin (PdT), and a fragment of pneumococcal surface protein A from clade 4 (PspA4Pro). The PdT gene was expressed in *Escherichia coli* and the proteins produced were recognized by antibodies raised against the whole pneumococcal cell via *western blot*. PdT-producing stocks were prepared for future experiments. PspA4Pro was purified by lysing the biomass in a high pressure homogenizer, precipitating contaminants with cationic detergent, ion exchange chromatography and cryoprecipitation at acidic pH. The experimental planning tool was used to optimize the detergent precipitation step. PspA4Pro was inserted into poly(glycerol adipate-co- ω -pentadecalactone) (PGA-co-PDL) or polymer X nanoparticles produced with or without different types of chitosan. These nanoparticles were encapsulated in L-leucine microparticles by *spray dry* technique. The nanoparticles produced were smaller than 200 nm, ideal for dendritic cell internalization, with low polydispersity and low toxicity. The proteins released from the nanoparticles maintained their integrity, the ability to bind to human lactoferrin and were recognized by

anti-PspA antibodies. The microparticle aerolisation assay showed that they are able to reach the lower airways of humans and *in vitro* assays have shown that the microparticles were able to activate dendritic cells extracted from the mouse marrow. Mice immunized via the pulmonary route with two doses of the microparticles produced more anti-PspA IgG than animals immunized via subcutaneous or pulmonary routes with PspA4Pro and had higher survival rates when challenged with *S. pneumoniae*. Both PGA-co-PDL and X nanoparticles have shown promise for use as carriers for pneumococcal vaccines given their adjuvant potential and for allowing dry transport of the proteins without degradation and maintaining their immunogenicity.

Key words: Pneumococcal surface protein (PspA), detoxified pneumolysin (PdT), nanoparticles, biocompatible polymers, pulmonary vaccination

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Streptococcus pneumoniae é um dos principais causadores de doenças como otite aguda do ouvido médio, pneumonia e meningite (VIEIRA *et al.*, 2007). Embora a colonização da nasofaringe por *S. pneumoniae* seja bastante comum e normalmente assintomática, quando esse microrganismo invade outros nichos ocorrem as doenças pneumocócicas. A Organização Mundial da Saúde estimou que, em 2008, das cerca de 8,8 milhões de mortes globais entre crianças menores que 5 anos, 476000 tenham sido causadas por infecções pneumocócicas. Nos países em desenvolvimento as taxas de mortalidade entre as crianças mais jovens podem chegar a 20% para sepse pneumocócica (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012). Em 2015 ocorreram cerca de 390.000 óbitos de crianças menores de 5 anos atribuídos a pneumonia pneumocócica, o que torna esta doença a principal causa de óbitos neste grupo em todo o mundo (ROTH *et al.*, 2018).

Como ocorre com outras bactérias patogênicas, cepas de *S. pneumoniae* resistentes a antibióticos são um problema de saúde global grave. O primeiro isolado clínico de *S. pneumoniae* resistente à penicilina data de 1965. Durante os anos 70 e 80, cepas de *S. pneumoniae* resistentes à penicilina, eritromicina e trimetropina-sulfametoxazol se espalharam pelo globo, sendo encontradas desde os Estados Unidos até a Espanha, Israel, Austrália e Papua Nova Guiné. Cepas de *S. pneumoniae* multirresistentes, ou seja, resistentes a 3 ou mais classes de antibióticos, já foram isoladas de crianças e são predominantemente encontradas em sorotipos associados à doença invasiva (9A, 6B, 9V, 14, 19A, 19F e 23F) (KIM *et al.*, 2016). Em 2013, o Centro de Controle de Doenças dos Estados Unidos emitiu um relatório estimando que cerca de 30% dos casos de doenças pneumocócicas severas são causados por bactérias resistentes a pelo menos um tipo de antibiótico. Infecções por *S. pneumoniae* resistentes levam a cerca de 1,2 milhões de casos da doença por ano e resultam em 7000 mortes e um gasto anual de US\$96 milhões nos EUA. Ainda neste relatório, o Centro de Controle de Doenças aponta a vacinação como uma ferramenta eficaz no controle das doenças pneumocócicas e na redução das cepas resistentes aos antibióticos circulantes na população ao impedir sua transmissão (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2013). No Brasil, entre 2005 e 2015, houve

mais de 7 milhões de internações no SUS decorrentes de pneumonias. De todas estas internações, aproximadamente 2 milhões foram de crianças menores de 2 anos e 1,9 milhões foram de idosos acima de 65 anos. De todos estes casos, cerca de 42 mil foram atribuídos apenas a infecções por *S. pneumoniae* (ANDRADE *et al.*, 2017).

As vacinas pneumocócicas atualmente em uso são constituídas de polissacarídeos (PS) da cápsula de *S. pneumoniae* livres ou conjugados a uma proteína carregadora. PS são antígenos timo-independente, e, por isso, produzem baixa resposta imune em crianças, principalmente nas menores de dois anos, uma vez que não estimulam a maturação clonal. A conjugação do PS com uma proteína carregadora transforma a resposta imune em T-dependente, tornando eficiente seu uso em crianças menores de 2 anos de idade. Contudo, devido à dificuldade na produção e purificação dos PS e ao baixo rendimento da reação de conjugação, todas as vacinas conjugadas possuem um número reduzido de PS (10 ou 13 até o momento), o que limita a cobertura e desencadeia uma pressão seletiva que faz com que ocorra a substituição dos sorotipos vacinais, antes prevalentes na população, por outros não incluídos na vacina (FRAZÃO *et al.*, 2005; HUANG *et al.*, 2005). De fato, quatro anos após a introdução da vacina pneumocócica conjugada 7-valente (PCV7) na Inglaterra, foi observado aumento de 19% nos casos de doenças pneumocócicas invasivas causadas por sorotipos não vacinais em todos os grupos etários, e quatro anos após a introdução da vacina 13-valente, introduzida para substituir a PCV7, houve aumento de 25% nos casos de doenças causadas por sorotipos não vacinais (SHAMEZ *et al.*, 2018). Desse modo, o desenvolvimento de vacinas que utilizem proteínas imunogênicas e conservadas do pneumococo é uma alternativa para aumentar a cobertura da vacina e reduzir custos, uma vez que proteínas oferecem resposta imune T-dependente e resultariam em proteção independente de sorotipo.

Além da escolha dos antígenos, a forma de apresentação da vacina é outro fator importante a ser considerado durante seu desenvolvimento. Diferente das vacinas pneumocócicas polissacarídicas e conjugadas atualmente em uso, que são administradas através de injeção intramuscular e precisam ser armazenadas sob refrigeração, uma vacina formulada para apresentação em pó baseada em nanopartículas carregadas com antígenos pneumocócicos teria a vantagem de não necessitar de resfriamento durante o transporte e armazenamento, dado que os

antígenos estariam protegidos do ambiente dentro das partículas, além de dispensar a etapa de conjugação dos PS a uma proteína carregadora, que representa parte significativa do custo de produção das vacinas conjugadas, e de permitir a aplicação diretamente nos pulmões no lugar da aplicação intramuscular, o que reduz a produção de resíduos perfurocortantes e o desconforto dos pacientes. Diante do exposto, este trabalho se propõe a desenvolver uma nova vacina pneumocócica composta por nanopartículas carregadas com antígenos proteicos conservados de *S. pneumoniae*, unindo as vantagens já expostas das vacinas de nanopartículas com a cobertura independente de sorotipo conferida por antígenos conservados em diferentes cepas do patógeno.

5. CONCLUSÕES

O clone de *E. coli* BL21(DE3) produtor de PdT recombinante foi obtido e estoques congelados foram preparados para futuros cultivos e purificações.

O planejamento experimental nos permitiu determinar as variáveis contribuem de forma mais significativa para a etapa de clarificação do processo de purificação de PspA4Pro, a saber: concentração de CTAB, concentração de biomassa e agitação, e os modelos matemáticos gerados indicaram quais condições experimentais levariam às maiores recuperação e pureza de PspA4Pro.

Tanto o processo de purificação onde a clarificação foi feita de acordo com a predição feita pelo modelo obtido no planejamento experimental, com 0,26% de CTAB, quanto o processo onde a clarificação foi feita com 0,1% de CTAB, resultaram em pureza de PspA4Pro superior à 98% e recuperação próxima a 30%..

As seguintes condições foram estabelecidas para preparo das NP de PGA-co-PDL via emulsão simples, formulação onde a PspA4Pro fica adsorvida à superfície: DCM 2 mL, PVA 10% 5 mL, amplitude do sonicador 65%, tempo de sonicação 120 s e PVA 0,75%. Para o preparo NP de X também por emulsão simples, as condições foram: DCM 2 mL, PVA 10% 3 mL, amplitude 65%, tempo de sonicação 120 s e PVA 0,50%. Em ambos os casos as condições foram escolhidas de maneira a obter os menores tamanhos e polidispersão.

Dois tipos de quitosana, HCL-CS e CM-CS, foram incorporadas às NP formuladas por emulsão simples nas condições descritas acima e por emulsão dupla nas condições descritas por ALFAGIH *et al.* (2015). Novamente as concentrações de quitosana que levaram ao menor tamanho foram escolhidas, a saber: 1,0 mg/mL de HCL-CS ou CM-CS para PGA-co-PDL, 1,0 mg/mL HCL-CS e 0,5 mg/mL CM-CS para X, tanto por emulsão simples como dupla.

A carga positiva conferida pela HCL-CS levou à >90% de adsorção de PspA4Pro às NP dos dois polímeros e aumentou o encapsulamento de 2% para 11%, no caso de PGA-co-PDL, e de 15% para 30%, nas NP de X.

Após avaliação de pH 7,0 e 4,0 para adsorção, constatou-se que a adsorção de PspA4Pro às NP de X com e sem CM-CS aumentou a pH 4,0, mas diminuiu no caso das NP de PGA-co-PDL. Estes dados indicam que em NP de X a interação iônica

provavelmente é preponderante para adsorção de PspA4Pro, enquanto em NP de PGA-co-PDL outras interações devem ser mais importantes, como interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio. Na maioria dos casos a presença das quitosanas dificultou a liberação da PspA4Pro tanto adsorvida como encapsulada nos dois polímeros. Assim, a maioria das formulações apresentou liberação inferior a 50% após 24 h.

A PspA4Pro liberada das nanopartículas com CM-CS perdeu atividade biológica, enquanto a que foi liberada das formulações sem quitosana e com HCl-CS manteve sua integridade, atividade biológica e foi reconhecida por anticorpos monoclonais anti-PspA, portanto estas nanopartículas são bons veículos para entrega de PspA4Pro e foram empregadas para formular micropartículas por spray-dry com L-leucina, o que permitiu seu transporte sem necessidade de controle de temperatura ou humidade.

Os testes *in vitro* mostraram que as nanopartículas apresentaram baixa toxicidade e que foram capazes de ativar células dendríticas, algo que a PspA4Pro sozinha não foi capaz de fazer.

A imunização com as NCMP gerou títulos de IgG anti-PspA4Pro muito superiores àqueles encontrados no soro dos animais imunizados com PspA4Pro, tanto pela via subcutânea quanto pela pulmonar. Isso demonstra o potencial adjuvante destas formulações.

Duas doses de 2 µg de PspA4Pro em partículas de PGA-co-PDL HCl-CS protegeram 66,7% dos animais imunizados, significativamente mais do que o controle negativo, enquanto 2 µg de PspA4Pro em partículas de X HCl-CS protegeram apenas 33,3% dos animais, o que não foi estatisticamente significativo.

Com duas doses de 6 µg de PspA4Pro, a sobrevivência aumentou para 83,3% nos animais imunizados com as partículas de PGA-co-PDL HCl-CS e 100% para os imunizados com X HCl-CS.

Trabalhos futuros deverão ser feitos para verificar a proteção oferecida pelas contra *S. pneumoniae* carregando PspA de família 1, bem como avaliar a inclusão de outros antígenos do pneumococo nas formulações, como a PdT, misturas de PspA de diferentes famílias, ou proteínas híbridas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, C. L. C. **Avaliação da citotoxicidade induzida por produtos cosméticos pelo método de quantificação de proteínas totais em células 3t3**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2008.

ADAMS, D. **The Hitchhiker's Guide to the Galaxy**. Londres, Pan Books, 1972.

AKEL, S. Chapter 3 - Cell Banking: Process Development and Cell Preservation. In ATALA, A.; ALLICKSON, J. G. **Translational Regenerative Medicine**. Londres: Academic Press, 2015. p. 21-37.

ALFAGIH, I. et al. Pulmonary Delivery of Proteins Using Nanocomposite Microcarriers. **J. Pharm Sci**, v. 104, n. 12, p. 4386-4398, Dez., 2015.

AMERSHAM BIOSCIENCE. **Protein Purification Handbook**. 2018 disponível em <http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/Others/AMERSHAMHandbookProtPurific.pdf> acesso: Jan., 2019.

ANDRADE, A. L. et al (2017) Direct and indirect impact of 10-valent pneumococcal conjugate vaccine introduction on pneumonia hospitalizations and economic burden in all age-groups in Brazil: A time-series analysis. **PLoS ONE** v.12(9), p. 1-19, Set., 2017

ARNAU, J. et al. Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. **Protein Expr Purif**, v. 48, n. 1, p. 1-13, Jul., 2006.

BAEK, M. et al Factors influencing the cytotoxicity of zinc oxide nanoparticles: particle size and surface charge. **J Phys Conf**, v. 304, p. 1-8, 2011.

BAHADAR, H. et al. Toxicity of Nanoparticles and an Overview of Current Experimental Models. **Iran Biomed J**, v. 20, n. 1, p. 1-11, Jan., 2016.

BARAZZONE, G. C. Production and purification of recombinant fragment of pneumococcal surface protein A (PspA) in Escherichia coli. **Procedia Vaccinol**, v. 4, p. 27-35, Dez., 2011.

BARBIERI, S. et al. Ex vivo permeation of tamoxifen and its 4-OH metabolite through rat intestine from lecithin/chitosan nanoparticles. **Int J Pharm**, v. 491, n. 1-2, p. 99-104, Ago., 2015.

BELL, M. R. et al. To fuse or not to fuse: what is your purpose? **Protein Sci**, v. 22, n. 11, p. 1466-1477, Nov., 2013.

BERRY, A. M. et al. Effect of defined point mutations in the pneumolysin gene on the virulence of Streptococcus pneumoniae. **Infect Immun**, v. 63, n. 5, p. 1969-74, May 1995.

BORGES, O. et al. Immune response by nasal delivery of hepatitis B surface antigen and codelivery of a CpG ODN in alginate coated chitosan nanoparticles. **Eur J of Pharm Biopharm**, v.69, n. 2, p.405-416, Jun., 2008.

BOGAERT, D.; DE GROOT, R.; HERMANS, P. W. Streptococcus pneumoniae colonisation: the key to pneumococcal disease. **Lancet Infect Dis**, v. 4, n. 3, p. 144-54, Mar 2004.

CAMPANI, G. et al. Recombinant protein production by engineered Escherichia coli in a pressurized airlift bioreactor: A techno-economic analysis. **Chem Eng Process**, v. 103, p. 63-69, Mai., 2016.

CARSTENS, M. G. Opportunities and challenges in vaccine delivery. **Eur J Pharm Sci** v. 36, n. 4-5, p. 605-608, Mar., 2009

CARVALHO, A. L. V. C. **Ativação das células dendríticas da pele por alérgenos e citocinas epidérmicas**. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. Coimbra, 2003.

CARVALHO, R. J. et al. Development of production and purification processes of recombinant fragment of pneumococcal surface protein A in Escherichia coli using different carbon sources and chromatography sequences. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 94, n. 3, p. 683-694. Mai., 2012.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Antibiotic resistance threats in the United States**, 2013

CHENG, Y. et al. Fusion expression and immunogenicity of EHEC EspA-Stx2A protein: implications for the vaccine development. **J. Microbiol**, v. 47, n. 4, p. 498-505, Ago., 2009.

CLAWSON, C. et al. Delivery of a peptide via poly(D,L-lactic-co-glycolic) acid nanoparticles enhances its dendritic cell-stimulatory capacity. **Nanomedicine**, v. 6, n. 5, p. 651-661, Out., 2010.

CRYAN, S. A.; SIVADAS, N.; GARCIA-CONTRERAS, L. In vivo animal models for drug delivery across the lung mucosal barrier. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 59, n. 11, p. 1133-1151, Set., 2007.

DANHIER, F. et al. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. **J Control Release**, v.161, n. 2, p.505-522, Jul., 2012.

DANIELS, C. C.; ROGERS, D.; SHELTON, C. M. A Review of Pneumococcal Vaccines: Current Polysaccharide Vaccine Recommendations and Future Protein Antigens. **J Pediatr Pharmacol**, v. 21, n. 1, p. 27-35, Jan/Feb., 2016

DE LENCASTRE, H. et al. Carriage and antibiotic resistance of respiratory pathogens and molecular epidemiology of antibiotic-resistant Streptococcus pneumoniae

colonizing children in day-care centers in Lisbon: the Portuguese day-care center initiative. **Clin Microbiol Infect**, v. 5 Suppl 4, p. S55-S63, Aug 1999.

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnol Adv**, v. 27, n. 3, p. 297-306, Mai-Jun., 2009.

DOMMASCHK, A et al. Nasopharyngeal colonization with *Streptococcus pneumoniae* triggers dendritic cell dependent antibody responses against invasive disease in mice. **Eur J Immunol**, v. 47, n.3, p. 540-541, Feb., 2017

DOUCE, G. et al. Novel mucosal vaccines generated by genetic conjugation of heterologous proteins to pneumolysin (PLY) from *Streptococcus pneumoniae*. **Vaccine**, v. 28, n. 18, p. 3231-3237, Abr., 2010.

EFFROS, R. M. Anatomy, development, and physiology of the lungs. 2006. Disponível em: < <https://www.nature.com/gimo/contents/pt1/full/gimo73.html> > . Acesso em: 25 fev 2019.

EXPASY. ProtParam Tool. 2019. Disponível em: < <http://web.expasy.org/protparam/> >. Acesso em: Fevereiro, 2019.

FECZKÓ, T. et al. Optimization of protein encapsulation in PLGA nanoparticles, **Chem Eng Process**, v. 50, n. 8, p. 757-765, Ago., 2011.

FENG, C. et al. Chitosan/o-carboxymethyl chitosan nanoparticles for efficient and safe oral anticancer drug delivery: in vitro and in vivo evaluation. **Int J Pharm**, v. 457, n., 1, p. 158-167, Nov., 2013.

FENG, G.; et al. Enhanced immune response and protective effects of nano-chitosan-based DNA vaccine encoding T cell epitopes of Esat-6 and FL against *Mycobacterium tuberculosis* infection. **PLoS ONE**, v.8, n. 4, e61135, Abr., 2013.

FENOLL, A. et al. Evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and antibiotic resistance in Spain: update (1990 to 1996). **J Clin Microbiol**, v. 36, n. 12, p. 3447-54, Dec 1998.

FERREIRA, D. M. et al. Protection against nasal colonization with *Streptococcus pneumoniae* by parenteral immunization with a DNA vaccine encoding PspA (Pneumococcal surface protein A). **Microb Pathog**, v. 48, n. 3, p. 205-213, Jun., 2010

FERREIRA, D. M. et al. DNA vaccines expressing pneumococcal surface protein A (PspA) elicit protection levels comparable to recombinant protein. **J. Med. Microbiol**, v. 55, p. 375-378, Abr., 2006.

FIGUEIREDO, D. B. **Desenvolvimento do processo de purificação da proteína A de superfície de pneumococo do clado 4 (PspA4pro)**. Dissertação de Mestrado. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil. 2014.

FIGUEIREDO, D. B. et al. Production and purification of an untagged recombinant pneumococcal surface protein A (PspA4Pro) with high-purity and low endotoxin content. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 101, n. 6, p. 2305-2317, Mar 2017.

FRAZÃO, N. et al. Effect of the seven-valent conjugate pneumococcal vaccine on carriage and drug resistance of *Streptococcus pneumoniae* in healthy children attending day-care centers in Lisbon. **Pediatr Infect Dis J**, v. 24, n. 3, p. 243-52, Mar 2005.

FREDENBERG, S. et al. The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems--a review. **Int J Pharm.** V. 415, n. 1-2, p. 34-52, Ago., 2011.

FREY, S. E. et al. A Phase I, dose-escalation trial in adults of three recombinant attenuated *Salmonella* Typhi vaccine vectors producing *Streptococcus pneumoniae* surface protein antigen PspA. **Vaccine**, v. 31, n. 42, p. 4874-4880, Out., 2013.

GE LIFESCIENCE. **Resins.** Disponível em <<https://www.gelifesciences.com/en/us/shop/chromatography/resins>> Acesso Fevereiro 2019.

GENTILE, P. et al. An overview of poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering. **Int J Mol Sci**, v. 15, n. 3, p. 3640-3659, Fev., 2014.

GEORGIEVA, M. et al. Antigenic Variation in *Streptococcus pneumoniae* PspC Promotes Immune Escape in the Presence of Variant-Specific Immunity. **mBio**, v. 9, n. 2, e00264-18, Mar., 2018

GENO, K. A. et al. Pneumococcal Capsules and Their Types: Past, Present, and Future. **Clin Microbiol Rev**, v. 28, n. 3, p. 871-99, Jul 2015.

GHADI A. et al. Synthesis and optimization of Chitosan nanoparticles: Potential applications in nanomedicine and biomedical engineering. **Caspian J Intern Med**, v. 5, n. 3, p. 156-161, Fev., 2014.

GHOTBI, Z. et al. Active targeting of dendritic cells with mannan-decorated PLGA nanoparticles. **J Drug Target**, v. 19, n. 4, p. 281-292, Mai., 2011.

GOULART, C. et al. Recombinant BCG expressing a PspA-PdT fusion protein protects mice against pneumococcal lethal challenge in a prime-boost strategy. **Vaccine**, v. 35, n. 13, p. 683-1691, Mar., 2017

HABER. M et al. Herd immunity and pneumococcal conjugate vaccine: a quantitative model. **Vaccine**. v. 25, n. 29, p. 5390-5398, Jul., 2007.

HARRISON, R. G. et al. **Bioseparations Science and Engineering**. Nova Iorque: Oxford University Press, 2015.

HENRIQUES-NORMARK, B., TUOMANEN, E. I. The pneumococcus: epidemiology, microbiology, and pathogenesis. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 3, n. 7, p. 1-15, Jul., 2013)

HIRST, R. A. et al. The role of pneumolysin in pneumococcal pneumonia and meningitis. **Clin Exp Immunol**, v. 138, p. 195-201, Jul., 2004

HOLLINGSHEAD, S. K., BECKER, R., BRILES, D. E. Diversity of PspA: Mosaic Genes and Evidence for Past Recombination in *Streptococcus pneumoniae*. **Infect Immun**, v. 68, n. 10, p. 5889-5900, Oct., 2000

HOLMGREN, J.; CZERKINSKY, C. Mucosal immunity and vaccines. **Nat Med**. v. 11, n. 4, p. s45-s53, Apr., 2005.

HOU, E. W. High-level expression and purification of untagged and histidine-tagged HIV-1 reverse transcriptase. **Protein Expr Purif**, v. 34, n. 1, p. 75-86, Mar., 2004.

HSU, H. E., et al. Effect of pneumococcal conjugate vaccine on pneumococcal meningitis. **N Engl J Med**. v. 360, n. 3, p. 244-256, Jan., 2009

HUANG, J. et al. A novel dry powder influenza vaccine and intranasal delivery technology: induction of systemic and mucosal immune responses in rats. **Vaccine**, v. 23, n. 6, p. 794-801, Dec., 2004.

HUANG, S. S. et al. Post-PCV7 changes in colonizing pneumococcal serotypes in 16 Massachusetts communities, 2001 and 2004. **Pediatrics**, v. 116, n. 3, p. e408-13, Sep 2005.

HUANG, W. C.; KIM, J. D. Cationic surfactant-based method for simultaneous harvesting and cell disruption of a microalgal biomass. **Bioresour Technol**, v. 149, p. 579-581, Dec., 2013.

HUANG, U.; CAMBRE, M.; LEE, H. The Toxicity of Nanoparticles Depends on Multiple Molecular and Physicochemical Mechanisms. **Int J Mol Sci**, v. 18, n. 12, p. 2702-2715, Dec., 2017.

JEDRZEJAS, M. J.; LAMANI, E.; BECKER, R. S. Characterization of selected strains of *Pneumococcal surface protein A*. **J Biol Chem**, v. 276, n. 35, p. 33121-33128, Jun., 2001.

JIANG, J. et al. Does Nanoparticle Activity Depend upon Size and Crystal Phase? **Nanotoxicology**, v. 2, n. 1, p. 33-42, Mar., 2008.

JOHNSTON, J. W. et al. Lipoprotein PsaA in Virulence of *Streptococcus pneumoniae*: Surface Accessibility and Role in Protection from Superoxide. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 10, p. 5858-5867, Oct., 2004.

KADIOGLU, A. et al. Host immune response to pneumococcal lung infection in mice. **Infect Immun**, v. 68, n. 2, p. 492-501, Feb., 2000.

KADIOGLU, A. et al., Upper and lower respiratory tract infection by *Streptococcus pneumoniae* is affected by pneumolysin deficiency and differences in capsule type. **Infect Immun**, v. 70, n. 6, p. 2886-2890, Jun., 2002.

KALKANIDIS, M. et al. Methods for nano-particle based vaccine formulation and evaluation of their immunogenicity. **Methods**, v.40, n. 1, p.20-29, Set., 2006.

KAMTCHOUA, T. et al. Safety and immunogenicity of the pneumococcal pneumolysin derivative PlyD1 in a single-antigen protein vaccine candidate in adults. **Vaccine**, v. 31, n. 2, p. 327-333, Jan., 2013.

KARAGOUNI, E. et al. Uptake of BSA-FITC Loaded PLGA Nanoparticles by Bone Marrow-Derived Dendritic Cells Induces Maturation But Not IL-12 or IL-10 Production. **Nanosci Nanotech Let**, v. 5, n. 4, p. 498-504, Abr., 2013.

KAI, W. et al. Cytotoxic effects and the mechanism of three types of magnetic nanoparticles on human hepatoma BEL-7402 cells. **Nanoscale Res Lett**, v. 29, n. 6, p. 480-490, Jul., 2011.

KHAN, M. N.; PICHICHERO, M. E. Vaccine candidates PhtD and PhtE of *Streptococcus pneumoniae* are adhesins that elicit functional antibodies in humans. **Vaccine**, v. 30, p. 2900-2907. Feb., 2012.

KIM, H. et al. Amphiphilic Poly(Amino Acid) Nanoparticles Induce Size-Dependent Dendritic Cell Maturation. **Adv Funct Mater**, v. 20, p. 3925-3931, Set., 2010.

KIM, L. et al. Biological and Epidemiological Features of Antibiotic-Resistant *Streptococcus pneumoniae* in Pre- and Post-Conjugate Vaccine Eras: a United States Perspective. **Clin Microbiol Rev**, v.3, p. 525-552, Jul., 2016.

KRASCHOWETZ, S. **Clonagem, produção e purificação de uma molécula recombinante híbrida estável de duas proteínas de *Streptococcus pneumoniae* unidas por espaçador molecular: PspA94-PdT**. 192 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil. 2018.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. V. 75, n. 1, p. 1-18, Jan., 2010.

KUNDA, N. K. et al. Nanocarriers targeting dendritic cells for pulmonary vaccine delivery. **Pharm Res**, v. 30, n. 2, p. 325-341, Fev., 2013.

KUNDA, N. K. et al. Bovine serum albumin adsorbed PGA-co-PDL nanocarriers for vaccine delivery via dry powder inhalation. **Pharm Res**, v. 32, n. 4, p. 1341-1351, Abr., 2015.

KUNDA, N. K. et al. Pulmonary dry powder vaccine of pneumococcal antigen loaded nanoparticles. **Int J Pharm**, v. 495, n. 2, p. 903-912, Nov., 2015.

KURAKI, T. et al. A novel oral neutrophil elastase inhibitor (ONO-6818) inhibits human neutrophil elastase-induced emphysema in rats. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 166, n. 4, p. 496-500, Ago., 2002.

LABIRIS, N. R.; DOLOVICH, M. B. Pulmonary drug delivery. Part II: The role of inhalant delivery devices and drug formulations in therapeutic effectiveness of aerosolized medications. **Br J Clin Pharmacol**, v. 56, n. 6, p. 600-612, Dez., 2003.

LANDER, R. J. et al. Fractional precipitation of plasmid DNA from lysate by CTAB. **Biotechnol Bioeng**, v. 79, n. 7, p. 776-784, Set., 2002.

LEE, J. H. et al. Rod-shaped iron oxide nanoparticles are more toxic than sphere-shaped nanoparticles to murine macrophage cells. **Environ Toxicol Chem**, v. 33, n. 12, p. 2759-2766, Dez., 2014.

LEROUX-ROELS, G. et al., Safety, reactogenicity and immunogenicity of a novel pneumococcal protein-based vaccine in adults: a phase I/II randomized clinical study. **Vaccine**, v. 32, n. 50, p. 6838-6846, Nov., 2014.

LIÑARES, J. et al. Changes in antimicrobial resistance, serotypes and genotypes in *Streptococcus pneumoniae* over a 30-year period. **Clin Microbiol Infect**, v. 16, n. 5, p. 402-10, May., 2010.

LOPES, A. J.; NORONHA, A. J.; MAFORT, T. T. **Mecanismos de Defesa do Aparelho Respiratório**. Disponível em: < http://revista.hupe.uerj.br/detalhe_artigo.asp?id=157> 2010. Acesso em: 25 fev. 2019.

LU, J. et al. Detoxified pneumolysin derivative Plym2 directly protects against pneumococcal infection via induction of inflammatory cytokines. **Immunol Invest**, v. 43, n. 7, p. 717-726, Jul., 2014.

LU, W. et al. Split intein facilitated tag affinity purification for recombinant proteins with controllable tag removal by inducible auto-cleavage. **J. Chromatogr A**, v. 1218, n. 18, p. 2553-2560, Mai., 2011.

MAMO, T.; POLAND, G. A. Nanovaccinology: The next generation of vaccines meets 21st century materials science and engineering. **Vaccine**, v. 30, n. 47, p. 6609-6611, Out., 2012.

MANISH, M. et al. A single-dose PGLA encapsulated protective antigen domain 4 nanoformulaion protects mice against *Bacillus anthracis* spore challenge. **PLoS ONE**, v.8, n. 4, e61885-90, Abr., 2013.

MANOLOVA, V. et al. Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size. **Eur J Immunol**, v. 38, n. 5, p. 1404-1413. Maio., 2008.

MARPLE, V. A. et al. Next Generation Pharmaceutical Impactor (A New Impactor for Pharmaceutical Inhaler Testing). Part I: Design. **J. Aerol Med**, v. 16, n. 3, p. 283-299, Mai., 2003.

MARTHOS, B. V. et al. Capsular polysaccharide production by *Streptococcus pneumoniae* serotype 1: from strain selection to fed-batch cultivation. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 99, n. 24, p. 10447-10456, Dez., 2015.

MCCALL, R. L.; SIRIANNI, R. W. PLGA nanoparticles formed by single- or double-emulsion with vitamin E-TPGS. **J Vis Exp**, v. 82, e51015, Dez., 2013.

MCGHEE, J. R. et al. The common mucosal immune system: from basic principles to enteric vaccines with relevance for the female reproductive tract. **Reprod Fertil Dev**, v. 6, n. 3, p. 369-379, Jun. 1994.

MENZEL, et al. M. Inhalative vaccination with pneumococcal polysaccharide in healthy volunteers. **Vaccine**, v. 23, n. 43, p. 5113–5119, Out., 2005.

MEYER, P. et al. Inhalative vaccination with pneumococcal polysaccharide in patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Vaccine**, v. 24, n. 31-32, p. 5832-5838, Jun., 2006.

MIYAJI, E. N. et al. Serotype-independent pneumococcal vaccines. **Cell Mol Life Sci**, v. 70, n. 18, p. 3303-26, Sep 2013.

MMAD Calculator. Disponível em < <http://www.mmadcalculator.com/>> Acesso em: Nov., 2018.

MOHAMMED, M. A. et al. An Overview of Chitosan Nanoparticles and Its Application in Non-Parenteral Drug Delivery. **Pharmaceutics**, v. 9, n. 4, E53, Nov., 2017.

MORENO, A. T. et al. Immunization of Mice with Single PspA Fragments Induces Antibodies Capable of Mediating Complement Deposition on Different Pneumococcal Strains and Cross-Protection. **Clinical and Vaccine Immunology**. v. 17, n. 3, p. 439-446. Mar., 2010.

MUFLIAH, H. et al. Sequential pulmonary immunization with heterologous recombinant influenza A virus tuberculosis vaccines protects against murine M. tuberculosis infection. **Vaccine**, v. 36, n. 18, p. 2462-2470, Abr., 2018.

MUKERJI, R. et al. Pneumococcal Surface Protein A Inhibits Complement Deposition on the Pneumococcal Surface by Competing with the Binding of C-Reactive Protein to Cell-Surface Phosphocholine. **J Immunol**, v. 189, p. 5327-5335, Out., 2012.

MUKERJI, R. et al. The diversity of the proline-rich domain of pneumococcal surface protein A (PspA): Potential relevance to a broad-spectrum vaccine. **Vaccine**, v. 36, n. 45, p. 6834-6843. Out., 2018.

NABORS, G. S. et al. Immunization of healthy adults with a single recombinant pneumococcal surface protein A (PspA) variant stimulates broadly cross-reactive antibodies to heterologous PspA molecules. **Vaccine**, v. 18, n. 17, p. 1743-54, Mar 2000.

NANDA, R.K.; et al. An effective mannosylated chitosan nanoparticle DNA vaccine for FMD virus. **Virol Sin**, v.27, n. 6, p.373-376, Dez., 2012.

NANDOSKAR, M. et al. Inhibition of human monocyte respiratory burst, degranulation, phospholipid methylation and bactericidal activity by pneumolysin. **Immunology**, v. 59, n. 4, p. 515-520, Dez., 1986.

NARDELLI-HAEFLIGER, D. et al Immune responses induced by lower airway mucosal immunisation with a human papillomavirus type 16 virus-like particle vaccine. **Vaccine**, v. 23, n. 28, p. 3634–3641, Mai., 2005.

NETTER, Frank H. **Atlas de Anatomia Humana**. 2ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. **Informe Regional de SIREVA II, 2012. Datos por país y por grupos de edad sobre las características de los aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis*, en procesos invasores**. Washington DC: www.paho.org 2013

PAUKSENS, K. et al. Randomized controlled study of the safety and immunogenicity of pneumococcal vaccine formulations containing PhtD and detoxified pneumolysin with alum or adjuvant system AS02V in elderly adults. **Clin Vaccine Immunol**, v. 21, n. 5, p. 651-660, Mai., 2014.

PEEK, L.J.; MIDDAUGH, C.R.; BERKLAND, C. Nanotechnology in vaccine delivery. **Adv Drug Deliv Rev**, v.60, n. 8, p.975-928, Mai., 2008.

PRASAD S., et al. Polymer nanoparticles containing tumor lysates as antigen delivery vehicles for dendritic cell-based antitumor immunotherapy. **Nanomedicine**, v. 7, n. 1, p. 1-10, Fev., 2011.

PRYMULA, R. et al. Safety and immunogenicity of an investigational vaccine containing two common pneumococcal proteins in toddlers: A phase II randomized clinical trial. **Vaccine**, v. 32, n.25, p. 3025-3034, Abr., 2014.

PRYMULA, R. et al. Safety, reactogenicity and immunogenicity of two investigational pneumococcal protein-based vaccines: Results from a randomized phase II study in infants. **Vaccine**, v. 35 n. 35, p. 4603-4611, Ago., 2017.

PURI S.; et al. Drug incorporation and release of water soluble drugs from novel functionalised poly(glycerol adipate) nanoparticles. **J. Control Release**. v.125, n.1, p.59–67, Jan., 2008.

QINSUN. **Next Generation Impactor**. Disponível em <<http://www.qinsun-lab.com/571.html#>> Acesso em: Fevereiro, 2019.

RITCHER, S. S. et al. Pneumococcal serotypes before and after introduction of conjugate vaccines, United States, 1999-2011(1.). **Emerg. Infect Dis**. v. 19, n. 7. P. 1074-1083. Jul., 2013.

ROCK, J. R.; RANDELL, S. H.; HOGAN, B. L. Airway basal stem cells: a perspective on their roles in epithelial homeostasis and remodeling. **Dis Model Mech**, v. 3, n. 9-10, p. 545-556, Set-Out., 2010.

RODRIGUES, T. C. et al. Mucosal immunization with PspA (Pneumococcal surface protein A)-adsorbed nanoparticles targeting the lungs for protection against pneumococcal infection **PLoS One**, v. 13, n. 1, e0191692, Jan., 2018.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 2ª Edição. Cárita Editora. Campinas, 2009

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. **Front Microbiol**, v. 5, p. 1-17, Abr., 2014.

ROSSJOHN, J. et al. The molecular mechanism of pneumolysin, a virulence factor from Streptococcus pneumoniae. **J Mol Biol**, v. 284, n. 2, p. 449-61, Nov 1998.

ROTH, G. A. et al. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. **The Lancet**, v.392, p. 1736-1788, Nov., 2018.

SALEEM, I. Y. et al. Improving peptide-based assays to differentiate between vaccination and Mycobacterium bovis infection in cattle using nanoparticle carriers for adsorbed antigens. **J Control Release**, v. 102, n. 3, p. 551-561, Fev., 2005.

SAKAGAMI, M. In vivo, in vitro and ex vivo models to assess pulmonary absorption and disposition of inhaled therapeutics for systemic delivery. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 58, n. 9-10, p. 1030-1060, Out., 2006.

SEIFI, T. et al. Amplification of GC-rich Putative Mouse PeP Promoter using Betaine and DMSO in Ammonium Sulfate Polymerase chain reaction Buffer. **Avicenna J Med Biotechnol**, v. 4, n. 4, p. 206-209, Out-Dez., 2012.

SENKOVICH, O. et al. Structure of a complex of human lactoferrin N-lobe with pneumococcal surface protein a provides insight into microbial defense mechanism. **J Mol Biol**, v. 370, n. 4, p. 701-13, Jul 2007.

SINGLETON, R. J. et al. Invasive pneumococcal disease caused by nonvaccine serotypes among alaska native children with high levels of 7-valent pneumococcal conjugate vaccine coverage. **JAMA**. V. 297, n. 16, p. 1784-1792, Abr., 2007.

SHAFI, N. Optimization of DNA extraction and pcr protocol for rapid analysisoftorputitora. **J Anim Plant Sci**, v. 25, n. 3, p. 536-541, Jan., 2015.

SHAH, P.; SWIATLO, E. Immunization with Polyamine Transport Protein PotD Protects Mice. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 10, p. 5888-5892, Out., 2006.

SHAH, S. S.; CHA, Y.; PITT, C. G. Poly (glycolic acid-co-dl-lactic acid): diffusion or degradation controlled drug delivery? **J Control release**, v. 18, n. 3, p. 261-270. Jan., 1992.

SHAMEZ, L. N. et al. Rapid increase in non-vaccine serotypes causing invasive pneumococcal disease in England and Wales, 2000–17: a prospective national observational cohort study. **Lancet Infect Dis**, v.18, p. 441-451, Jan., 2018

SHARMA, S. et al. PLGA-based nanoparticles: A new paradigm in biomedical applications. **Trac-Trend Anal Chem**, v. 80, p. 30-40, Jun., 2016.

SHI, C. et al. A general purification platform for toxic proteins based on intein trans-splicing. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 98, n. 22, p. 9425-9435, Nov., 2014.

SONNEN, A. F. P.; PLITZKO, J. M.; GILBERT, R. J. C. Incomplete pneumolysin oligomers form membrane pores. **Open Biol**, v. 4, n. 4, 140044, Abr., 2014.

SOU, T. et al. New developments in dry powder pulmonary vaccine delivery. **Trends Biotechnol**, v. 29, n. 4, p. 191–198, Abr., 2011.

SPOND, J. et al. Inhibition of experimental acute pulmonary inflammation by pirfenidone. **Pulm Pharmacol Ther**, v. 16, n. 4, p. 207-214, Ago., 2003.

STRUBE, J. et al. Process Development and Design of Downstream Processes. **Chemie Ingenieur Technik**, v. 83, n. 7, p. 1044-1065 Abr., 2011.

TAWFEEK H.M.; et al. PGA-co-PDL as a novel carrier for pulmonary drug delivery. **7th world meeting in pharmaceutic, biopharmaceutics and industrial pharmacy**. Malta, 2010.

TAWFEEK et al. Poly(glycerol adipate-co- ω -pentadecalactone) spray-dried microparticles as sustained release carriers for pulmonary delivery. **Pharm Res**, v. 28, n. 9, p. 2086-2097, Set., 2011.

TAWFEEK et al. Dry powder inhalation of macromolecules using novel PEG-co-polyester microparticle carriers. **Int J Pharm**, v. 441, n. 1-2, p. 611-619, Jan., 2013.

TIAN, J.; YU J. Poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles as candidate DNA vaccine carrier for oral immunization of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) against lymphocystis disease virus. **Fish Shellfish Immunol**, v. 30, n. 1, p. 109-117, Jan., 2011.

THOMAS C. et al. Aerolized PLGA nanoparticles enhance humoral, mucosal and cytokine responses to hepatitis B vaccine. **Mol Pharm**, v.8, n. 2, p.405-415, Abr., 2011

THOMPSON C.J., et al. Evaluation of ibuprofen-loaded microspheres prepared from novel copolyesters. **Int J Pharm**. v.329, n.1–2, p.53–61, Fev., 2007.

TOSTES, R. O. et al. Protection Elicited by Nasal Immunization with Recombinant Pneumococcal Surface Protein A (rPspA) Adjuvanted with Whole-Cell Pertussis Vaccine (wP) against Co-Colonization of Mice with *Streptococcus pneumoniae*. **PLoS One**, v. 19, n. 12, e0170157, Jan., 2017.

TOUEILLE, M. et al. Designing new monoclonal antibody purification processes using mixed-mode chromatography sorbents., **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 879, n. 13-14, p. 836-843, Abr., 2011.

TOMANEE, P.; HSU, J. T.; ITO, Y. Fractionation of protein, RNA, and plasmid DNA in centrifugal precipitation chromatography using cationic surfactant CTAB containing inorganic salts NaCl and NH₄Cl. **Biotechnol Bioeng**, v. 88, n. 1, p. 52-59, Out., 2004.

TONNIS, W. F. et al. Pulmonary vaccine delivery: A realistic approach? **J Aerosol Med Pulm Drug Deliv**, v. 25, n. 5, p. 249-260, Out., 2012.

TRAPPETTI, C.; OGUNNIYI, A. D.; PATON, J. C. Extracellular matrix formation enhances the ability of *Streptococcus pneumoniae* to cause invasive disease. **PLoS One**, v. 6, n. 5: e19844, Mai., 2011.

TYLLEY, S. J. et al. Structural basis of pore formation by the bacterial toxin pneumolysin. **Cell**, v. 121, n. 2, p. 247-256, Abr., 2005.

VADESILHO, C. F. M. et al . Characterization of the antibody response elicited by immunization with pneumococcal surface protein A (PapA) as recombinant protein or DNA vaccine and analysis of protection against an intranasal lethal challenge with *Streptococcus pneumoniae*. **Microb Pathog**, v. 53, n. 5-6, p. 243-249, Nov-Dez., 2012.

VAN PEE, K. et al. CryoEM structures of membrane pore and prepore complex reveal cytolytic mechanism of Pneumolysin. **eLIFE**, v. 6, e23644, Mar., 2017.

VERANI, J. R. et al. Indirect cohort analysis of 10-valent pneumococcal conjugate vaccine effectiveness against vaccine-type and vaccine-related invasive pneumococcal disease. **Vaccine**, v. 33, n. 46, p. 6145-6148, Nov., 2015.

VICENTE, G. et al. Application of the factorial design of experiments and response surface methodology to optimize biodiesel production. **Ind Crop Prod**, v. 8, n. 1, p. 29-35, Mar., 1998.

VIEIRA, A. C. et al. *Streptococcus pneumoniae*: a study of strains isolated from cerebrospinal fluid. **J Pediatr (Rio J)**, v. 83, n. 1, p. 71-8, 2007 Jan-Feb., 2007.

WANG, H. et al., Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015, **Lancet**, v. 388, p. 1459-1544, Out., 2016

WANG, M. et al. Preparation, characterization, and in vitro and in vivo investigation of chitosan-coated poly (d,l-lactide-co-glycolide) nanoparticles for intestinal delivery of exendin-4. **Int J Nanomedicine**, v. 8, p. 1141-1154, Mar., 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of pneumococcal conjugate vaccines.** 2009. Disponível em [http://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines /pneumo/en/](http://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/pneumo/en/). Acesso em. Dezembro 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO position paper on pneumococcal vaccines** 2012.

WU, J.; FILUTOWICZ, M. Hexahistidine (His6)-tag dependent protein dimerization: a cautionary tale. **Acta Biochim Pol**, v. 46, n. 3, p. 591-599. Jun., 1999.

YOSHIHISA, H. **Process for producing vaccine for bacterial toxin belonging to RTX toxin family.** 1999. Patente Canadense número CA 02109233.