Lazara Elena Santiesteban Lores

**Síntese, caracterização e avaliação imunológica
de conjugados do sorotipo 6B de *Streptococcus
pneumoniae* à proteína A de superfície pneumocócica
(PspA)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação Interunidades em Biotecnologia
USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do
título de Mestre em Biotecnologia

São Paulo
2016

Lazara Elena Santiesteban Lores

**Síntese, caracterização e avaliação imunológica de
conjugados do sorotipo 6B de *Streptococcus pneumoniae*
à proteína A de superfície pneumocócica (PspA)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Martha Massako Tanizaki

Coorientadora: Dra. Giovana Cappio Barazzzone

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo
2016

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Lores, Lazara Elena Santiesteban.

Síntese, caracterização e avaliação imunológica de conjugados do sorotipo 6B de *Streptococcus pneumoniae* à proteína A de superfície pneumocócica (PspA) / Lazara Elena Santiesteban Lores. -- São Paulo, 2016.

Orientador: Profa. Dra. Martha Massako Tanizaki.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Vacinas conjugadas.

Versão do título para o inglês: Synthesis, characterization and immunological evaluation of conjugates from *Streptococcus pneumoniae* serotype 6B and pneumococcal surface protein A (PspA).

1. Vacinas conjugadas 2. *Streptococcus pneumoniae* 3. PspA I. Tanizaki, Profa. Dra. Martha Massako II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB048/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Lazara Elena Santiesteban Lores.

Título da Dissertação: Síntese, caracterização e avaliação imunológica de conjugados do sorotipo 6B de *Streptococcus pneumoniae* à proteína A de superfície pneumocócica (PspA).

Orientador(a): Profa. Dra. Martha Massako Tanizaki.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

(☐) **Aprovado(a)**

(☐) **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Estudo de especificidade do PspA clado1 e PspA clado 3 conjugado ao polissacarídeo capsular sorotipo 6B de *Streptococcus pneumoniae*", protocolo nº 1280/14, sob a responsabilidade de Martha Massako Tanizaki e Lazara Elena Santiesteban Lores - que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 20/8/2014.

This is to certify that the proposal "Specificity study of PspA clade 3 and clade1 conjugated to capsular polysaccharide serotype 6B of *Streptococcus pneumoniae*", protocol nº 1280/14, under the responsibility of Martha Massako Tanizaki and Lazara Elena Santiesteban Lores - which involves the breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings) - has been reviewed by the Institute Butantan Animal Care and Use Committee and approved in 8/20/2014. This proposal is in accordance with standards outlined by Brazilian laws for use of experimental animals, and with ethical principles adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation.

Vigência do Projeto: 08/2014 - 10/2015 Centro de Biotecnologia	Nº de animais/espécie 90 Camundongos Balb/c 18-22g (F)
---	--

São Paulo, 21 de agosto de 2014

Dra. Walea H. K. Cabrera
Coordenadora da CEUAIB

Aos meus pais pelo amor e apoio incondicionais, por incentivar em mim desde tenra idade o hábito de estudar, conhecer e aprender; e aos quais devo, em grande parte, o que hoje sou.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por mi conduzir na vida, por me trazer até aqui e me permitir vencer, sobre desafios e obstáculos, esta etapa da minha carreira profissional.

Aos meus pais e minha família em geral pela preocupação constante e que mesmo à distância foram uma fonte de apoio.

Às minhas orientadoras Dra. Martha Massako Tanizaki e Dra. Giovana Cappio Barazzone pela orientação deste trabalho.

Às meninas do laboratório: Míriam, Priscila, Eliane pelo auxílio técnico prestado. A Luciene pela amizade e confiança, por todas as conversas e experiências trocadas e por ser um ombro amigo nos momentos difíceis.

Ao Joaquin pela ajuda prestada durante o desenvolvimento deste trabalho e pela disposição a esclarecer dúvidas.

Ao Enéas pela disposição em ajudar com os ensaios de dicroísmo circular, pelas sugestões feitas e ideias intercambiadas.

A Félix por sua amizade e confiança, por seus conselhos e pelos conhecimentos oferecidos.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro e pela oportunidade concedida através do PEC-PG, pois este aprendizado foi de fundamental importância para minha superação profissional e acadêmica.

A todos os amigos que ajudaram em um determinado momento e aqueles que por ventura deixei de mencionar e contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

Muito obrigada a todos!

RESUMO

SANTIESTEBAN-LORES, L. E. **Síntese, caracterização e avaliação imunológica de conjugados do sorotipo 6B de *Streptococcus pneumoniae* à proteína A de superfície pneumocócica (PspA).** 2016. 107 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Streptococcus pneumoniae é uma das principais causas de doenças infecciosas bacterianas principalmente em crianças abaixo de dois anos de idade. O Polissacarídeo capsular (Ps) é o principal fator de virulência do pneumococo, mas devido a sua natureza timo independente as vacinas polissacarídicas não são eficazes em crianças menores de 2 anos. A conjugação do Ps a uma proteína transforma o antígeno de timo independente para timo dependente com a consequente indução de memória imunológica. Estas vacinas são eficazes na redução da doença pneumocócica, porém depois de sua introdução tem se verificado um aumento do número de doenças provocadas por sorotipos não vacinais. O emprego de proteínas conservadas da bactéria como a PspA é uma alternativa promissora para resolver o problema da substituição de sorotipos. A PspA é uma proteína altamente imunogênica exposta na superfície da bactéria e nosso grupo tem avaliado seu uso como proteína carreadora conjugada a Ps capsulares do pneumococo na expectativa de aumentar a cobertura da vacina com um número pequeno de sorotipos. Neste trabalho a PspA foi empregada como proteína carreadora conjugada ao sorotipo 6B de *S. pneumoniae*. Inicialmente a PspA de clados 1 e 3 foram purificadas e obtidas em pureza maior de 90%. A PspA foi conjugada ao Ps 6B por dois métodos de conjugação. A conjugação intermediada pelo agente ativador cloreto de 4- (4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il) -4-metilmorfolino (DMT-MM) gerou rendimentos de Ps entre 20 e 30%, no entanto este tipo de conjugado não induziu anticorpos anti-PspA. Por outro lado, a conjugação por aminação redutiva possibilitou obter rendimentos de Ps entre 50 e 60% e os conjugados induziram elevados títulos de anticorpos anti-PspA em camundongos Balb/c, que foram capazes de promover a fagocitose da bactéria; no entanto, a resposta de anticorpos anti-Ps 6B foi baixa. A análise estrutural dos conjugados por dicroísmo circular não forneceu dados suficientes para estabelecer uma correlação entre perda de estrutura e a perda de imunogenicidade observada para os conjugados sintetizados via DMT-MM.

Palavras-chave: *Streptococcus pneumoniae*. Conjugação. PspA.

ABSTRACT

SANTIESTEBAN-LORES, L. E. **Synthesis, characterization and immunological evaluation of conjugates from *Streptococcus pneumoniae* serotype 6B and Pneumococcal Surface Protein A (PspA)**. 2016. 107 p. Master Thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Streptococcus pneumoniae is one of the main causes of bacterial infectious diseases, especially in children under two years of age. The capsular polysaccharide (Ps) is the major virulence factor of pneumococcus, but due to its thymus independent nature, polysaccharide vaccines are not effective in children younger than two years. The chemical coupling of polysaccharide to a carrier protein converts the polysaccharide from a thymus independent into a thymus dependent antigen allowing the induction of immunological memory. Consequently, conjugate vaccines have brought an important public health benefit reducing the burden of pneumococcal disease. However, after the introduction of these vaccines in immunization programs an increase in the number of illnesses due to non-vaccinal serotypes has been observed. The use of conserved proteins from the bacterium such as Pneumococcal Surface Protein A (PspA) is a promising alternative to solve the problem of serotype replacement. The PspA is a highly immunogenic protein exposed on the surface of the bacterium, and our group has been evaluating its use as a carrier protein conjugated to capsular Ps from the pneumococcus, aiming to widen the vaccine coverage with a small number of serotypes. In this work, PspA was employed as a carrier protein conjugated to *Streptococcus pneumoniae* serotype 6B. Initially PspA clade 1 and PspA clade 3 were purified; both proteins were recovered with more than 90% purity. The PspA was conjugated to Ps 6B by two conjugations methods. The conjugation intermediated by activator agent 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholine chloride (DMT-MM) allowed Ps yields between 20 and 30%, however this conjugates did not induce anti-PspA antibodies. On the other hand, conjugation by reductive amination led to Ps yields between 50 and 60% and induced high anti-PspA antibodies titers in Balb/c mice that were able to promote phagocytosis of the bacterium; nevertheless, polysaccharide 6B induced low antibody titers. The protein conjugate structural analysis by circular dichroism did not provide enough data to establish a correlation between loss of structure and immunogenicity observed for the conjugates synthesized via DMT-MM.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*. Conjugation. PspA

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADH – diidrazida do ácido adípico

ADN –ácido desoxirribonucleico

Al(OH)₃ – hidróxido de alumínio

ANOVA – Análise de Variâncias

APC - '*Antigen Presenting Cell*' (Célula Apresentadora de Antígenos)

ATCC – '*American Type Culture Collection*'

BCA – 'bicinchoninic acid' (ácido bicinchonínico)

BSA – albumina de soro bovino

CD – '*circular dichroism*' (dicroísmo circular)

CDAP – 1-ciano-4-dimetilaminopiridina

CDR – '*Clade Defining Region*' (região definidora de clado)

CNBr – brometo de cianogênio

DCC – dicicloexil carbodiimida

DIC – diisopropil carbodiimida

DMT-MM – 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-morfolino

DO – densidade óptica

DPI- Doença Pneumocócica Invasiva

EDAC – 1-etil-3,3-dimetilaminopropil carbodiimida

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA – '*Enzyme linked immunosorbent assay*' (Ensaio imunoenzimático adsorbido sobre fase sólida)

EMA- '*European Medicines Agency*' (Agência Europeia de Medicamentos)

HCl – ácido clorídrico

HPLC – '*High Performance Liquid Chromatography*' (Cromatografia líquida de alta eficiência)

IgG – imunoglobulina de classe G

IgM – imunoglobulina de classe M

IMAC – ‘Immobilized metal affinity chromatography’ (cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados)

LTh – Linfócito T auxiliador

MES- ‘2-(*N-morpholino*) ethanesulfonic acid (ácido 2-(N-morfolino) etanossulfônico

MHC-II – ‘*Major Histocompatibility Complex- Class II*’ (Complexo Principal de Histocompatibilidade classe II)

NaBH₃CN – cinoboroidreto de sódio

NaBH₄ – boroidreto de sódio

NaCl – cloreto de sódio

NaIO₄ – periodato de sódio

NamA - Neuraminidase A

NaOH – hidróxido de sódio

NiSO₄ – sulfato de níquel (II)

OCT- 1,8-diaminooctano

OMS – Organização Mundial da Saúde

OPA – ‘*Opsonophagocytic Assay*’ (Ensaio de opsonofagocitose)

PBS – ‘*phosphate buffered saline*’ (tampão fosfato salino)

PCV-10 – ‘*10 valent Pneumococcal Conjugate Vaccine*’ (Vacina 10 valente anti-pneumocócica conjugada)

PCV-13 – ‘*13 valent Pneumococcal Conjugate Vaccine*’ (vacina 13 valente anti-pneumocócica conjugada)

PCV-7 – ‘*Heptavalent Pneumococcal Conjugate Vaccine*’ (Vacina heptavalente anti-pneumocócica conjugada)

pI – ponto isoelétrico

Ply - pneumolisina

PMSF – ‘*phenylmethylsulfonyl fluoride*’ (fluoreto de fenilmetanosulfonila)

PNI – Programa Nacional de Imunização

PRP – poli-ribosil-ribitolfosfato

Ps – Polissacarídeo capsular

PsaA - '*Pneumococcal surface adhesin A*' (Adesina A de superfície pneumocócica)

PspA - '*Pneumococcal surface protein A*' (Proteína A de superfície pneumocócica)

PspC - '*Pneumococcal surface protein C*' (Proteína C de superfície pneumocócica)

SDS-PAGE – '*sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*'
(eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio)

Sulfo-NHS – sulfo- N-hidroxisuccinimida

TCR - '*T-cell Receptor*' (Receptor para antígenos da célula T)

TD – toxóide diftérico

TFA – 'trifluoroacetic acid' (ácido trifluoroacético)

THY – Meio Todd-Hewitt acrescido de 0,05% de extrato de levedura

TNBS – ácido-2,4,6-trinitrobenzenossulfônico

TNF - '*Tumor Necrosis Factor*' (Fator de necrose tumoral)

TT – toxóide tetânico

UFC – Unidade Formadora de Colônias

URO – Unidades repetitivas oxidadas

WCV – vacina anti-pneumocócica de células completas inactivada

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Rota patogênica da infecção por *S. pneumoniae*..... - 22 -

Figura 2 - Modelo que explica o processamento e apresentação de vacinas conjugadas. Na vacina conjugada o polissacarídeo (representado por pontos azuis) ligado à proteína (representada por um quadrado) é reconhecido por uma imunoglobulina de superfície na célula B, internalizado e processado. Os peptídeos derivados da proteína carreadora então são apresentados pelo MHC II e reconhecidos pelo receptor para antígenos da célula T, evento que desencadeia a liberação de citocinas que auxiliam a célula B na proliferação, diferenciação a célula plasmática produtora de anticorpos, mudança do isotipo de imunoglobulina IgM para IgG, amadurecimento da afinidade dos anticorpos e diferenciação a células B de memória. - 25 -

Figura 3 - Porcentagem de isolados clínicos pertencentes aos sorotipos vacinais e não vacinais antes (Janeiro de 2006-Junho de 2010) e após a implementação da vacina *Synflorix* (Julho de 2010-Setembro de 2012) $p < 0,001$ - 27 -

Figura 4 - Representação esquemática dos diferentes tipos de conjugados polissacarídeo-proteína. (A): conjugado do tipo neoglicoproteína; (B): conjugado do tipo rede macromolecular. - 29 -

Figura 5 - Mecanismo da reação de aminação redutiva..... - 30 -

Figura 6 - Mecanismo da reação intermediada por carbodiimida. (A): O grupo carboxila (1) ataca o carbono eletrofílico da carbodiimida (2) formando um éster ativo (intermediário O-acilisouréia) (3). (B): Um nucleófilo, como os grupos amina presentes na proteína (5), ataca o carbono carbonílico do intermediário O-acilisouréia (3) formando a ligação amida (6) e liberando um derivado da uréia (2). (C): Adicionalmente, a N-hidroxisuccinimida (8) pode reagir com o intermediário O-acilisouréia (3) para formar um éster succinimídico reativo resistente à hidrólise (9) que pode ser atacado por um grupo amina primário (5) resultando na formação da ligação amida (6) e na regeneração da NHS (8). - 32 -

Figura 7 - Esquema do método de conjugação desenvolvido pelo grupo. (A): Oxidação das hidroxilas vicinais do Ps com conseqüente formação de grupos aldeídicos e ruptura da ligação carbono-carbono. (B): Derivatização do Ps oxidado com moléculas espaçadora contendo grupos amino (p.e. 1,8-diaminooctano). (C): Conjugação entre o Ps derivatizado e os grupos carboxila da proteína na presença do agente ativador DMT-MM..... - 33 -

Figura 8 - Esquema representativo da estrutura da PspA mostrando os 4 domínios da proteína. O domínio N-terminal em α -hélice (incluindo a região A e a região definidora de clado [região B]) a região rica em prolina, o domínio de ligação a colina formado por dez trechos repetitivos e a cauda C-terminal. - 37 -

Figura 9 - Estrutura da unidade repetitiva do polissacarídeo capsular do sorotipo 6B de <i>S. pneumoniae</i> , composta pelos monossacarídeos: α -D-glicose, α -D-galactose e α -L-ramnose; ribitol e um grupo fosfato.....	40 -
Figura 10 - Esquema representativo das etapas de purificação da PspA.	42 -
Figura 11 - Esquema representativo das etapas de obtenção dos conjugados e avaliação da resposta imune.....	43 -
Figura 12 - Fluxograma da purificação da rPspA3	45 -
Figura 13 - Fluxograma da purificação da rPspA1	46 -
Figura 14 - Perfil eletroforético das frações eluídas da coluna Q-Sepahrose durante a purificação da rPspA3. Gel de poliacrilamida 12%. Cada poço foi carregado com 10 μ g de proteína. Linha 1: Padrão de massa molecular (kDa); linha 2: Homogenato; linha 3: Homogenato clarificado; linha 4: QF1 (fração não adsorvida: fosfato 10 mM, NaCl 50 mM); linha 5: QF2 (fosfato 10 mM, NaCl 100 mM); linha 6: QF3 (fosfato 10 mM, NaCl 300 mM); linha 7: QF4 (fosfato 10 mM, NaCl 500 mM); linha 8: QF5 (limpeza: fosfato 10 mM, NaCl 1000 mM).	55 -
Figura 15 - Perfil eletroforético das frações eluídas da coluna IMAC-Sepahrose durante a purificação da rPspA3. Gel de poliacrilamida 12%. Linha 1: Padrão de massa molecular (kDa); linha 2: QF3 (fração da Q-Sepahrose); linha 3: NiF1(fração não adsorvida: fosfato 10 mM, NaCl 300 mM); linha 4: NiF2 (lavagem: fosfato 10 mM); linha 5: NiF3 (eluição: fosfato 10 mM, imidazol 200 mM); linha 6: NiF4 (limpeza: EDTA 200 mM); linha 7: fração pH 4; linha 8: fração crio 4.	56 -
Figura 16 - Perfil eletroforético das frações eluídas da coluna SP-Sepahrose durante a purificação da rPspA3. Gel de poliacrilamida 12%. Linha 1: Padrão de peso molecular (kDa); linha 2: fração pH 4; linha 3: fração crio 4; linha 4: SPF1(fração não adsorvida: acetato 25 mM); linha 5: SPF2 (eluição: acetato 25 mM, NaCl 500 mM); linha 6: SPF3 (eluição: acetato 25 mM, NaCl 600 mM); linha 7: SPF4 (eluição: acetato 25 mM, NaCl 700 mM); linha 8: SPF5 (lavagem: acetato 25 mM, NaCl 800 mM) linha 9: SPF6: (lavagem: acetato 2 5mM, NaCl 1000 mM); linha 10: SPF7 (limpeza: fosfato 25 mM, NaCl 1000 mM).	57 -
Figura 17 - Unidade repetitiva do Polissacarídeo capsular do sorotipo 6B. Setas vermelhas apontam os locais susceptíveis à hidrólise ácida	60 -
Figura 18 - Perfil cromatográfico do Ps 6B nativo (linha vermelha) e Ps 6B hidrolisado (linha azul) em coluna TSK-gel GMPWXL; cromatógrafo de HPLC <i>Agilent</i> . Fluxo 0,4 mL/min; fase móvel fosfato 0,01 M + NaCl 0,15 M, pH 7,5; detecção por índice de refração (IR).	60 -
Figura 19 - Unidade repetitiva do Polissacarídeo capsular do sorotipo 6B ressaltando os locais passíveis de sofrerem oxidação periódica.	62 -

- Figura 20** - Perfil cromatográfico do Ps 6B hidrolisado (linha vermelha) e Ps 6B oxidado (linha azul) em coluna TSK-gel GMPWXL; cromatógrafo de HPLC *Agilent*. Fluxo 0,4 mL/min; fase móvel fosfato 0,01 M + NaCl 0,15 M, pH 7,5; detecção por índice de refração (IR)..... - 63 -
- Figura 21** - Unidade repetitiva do Polissacarídeo capsular do sorotipo 6B representando o sítio de introdução do espaçador 1,8-diaminooctano..... - 63 -
- Figura 22** - Perfil cromatográfico do Ps 6B oxidado (linha vermelha) e Ps 6B-OCT (linha azul) em coluna TSK-gel GMPWXL; cromatógrafo de HPLC *Agilent*. Fluxo 0,4 mL/min; fase móvel fosfato 0,01 M + NaCl 0,15 M, pH 7,5; detecção por índice de refração (IR). - 64 -
- Figura 23** - Esquema representativo das etapas de conjugação via DMT-MM ... - 65 -
- Figura 24** - Perfil eletroforético da proteína modificada em gel de poliacrilamida com SDS 12%, coloração com azul Coomassie. Linha 1: rPspA1 modificada; linha 2: rPspA1 nativa; linha 3: Padrão de massa molecular (kDa); linha 4: rPspA3 nativa; linha 5: rPspA3 modificada..... - 66 -
- Figura 25** - Mecanismo de reação do DMT-MM. O grupo carboxila (1) ataca o carbono eletrofílico do anel triazínico do DMT-MM (2) gerando um intermediário reativo (3) e liberando o anel morfolino (4). O intermediário reativo (3) reage com um grupo amina (5) formando a ligação amida (6) e liberando o anel triazínico (7)... - 67 -
- Figura 26** - Cromatograma de purificação da reação de conjugação entre o Ps 6B-OCT e a rPspA1 (A) e entre o Ps 6B-OCT e a rPspA3 (B); em coluna Superose-12. Fase móvel: NaCl 0,15 M + fosfato 0,05 M, pH 7,0; fluxo: 0,5 mL/min..... - 68 -
- Figura 27** - Perfil eletroforético dos conjugados em gel de poliacrilamida com SDS 12%. (A, B e C): coloração com azul Coomassie; (D): coloração com reagente de Schiff. Linha 1: Padrão de massa molecular (kDa); linha 2: Conjugado 6B-PspA1; linha 3: rPspA1 modificada; linha 4: Conjugado 6B-PspA3; linha 5: rPspA3 modificada..... - 69 -
- Figura 28** - Título de anticorpos anti-PspA. (A): Resposta anti-PspA1; (B): Resposta anti-PspA3. Soro obtido na terceira sangria após a imunização dos conjugados 2 e 5 (Tabela 6) sintetizados via DMT-MM. (ns) indica diferenças não significativas. (*) indica diferenças significativas $p < 0,05$ (ANOVA fator único, teste de Tukey) - 71 -
- Figura 29** - Ensaio de reconhecimento de epítomos antigênicos na rPspA nativa, modificada e conjugada via DMT-MM. - 72 -
- Figura 30** - Título de anticorpos anti-PspA. Soro obtido na terceira sangria após a imunização dos conjugados 1 e 4 (Tabela 6) sintetizados via DMT-MM..... - 73 -
- Figura 31** - Título de anticorpos anti-PspA. Soro obtido na terceira sangria após a imunização dos conjugados 3 e 6 (Tabela 6) sintetizados via DMT-MM..... - 73 -

Figura 32 - Esquema representativo das etapas de conjugação por aminação redutiva - 76 -

Figura 33 - Perfil eletroforético da rPspA nativa e derivatizada com ADH em gel de poliacrilamida com SDS 12%; coloração com azul Coomassie. Linha 1: Padrão de massa molecular (kDa); linha 2: rPspA1 nativa; linha 3: rPspA1-ADH; linha 4: rPspA3-ADH; linha 5: rPspA3 nativa. - 77 -

Figura 34 - Cromatograma de purificação da reação de conjugação entre o Ps 6B ox e a rPspA1 (A) e entre o Ps 6B ox e a rPspA3 (B); em coluna Superose-12. Fase móvel: NaCl 0,15 M + fosfato 0,05 M, pH 7,0; fluxo: 0,5 mL/min. - 78 -

Figura 35 - Perfil eletroforético dos conjugados sintetizados por aminação redutiva em gel de poliacrilamida com SDS 12%. (A e B): coloração com azul Coomassie; (C): coloração com reagente de Schiff. Linha 1: Padrão de massa molecular (kDa); linha 2 e linha 8: rPspA1-ADH; linha 3 e linha 6: Conjugado 6Box-PspA1; linha 4 e linha 7: Conjugado 6Box-PspA3; linha 5 e linha 9: rPspA3- ADH. - 80 -

Figura 36 - Ensaio de reconhecimento de epítomos antigênicos na rPspA nativa, modificada e conjugada por aminação redutiva. - 80 -

Figura 37 - Resultados do ensaio de antigenicidade do Ps 6B conjugado por ELISA de inibição. - 81 -

Figura 38 - Título de anticorpos anti-PspA. Soro obtido na terceira sangria após a imunização dos conjugados 1 e 3 (Tabela 7) sintetizados por aminação redutiva. (ns) indica diferenças não significativas. (*) indica diferenças significativas $p < 0,05$ (ANOVA fator único, teste de Tukey). - 82 -

Figura 39 - Título de anticorpos anti-Ps 6B. Soro obtido na terceira sangria após a imunização dos conjugados 1 e 3 (Tabela 7) sintetizados por aminação redutiva. (ns) indica diferenças não significativas. (*) indica diferenças significativas $p < 0,05$ (ANOVA fator único, teste de Tukey). - 83 -

Figura 40 - Ensaio de opsonofagocitose. (A): soro anti-PspA1 (cepa 245: clado 1, sorotipo 14); (B): soro anti-PspA3 (cepa TIGR 4: clado 3, sorotipo 4). Soros em teste, diluídos 1:16 foram incubados com a bactéria, seguido de 10% de fonte de complemento e células isoladas do peritônio. As bactérias foram plaqueadas em ágar sangue e o número de UFCs foi determinado após 20 h. (ns) indica diferenças não significativas. (*) indica diferenças significativas $p < 0,05$ (ANOVA fator único, teste de Tukey). - 85 -

Figura 41 - Predição da estrutura secundária da rPspA (nativa, modificada e conjugada) a partir da deconvolução dos dados obtidos por dicróismo circular. Porcentagem de cada estrutura é apresentada acima de sua respectiva barra. (A): dados correspondentes à rPspA1; (B): dados correspondentes à rPspA3. - 87 -

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Ensaio de imunização para teste dos diferentes conjugados	49 -
Tabela 2 - Resultados da purificação da rPspA3	57 -
Tabela 3 - Resultados da purificação da rPspA1	58 -
Tabela 4 - Resultados da hidrólise do Ps 6B	61 -
Tabela 5 - Resultados da oxidação do Ps 6B	62 -
Tabela 6 - Características físico-químicas dos conjugados sintetizados via DMT-MM-69 -	
Tabela 7 - Características físico-químicas dos conjugados sintetizados por aminação redutiva	79 -

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	- 20 -
1.1 Características do <i>Streptococcus pneumoniae</i>	- 20 -
1.2 Epidemiologia e patogênese da doença pneumocócica...	- 21 -
1.3 Vacinas	- 23 -
1.4 Estratégias de conjugação	- 29 -
1.5 Novas estratégias vacinais contra <i>Streptococcus pneumoniae</i>	- 34 -
1.5.1 PspA como antígeno vacinal	- 36 -
1.6 Polissacarídeo 6B de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	- 39 -
2 OBJETIVO	- 41 -
3 MATERIAIS E MÉTODOS	- 42 -
3.1 Materiais	- 43 -
3.2 Cepas bacterianas	- 43 -
3.3 Purificação de fragmentos recombinantes da PspA clado 1 e clado 3	- 44 -
3.3.2 Obtenção dos fragmentos recombinantes da PspA1 e PspA3	- 44 -
3.3.3 Lise celular e clarificação	- 44 -
3.3.4 Purificação por cromatografia	- 44 -
3.4 Preparação do Ps 6B para conjugação	- 46 -
3.4.1 Hidrólise do polissacarídeo 6B	- 46 -
3.4.2 Oxidação do polissacarídeo 6B	- 46 -
3.4.3 Derivatização do polissacarídeo 6B com 1,8-diaminooctano	- 47 -
3.5 Preparação da rPspA para conjugação	- 47 -
3.5.1 Proteção dos resíduos de lisina presentes na rPspA	- 47 -

3.5.2 Introdução do espaçador diidrazida do ácido adípico na rPspA	- 47 -
3.6 Conjugação	- 48 -
3.6.1 Conjugação intermediada pelo DMT-MM	- 48 -
3.6.2 Conjugação via aminação redutiva.....	- 48 -
3.7 Ensaios imunológicos	- 48 -
3.7.1 Esquema de imunização	- 48 -
3.7.2 Determinação do título de anticorpos anti-PspA por ELISA	- 49 -
3.7.3 Determinação do título de anticorpos anti-Ps 6B por ELISA	- 50 -
3.7.4 Ensaio de exposição de epítomos	- 50 -
3.7.5 Ensaio de antigenicidade do Polissacarídeo 6B	- 51 -
3.7.6 Ensaio de opsonofagocitose.....	- 51 -
3.8 Técnicas analíticas.....	- 52 -
3.8.1 Quantificação de polissacarídeo	- 52 -
3.8.2 Quantificação de aldeído	- 52 -
3.8.3 Quantificação de grupos aminos	- 53 -
3.8.4 Quantificação de proteína	- 53 -
3.8.5 Cromatografia Líquida de Alta Resolução	- 53 -
3.8.6 Eletroforese	- 54 -
3.8.7 Espalhamento dinâmico da luz	- 54 -
3.8.8 Análise por dicroísmo circular	- 54 -
3.9 Análises estatísticas	- 54 -
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	- 55 -
4.1 Purificação da rPspA1 e rPspA3	- 55 -
4.1.2 Purificação por cromatografia	- 55 -
4.1.2.1 Purificação da rPspA3	- 55 -
4.1.2.2 Purificação da rPspA1	- 57 -

4.2 Preparação do Ps 6B para a conjugação	- 59 -
4.2.1 Hidrólise do Ps 6B	- 59 -
4.2.2 Oxidação do Ps 6B	- 61 -
4.2.3 Derivatização do Ps 6B	- 63 -
4.4 Conjugação	- 64 -
4.4.1 Conjugação intermediada por DMT-MM	- 64 -
4.4.1.1 <i>Avaliação imunológica dos conjugados sintetizados intermediados por DMT-MM</i>	- 70 -
4.4.2 Conjugação pelo método de aminação redutiva.	- 75 -
4.4.2.1 <i>A avaliação imunológica dos conjugados sintetizados via aminação redutiva</i>	- 81 -
4.5 Determinação da estrutura secundária da PspA.....	- 86 -
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	- 89 -
REFERÊNCIAS*	- 91 -

1 INTRODUÇÃO

1.1 Características do *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbia aerotolerante, encapsulada e com morfologia de coco, podendo se apresentar em pares (diplococos) ou cadeias curtas (PRADO, 2001). A estrutura superficial da bactéria consta de membrana plasmática, parede celular e cápsula polissacarídica. A parede celular é rígida, composta por peptidoglicano, proteínas, carboidratos e lipoproteínas e ancora diversas proteínas de superfície. A membrana plasmática tem estrutura conservada e apresenta moléculas de ácido lipoteicóico (contendo resíduos de fosforilcolina), que se inserem na bicamada lipídica. O ácido teicóico, conhecido como polissacarídeo C é o responsável pela intensa resposta inflamatória observada na infecção por pneumococo, com ativação do sistema complemento e produção de citocinas (ALONSO DE VELASCO et al., 1995).

A cápsula é uma estrutura altamente hidratada, constituída por unidades repetitivas de oligossacarídeos, entre 3 a 6 monômeros, que pode conter também grupos fosfato e glicerol e apresentar ramificações (KAMERLING, 2000). A cápsula constitui o principal fator de virulência do pneumococo, pois confere proteção frente à fagocitose mediada pelo complemento, protegendo as estruturas internas da bactéria da ação do sistema imune do hospedeiro (NIELSEN; SORENSEN; HENRICHSEN, 1993).

As diferenças na composição química da cápsula polissacarídica e a habilidade do sistema imune em reconhecer essas diferenças estruturais, permitem a distinção de mais de 90 sorotipos de *S. pneumoniae* (OVODOV, 2006), dos quais aproximadamente 20 são responsáveis pelo maior número de casos da doença pneumocócica invasiva (DPI) (LYNCH; ZHANEL, 2010).

Além da cápsula polissacarídica diversas proteínas contribuem para a virulência do pneumococo tais como a proteína A de superfície pneumocócica (PspA), a proteína C de superfície pneumocócica (PspC), a pneumolisina (Ply), a neuraminidase A (NamA) e a adesina A de superfície pneumocócica (PsaA) (ALONSO DE VELASCO et al., 1995).

Dentre essas proteínas destaca-se a PspA, presente em todas as cepas de pneumococo sendo um importante fator de virulência pois tem uma função notável

nas propriedades antifagocíticas da bactéria. PspA interfere na deposição do complemento (REN et al., 2003, 2004; TU et al., 1999), na morte por apolactoferrina (SHAPER et al., 2004) e na aderência aos leucócitos (LI et al., 2007).

1.2 Epidemiologia e patogênese da doença pneumocócica

S. pneumoniae é o agente causador de doenças como sinusite, otite média e pneumonia e também de doenças invasivas como meningite e septicemia. Constitui uma das principais causas de doenças infecciosas bacterianas principalmente em crianças abaixo de dois anos provocando cerca de 800.000 mortes em países em desenvolvimento (O'BRIEN et al., 2009). Esta situação ainda é agravada pelo crescente número de cepas resistentes a antibióticos (LINARES et al., 2010). Em adultos a incidência das infecções pneumocócicas é mais acentuada quando existe algum comprometimento do sistema imune do indivíduo ou em presença de alguma doença crônica.

Na América Latina estima-se que a cada ano morrem entre 20 000 e 30 000 crianças por causa das doenças pneumocócicas (VALENZUELA et al., 2009). No Brasil, o pneumococo é o segundo agente causador de meningite bacteriana na infância, antecedido somente por *Neisseria meningitidis* (ALVARES et al., 2011). No período entre 2010 a 2013 reportaram-se 4540 casos de meningite pneumocócica dos quais 1294 foram fatais. A incidência neste período foi de 0,6 casos por 100 000 habitantes (<http://portalsaude.gov.br/>).

S. pneumoniae é parte dos microrganismos comensais da nasofaringe e em grande parte do mundo, virtualmente todos os indivíduos são colonizados durante o primeiro ano de vida. A colonização assintomática da nasofaringe é o evento inicial de todas as infecções pneumocócicas. Em alguns casos mais de um sorotipo coloniza a nasofaringe ao mesmo tempo, fenômeno conhecido como co-colonização. Acredita-se que a co-colonização seja necessária para a transferência gênica horizontal entre diferentes cepas, possibilitando o surgimento de clones multirresistentes (GRAY; CONVERSE; DILLON, 1980). A disseminação horizontal da bactéria usualmente segue o processo de colonização permitindo a dispersão dentro da comunidade (GIVON-LAVI et al., 2002). A porcentagem de crianças colonizadas com pneumococo varia em diferentes regiões (BOGAERT; DE GROOT; HERMANS, 2004), com as mais altas taxas em países em desenvolvimento (HILL et al., 2008). A

duração do estado portador tem um declínio com a idade, nos Estados Unidos, por exemplo, adultos jovens têm uma taxa média de colonização entre 20 e 30% (GHAFFAR; FRIEDLAND; MCCracken, 1999).

A colonização por pneumococo requer aderência às células epiteliais do trato respiratório. Este evento envolve a ligação de proteínas de superfície da bactéria como a adesina A de superfície (PsaA) com carboidratos presentes na superfície das células epiteliais (NOVAK; TUOMANEN, 1999).

Os mecanismos pelos quais o pneumococo se desloca da nasofaringe até o pulmão para causar pneumonia ou até o sangue para causar sepse são pouco conhecidos (JHONSTON, 1991). Em muitos casos a condição imunológica do indivíduo no momento da colonização, assim como a virulência da cepa, são fatores que determinam se o pneumococo permanecerá confinado na nasofaringe ou causará doença invasiva.

Figura 1 - Rota patogênica da infecção por *S. pneumoniae*

Fonte: Adaptado de Bogaert et al., 2004

O pneumococo ganha acesso ao pulmão por aspiração e se adere às células alveolares (Figura 1) (CUNDELL; TUOMANEN, 1994). A progressão para pneumonia demanda eventos adicionais como a produção local de mediadores inflamatórios (interleucina 1 e TNF) como observado durante as infecções virais

(TUOMANEN, 1997). A fagocitose ineficiente permite a multiplicação do patógeno nos alvéolos e liberação de citocinas no fluido broncoalveolar. Segue-se um processo inflamatório intenso mediado por componentes da parede celular da bactéria com recrutamento de macrófagos, neutrófilos e liberação de óxido nítrico, causando danos ao tecido pulmonar (BERGERON et al., 1998). Estas lesões facilitam o acesso direto do pneumococo ao sangue, de onde pode migrar até as meninges, eventos esses que caracterizam a doença invasiva (septicemia e meningite).

O pneumococo também pode atingir o ouvido médio e causar otite. Crianças são particularmente vulneráveis à transferência de microrganismos da nasofaringe ao ouvido devido ao pequeno ângulo formado entre o tubo de Eustáquio e as paredes da faringe. De forma similar, na sinusite, o espalhamento da bactéria para os seios frontais e maxilares provoca a inflamação das paredes internas, bloqueando a drenagem do muco produzido nestas cavidades para o nariz e causando sinusite.

Outras doenças causadas por *S. pneumoniae* incluem peritonite, empiema e artrite, mas são pouco frequentes.

1.3 Vacinas

O desenvolvimento de vacinas pneumocócicas data do início do século XX. Os primeiros trabalhos profiláticos foram desenvolvidos por Wright em 1911, quando uma vacina celular inativada foi aplicada a mineiros Sul-africanos (WATSON; MUSHER, 1999). Em 1945, foi testada a capacidade de uma vacina quadrivalente contendo sorotipos 1, 2, 5 e 7 e um ano mais tarde já se dispunha de duas vacinas hexavalentes (MCLEOD et al., 1945). Naquela época o desenvolvimento dos antibióticos fez perder o interesse pela imunização profilática até os anos sessenta quando aumentou a incidência de doenças pneumocócicas e o aparecimento de cepas resistentes (KAMERLING, 2000).

No entanto, a existência de mais de 90 sorotipos de pneumococo representava um verdadeiro obstáculo ao desenvolvimento de uma vacina que proporcionasse uma proteção adequada. Em 1977 foi introduzida a primeira vacina polissacarídica comercial contendo 14 sorotipos (AUSTRIAN, 1981) e em 1983 foi licenciada uma vacina 23-valente (Pneumovax-23 -Wyeth Lederle) que cobria cerca

de 90% das infecções causadas por *S. pneumoniae* em adultos jovens. Esta formulação inclui 25 µg de cada um dos seguintes sorotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 33F. Esta vacina foi inicialmente indicada para adultos acima de 65 anos, e para crianças a partir de dois anos com alguma doença crônica que aumentasse o risco de adquirir infecções pneumocócicas e subseqüentes complicações (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 1984). Para este tipo de vacinas é necessária a revacinação periódica devido à não indução de memória imunológica (WADWA; FEIGIN, 1999).

Estas vacinas tradicionais têm sido eficazes apenas em determinadas faixas etárias, pois não fornecem proteção duradoura (aproximadamente 5 anos em adultos saudáveis) e são ineficazes em crianças menores de dois anos e menos imunogênica em pessoas com mais de 65 anos, que são precisamente os grupos de mais elevado risco de contrair as doenças pneumocócicas (SHINEFIELD et al., 2002). O anterior deve-se a que os polissacarídeos são antígenos T-independentes, ativando diretamente as células B que produzem basicamente anticorpos de isotipo IgM, sem a indução de células de memória (STEIN, 1992).

No final dos anos 20 Avery e Goebel demonstraram que a imunogenicidade do polissacarídeo pode ser aumentada com a ligação deste a uma proteína carreadora (AVERY; GOEBEL, 1929). O sucesso que esta técnica mostrou nos anos 80 com a produção de uma vacina conjugada contra *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) conduziu a sua aplicação aos polissacarídeos capsulares de outras espécies bacterianas incluindo pneumococo (JODAR et al., 2002; ROSENSTEIN; FISCHER; TAPPERO, 2001).

As vacinas conjugadas consistem de polissacarídeos covalentemente ligados à proteína. Estas formulações tornam o polissacarídeo capsular num antígeno do tipo T dependente aumentando assim sua imunogenicidade (JANEWAY et al., 2002). A resposta de uma vacina conjugada é conferida pelo reconhecimento ligado, isto é: a célula B reconhece e liga o carboidrato, internaliza e degrada todo o conjugado e então exhibe os peptídeos derivados da proteína conjugada no MHC-II na superfície da célula (Figura 2). Logo se produz a interação específica do peptídeo-MHC-II da célula apresentadora de antígenos (APC) com o receptor de antígenos das células T (TCR) de um linfócito T auxiliador (LTh). Esta interação junto com os sinais co-estimuladores promove a ativação e proliferação das células B que

segregam anticorpos específicos, tanto para o carboidrato quanto para a proteína, e se diferenciam em células de memória (PLETZ et al., 2008).

Os anticorpos anti-Ps induzidos por estas vacinas são específicos para cada sorotipo e tem a capacidade de opsonizar a bactéria, promovendo a fagocitose dependente do complemento. O ensaio de opsonofagocitose (OPA) realizado *in vitro*, usando células diferenciadas HL-60 é o teste padrão para a análise da funcionalidade dos anticorpos induzidos pelas vacinas conjugadas (ROSE et al., 2011). O OPA é o correlato de proteção recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para o licenciamento destas vacinas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

Figura 2 - Modelo que explica o processamento e apresentação de vacinas conjugadas. Na vacina conjugada o polissacarídeo (representado por pontos azuis) ligado à proteína (representada por um quadrado) é reconhecido por uma imunoglobulina de superfície na célula B, internalizado e processado. Os peptídeos derivados da proteína carreadora então são apresentados pelo MHC II e reconhecidos pelo receptor para antígenos da célula T, evento que desencadeia a liberação de citocinas que auxiliam a célula B na proliferação, diferenciação a célula plasmática produtora de anticorpos, mudança do isotipo de imunoglobulina IgM para IgG, amadurecimento da afinidade dos anticorpos e diferenciação a células B de memória.

Fonte: Adaptado de CONSTANTINO; RAPPOULI; BERTI, 2011.

Recentemente foi descrito um novo modelo para a ativação das células T pelas vacinas conjugadas. Este novo modelo supõe o processamento de ambas as porções do conjugado: polissacarídeo e proteína, gerando glicopeptídeos que se ligam pela porção peptídica ao complexo MHC II, permitindo a apresentação da porção hidrofílica (o polissacarídeo) ao TCR. Os linfócitos T auxiliares

reconhecem e respondem frente ao glicano apresentado no contexto MHC II (AVCI et al., 2011).

No ano 2000 foi licenciada a primeira vacina conjugada heptavalente contra *S. pneumoniae* para uso em crianças (Prevnam-7, Pfizer). Esta formulação inclui 2 µg de cada um dos sorotipos 4, 9V, 14, 18C, 19F e 23F e 4 µg do sorotipo 6B ligados covalentemente de forma individual a CRM197 (uma variante não tóxica da toxina diftérica) como proteína carreadora e 0,125 mg de fosfato de alumínio como adjuvante (OBARO, 2002).

A incorporação desta vacina nos programas nacionais de imunização de mais de 50 países, 12 dos quais pertencem à América Latina, conduziu a uma efetividade documentada com redução nas taxas de mortalidade causadas pela doença pneumocócica invasiva (DPI) (REDELINGS et al., 2005), pneumonia (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2009) e otite média (POEHLING et al., 2007). Em países como México, Uruguai e Costa Rica foi registrada uma redução na mortalidade infantil assim como uma diminuição no número de internações por meningite e pneumonia (RODGERS; KLUGMAN, 2011).

Apesar do sucesso da PCV-7 na redução dos índices da DPI, prevaleceu uma carga global significativa da doença pneumocócica por causa dos sorotipos não vacinais. Depois da introdução desta vacina vários países reportaram mudanças no estado portador dos sorotipos pneumocócicos. Os tipos não vacinais aumentaram entre os portadores assintomáticos e em menor extensão aumentaram como causa da DPI, fenômeno conhecido como substituição de sorotipos (MHER; WOOD, 2012; WEINBERGER; MALLEY; LIPSITCH, 2011).

Com a finalidade de aumentar a cobertura vacinal, foram desenvolvidas outras vacinas conjugadas com valência expandida. A vacina Synflorix (Glaxo Smith Kline) de 10 sorotipos (inclui os sorotipos da PCV-7 mais os sorotipos 1, 5 e 7F). Esta formulação vacinal contém 1µg dos sorotipos 1, 5, 6B, 7F, 9V, 14 e 23F conjugados à proteína D de *Haemophilus influenzae* não tipável, 3µg do sorotipo 4 também conjugado à proteína D; 3 µg do sorotipo 19F conjugado ao toxóide diftérico (TD) e 3 µg do sorotipo 18C conjugado ao toxóide tetânico (TT). Emprega fosfato de alumínio como adjuvante. Depois de sua aprovação pela Agência Europeia de Medicamentos (EMA) em março de 2009, foi licenciada para uso em crianças desde 6 meses até dois anos de idade para a prevenção da pneumonia

pneumocócica e da otite causada por *H. influenzae* (PRYMULA; SCHUERMAN, 2009).

No Brasil, em 2010, a vacina Synflorix foi introduzida no Programa Nacional de Imunização (PNI). No primeiro ano três esquemas foram utilizados: (i) crianças menores que 6 meses (três doses mais um reforço (3p + 1)); (ii) crianças entre 7 a 11 meses (duas doses mais um reforço (2p + 1)); (iii) crianças entre 12 a 15 meses de idade (uma dose única sem reforço) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Este evento contribuiu para melhorar a situação da DPI existente, e paralelamente causou uma mudança nos indicadores epidemiológicos da doença pneumocócica e na distribuição de sorotipos.

Um estudo realizado no estado de Goiás nos primeiros meses após a introdução da PCV-10 mostrou que em crianças menores de um ano a administração das séries primárias (2p + 0 e 3p + 0); sem uma dose de reforço, foi suficiente para diminuir o estado portador dos sorotipos vacinais (ANDRADE et al., 2014).

Em outro estudo realizado em São Paulo entre os anos 2006 a 2010 foi evidenciada uma clara redução na DPI causada pelos sorotipos vacinais após a introdução da PCV-10 (DOS SANTOS et al., 2013). Também foi constatado um declínio na incidência dos sorotipos vacinais (Figura 3).

Figura 3 - Porcentagem de isolados clínicos pertencentes aos sorotipos vacinais e não vacinais antes (Janeiro de 2006-Junho de 2010) e após a implementação da vacina *Synflorix* (Julho de 2010-Setembro de 2012) $p < 0,001$.

Fonte: Adaptado de DOS SANTOS et al., 2013

De forma geral após a introdução da PCV-10 foi constatada uma mudança na distribuição de sorotipos isolados, entretanto, não foi significativo o aumento na

incidência da DPI causada pelos sorotipos não vacinais. Compete salientar que a diferença de outras regiões, como Estados Unidos e Europa, onde o sorotipo 19A surgiu entre os sorotipos não vacinais como causa das doenças pneumocócicas após a introdução da PCV-7 (WEIL-OLIVIER et al., 2012); neste estudo não se observou um aumento na incidência deste sorotipo no período pós-vacina.

Esta análise foi a primeira realizada no Brasil para examinar os efeitos da PCV-10 na DPI, no entanto, o número de casos estudados representou só uma pequena porção da população infantil vacinada e o período analisado foi muito breve para chegar a conclusões em relação à incidência específica dos sorotipos.

Num estudo caso controle para analisar o impacto da PCV-10 na doença invasiva foi confirmada proteção para os sorotipos vacinais (DOMINGUES et al., 2014)

Por outro lado, a vacina Prevenar-13 (Pfizer) inclui os sorotipos da PCV-7 mais os sorotipos 1, 3, 5, 6A, 7F e 19A, contendo na formulação 2,2 µg dos sorotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19F e 23F; e 4,4 µg do sorotipo 6B; todos conjugados à proteína CRM197 (JEFFERIES et al., 2011). Esta vacina foi aprovada para a prevenção da doença invasiva causada pelos sorotipos vacinais e está licenciada em mais de 100 países. Depois de sua aplicação em crianças, estudos de avaliação global demonstraram uma ampla cobertura e uma prevenção mais efetiva contra DPI e estado portador do que a PCV-7 (ESPOSITO; PRINCIPI, 2015).

Dados de vigilância do Reino Unido onde o programa nacional de imunização transitou da PCV-7 à PCV-13 em crianças menores de dois anos de idade, demonstrou efetividade para a DPI causada pelos 6 sorotipos adicionais, além de se observar uma redução na doença causada pelos sorotipos 7F e 19A (KAYE et al., 2011).

Merck & Co., Inc. desenvolveu um candidato vacinal conjugado de 15 sorotipos que inclui os sorotipos da PCV-13 mais os sorotipos 22F e 33F, todos conjugados à proteína CRM 197. Atualmente esta vacina está em testes clínicos (MEULEN et al., 2015).

As vacinas conjugadas mostraram um impacto significativo na redução da doença invasiva, não somente na população alvo das vacinas, como também nos grupos etários não vacinados. Este efeito conhecido como imunidade de rebanho é mediado pela redução do estado portador dos sorotipos vacinais, impedindo sua

transmissão à população não vacinada e exercendo assim uma proteção indireta (KLUGMAN, 2014).

1.4 Estratégias de conjugação

Para conferir a um polissacarídeo um caráter T-dependente, deve-se estabelecer uma ligação covalente com uma proteína carreadora. Duas alternativas têm sido tradicionalmente usadas para a síntese de vacinas conjugadas: uma baseada na ativação randômica de grupos hidroxila ou carboxila presentes ao longo do polissacarídeo (nativo ou fragmentado), seguido da conjugação; e outra baseada em oligossacarídeos ativados pelos grupos terminais e logo ligados covalentemente à proteína carreadora. Estas alternativas de conjugação definem o tipo de conjugado a obter: para a primeira escolha se obtém uma estrutura de rede macromolecular entre o polissacarídeo e a proteína (Figura 4B), enquanto para a segunda alternativa se obtém uma estrutura radial com o oligossacarídeo ligado por um único extremo à proteína que ocupa uma posição central (Figura 4A).

Figura 4 - Representação esquemática dos diferentes tipos de conjugados polissacarídeo-proteína. (A): conjugado do tipo neoglicoproteína; (B): conjugado do tipo rede macromolecular.

Fonte: Adaptado de CONSTANTINO; RAPOULI; BERTI, 2011

Dependendo do método de conjugação uma molécula espaçadora pode ser empregada com o objetivo de facilitar a ligação do Ps à proteína e em alguns casos o próprio método de conjugação requer a derivatização prévia da proteína carreadora.

Em relação aos métodos de conjugação existem vários procedimentos reportados na literatura, dentre todos estes métodos os mais frequentemente empregados em vacinas conjugadas são: 1) conjugação por oxidação periódica-aminação redutiva, 2) conjugação por cianilação e 3) conjugação intermediada por carbodiimida.

A **oxidação periódica-aminação redutiva** é um método simples, o mesmo consiste na oxidação periódica controlada do Ps ou um fragmento dele; os grupos aldeídicos gerados reagem então com os grupos amina presentes na proteína (JENNINGS; LUGOWSKI, 1982). Esta segunda etapa da reação que é a aminação redutiva, transita pela formação de uma imina intermediária ou base de Schiff ($-C=N$) ainda em equilíbrio com os reagentes: aldeído e amina; que é subsequentemente reduzida para formar uma amina secundária (Figura 5). Os grupos aldeídicos remanescentes são reduzidos pela adição de boroidreto de sódio, devolvendo a função hidroxila.

Figura 5 - Mecanismo da reação de aminação redutiva.

Entre os agentes redutores mais comumente empregados estão o boroidreto de sódio, piridina-borano e cianoboroidreto de sódio, sendo este último o mais usual por sua alta seletividade para as iminas e baixa reatividade com grupos carbonila.

Este método foi empregado pela Pfizer (antiga Wyeth) na vacina de Hib (HbOC) (ANDERSON et al., 1986) e mais recentemente nas vacinas conjugadas contra pneumococo Prevenar 7 e Prevenar 13.

A aminação redutiva foi inicialmente desenvolvida por Jennings; Lugowski, 1982; mas posteriormente têm se descrito outras variantes deste método como a introdução de espaçadores no Ps ou na proteína com a finalidade de aumentar a reatividade, diminuir o impedimento estérico e assim aumentar os rendimentos da conjugação. Jessouroun et al., 2005 e Lee; Frasch, 2007 reportaram que a introdução de grupos hidrazida na proteína carreadora, que irão reagir com grupos aldeído do Ps, conduzem a rendimentos de aproximadamente 60%.

Outra alternativa é a **conjugação por cianilação** usada no primeiro conjugado desenvolvido para Hib em 1980 (SCHNEERSON et al., 1980) e logo aperfeiçoada por Merieux na ativação do poli-ribosil-ribitolfosfato (PRP) - o polissacarídeo capsular de *Haemophilus influenzae* tipo b - para a obtenção de um conjugado com toxóide tetânico (PRP-T) usando a versão de Robbins de 1983 (CHU

et al., 1983). Este método baseia-se na ativação dos grupos hidroxila do Ps através da reação com brometo de cianogênio (CNBr) gerando um cianoéster que posteriormente reage com grupos amina.

O CNBr tem sido substituído por um agente cianilador superior, o tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilaminopiridina (CDAP) (LEES; NELSON; MOND, 1996). O CDAP ativa os grupos hidroxila do Ps formando um cianoéster altamente reativo capaz de reagir diretamente com os grupos ϵ -amino das lisinas para formar uma ligação O-acilisouréia estável. A ativação com CDAP transcorre em poucos minutos e sua eficiência tem uma forte dependência do pH, sendo o pH ótimo entre 9 e 10.

A vacina conjugada anti-pneumocócica PCV-10, *Synflorix*, da Glaxo Smith Kline que atualmente está incluída no Programa Nacional de Imunização do Brasil, emprega a cianilação como método de conjugação.

A terceira alternativa, a **conjugação por carbodiimida**, consiste na ativação de um grupo carboxila presente em um dos componentes da reação para reagir com um grupo amina do outro componente formando uma ligação amida (ALBERICIO, 2004; MONTALBETTI; FALQUE, 2005).

Nesta reação o grupo carboxila é convertido em um éster reativo via carbodiimida gerando o intermediário O-acilisouréia. A formação da ligação amida ocorre pelo ataque de um grupo amina primário sobre o carbono carbonílico do intermediário O-acilisouréia (Figura 6).

Existem várias carbodiimidas como a dicicloexil carbodiimida (DCC), a diisopropilcarbodiimida (DIC), e a 1-etil-3,3-dimetilaminopropil carbodiimida (EDAC), sendo esta última a mais empregada na conjugação de moléculas biológicas por sua solubilidade em água (HERMANSON, 1996). Este método foi usado na obtenção de uma vacina conjugada do polissacarídeo Vi de *Salmonella enterica* serovar typhi a toxóide tetânico, licenciada para distribuição local na Índia em 2008 (PedaTyph, BioMed Biologicals) (SZU, 2013).

Figura 6 - Mecanismo da reação intermediada por carbodiimida. (A): O grupo carboxila (1) ataca o carbono eletrofílico da carbodiimida (2) formando um éster ativo (intermediário O-acilisouréia) (3). (B): Um nucleófilo, como os grupos amina presentes na proteína (5), ataca o carbono carbonílico do intermediário O-acilisouréia (3) formando a ligação amida (6) e liberando um derivado da uréia (2). (C): Adicionalmente, a N-hidroxissuccinimida (8) pode reagir com o intermediário O-acilisouréia (3) para formar um éster succinímico reativo resistente à hidrólise (9) que pode ser atacado por um grupo amina primário (5) resultando na formação da ligação amida (6) e na regeneração da NHS (8).

A ativação de grupos carboxila com carbodiimidas é considerado um procedimento complicado devido ao curto tempo de meia vida do intermediário O-acilisouréia, o qual sofre hidrólise em médio aquoso e em pH inferiores a 6 e à ocorrência de um rearranjo intramolecular irreversível formando o derivado N-aciluréia não reativo (BAUMINGER; WILCHECK, 1980). Esta última questão é resolvida pela adição de um nucleófilo auxiliar como a N-hidroxissuccinimida (NHS). A NHS forma um éster intermediário estável a partir do complexo EDAC-carboxilato, incrementando consideravelmente a formação da ligação amida (BULPIT; AESCHLIMANN, 1999).

Recentemente, novos agentes condensadores de grande versatilidade derivados de triazina têm sido explorados como é o caso do 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolino (DMT-MM). Seu uso tem sido proposto para a síntese peptídica (KUNISHIMA et al., 1999), para a ativação de carboxilatos presentes em

polissacarídeos com o objetivo de conjugá-los a moléculas orgânicas (FARKAS; BYSTRICKY, 2007; SCHLOTTMAN et al., 2006) e na área dos biomateriais para a introdução de grupos funcionais em polímeros com o objetivo de criar bibliotecas de polímeros (PELET; PUTNAM, 2011).

O nosso grupo vem pesquisando o uso deste agente ativador na síntese de antígenos vacinais. Foi estabelecido um método de conjugação (BARAZZONE et al., 2011) que combina características de dois métodos clássicos conhecidos na literatura: a fragmentação do Ps e ativação mediante oxidação periódica, do método reportado por Laferrière et al., 1997 e a introdução de um espaçador no Ps oxidado e posterior conjugação à proteína, como reportado por Schneerson et al., 1986. Neste método o Ps é fragmentado, ativado por oxidação periódica para gerar grupos aldeídicos que posteriormente se ligam ao espaçador 1,8-diaminooctano mediante aminação reductiva. Os grupos amina reagem com os grupos carboxila da proteína em uma reação mediada pelo agente ativador DMT-MM (Figura 7).

Figura 7 - Esquema do método de conjugação desenvolvido pelo grupo. (A): Oxidação das hidroxilas vicinais do Ps com conseqüente formação de grupos aldeídicos e ruptura da ligação carbono-carbono. (B): Derivatização do Ps oxidado com moléculas espaçadora contendo grupos amino (p.e. 1,8-diaminooctano). (C): Conjugação entre o Ps derivatizado e os grupos carboxila da proteína na presença do agente ativador DMT-MM.

Um dos temas mais discutidos referentes ao uso das vacinas conjugadas na atualidade, principalmente com relação ao pneumococo, é o aumento de doenças causadas pelos sorotipos não incluídos na vacinação; seja através da substituição de sorotipos (fenômeno pelo qual novos sorotipos ocupam o nicho ecológico deixado pela eliminação dos sorotipos vacinais) ou por mudanças do tipo capsular (onde os

sorotipos vacinais virulentos adquirem uma cápsula diferente por mudanças genéticas, ganhando assim vantagens adaptativas) (LIPSITCH, 1999).

Em vista dos mais de 90 sorotipos atualmente conhecidos é evidente que uma expansão da cobertura vacinal seria vantajosa, pois poderia reduzir em longo prazo as taxas de incidência de DPI nos países afetados. Entretanto, a conjugação de sorotipos adicionais aumentaria a complexidade destas vacinas, constituindo um desafio, e não conseguiria cobrir todos os sorotipos pneumocócicos. Uma alternativa promissora seria o uso de antígenos não polissacarídicos conservados em todas as cepas de pneumococo (BOGAERT et al., 2004). Pesquisas relacionadas com proteínas comuns a todos os sorotipos estão em andamento; isto daria a possibilidade de ter vacinas de proteínas purificadas ou uma combinação de vacinas de proteínas com vacinas conjugadas.

1.5 Novas estratégias vacinais contra *Streptococcus pneumoniae*

O desenvolvimento de uma vacina anti-pneumocócica sorotipo independente foi incentivada pelo fato de que a imunização em animais com a bactéria sem cápsula era capaz de proteger frente à infecção com bactéria encapsulada. Este fato sugere que outros componentes diferentes dos polissacarídeos da cápsula podem ter funções protetoras (PRINCIPI; ESPOSITO, 2011).

Enquanto a indução de anticorpos anti-Ps em indivíduos vacinados correlaciona com proteção, a imunidade adquirida naturalmente frente a *S. pneumoniae* envolve outros mecanismos. O pico de incidência das doenças pneumocócicas ocorre durante o primeiro ano de vida e diminui logo após um breve tempo para todos os sorotipos. Esta redução na susceptibilidade à doença invasiva precede o desenvolvimento natural de anticorpos anti-Ps em crianças não vacinadas (LIPSITCH et al., 2005). Isto indica que a indução de anticorpos contra proteínas do pneumococo é o mecanismo que confere resistência natural à infecção em crianças. Dados de países como Finlândia (RAPOLA et al., 2000) e Quênia (LAINE et al., 2004) mostram que durante o segundo ano de vida ocorre um aumento na concentração de anticorpos contra proteínas pneumocócicas associado ao estado portador (presença da bactéria na nasofaringe).

Considerando o potencial das proteínas do pneumococo na geração de uma resposta protetora, novas abordagens vacinais contra *S. pneumoniae* têm sido

estudadas. Uma vacina de células inteiras inativadas (WCV) foi proposta por Malley et al., 2001. Nesta formulação a bactéria não apresenta cápsula permitindo a exposição de antígenos protéicos na sua superfície. A proteção nesse caso é sorotipo independente. Estes autores demonstraram que a imunização intra-nasal com pneumococos não capsulados mortos protege camundongos contra colonização e doença invasiva.

Nos últimos anos tem sido avaliada a imunogenicidade e eficácia protetora de um grande número de proteínas pneumocócicas que constituem fatores de virulência. Entre as mais estudadas estão: pneumolisina (Ply), adesina A de superfície (PsaA), proteína A e C de superfície (PspA e PspC), proteína com tríade de histidina (Pht) e proteína serina/treonina quinase (StkP). Estas proteínas diferem no grau de imunogenicidade, razão pela qual alguns pesquisadores concordam que são necessárias vacinas baseadas em múltiplos antígenos para prevenir a infecção por pneumococo (OGUNNIYI et al., 2000).

A pneumolisina é um dos fatores de virulência de *S. pneumoniae* essenciais para sua sobrevivência nas vias respiratórias. Está localizada no citoplasma e é liberada quando a célula sofre autólise (PATON, 1996) tendo um efeito citotóxico direto sobre as células alveolares (MAUS et al., 2004). Esta proteína é altamente conservada na maioria dos sorotipos do pneumococo, é altamente imunogênica e confere proteção contra septicemia em vários modelos animais (OGUNNIYI et al., 2007). Porém, esta toxina forma grandes poros na célula do hospedeiro, portanto não seria compatível como antígeno vacinal. Variantes geneticamente modificadas como os toxóides são considerados bons candidatos, mas seu espectro de proteção é ainda limitado, sendo mais razoável usá-la numa formulação combinada com outras proteínas para conseguir uma proteção mais ampla (WU et al., 2010).

Por outro lado, a PsaA é uma lipoproteína conservada envolvida no transporte de manganês e zinco no pneumococo e tem uma importante função na aderência e colonização. O seu uso como vacina universal tem sido avaliado em vários estudos, oferece uma boa proteção frente à colonização, mas frente à doença invasiva a proteção não é eficiente (ROMERO-STEINER et al., 2003).

Mais recentemente foram identificados genes que codificam uma família de proteínas de superfície homólogas, capazes de induzir anticorpos protetores: proteínas com tríade de histidina (PhtA, PhtB, PhtD e PhtE). Estas proteínas possuem entre 32 a 87% de identidade e são caracterizadas por apresentarem

motivos de histidina repetidos cinco a seis vezes na sua estrutura (ADAMOU et al., 2001). Em modelos de colonização nasofaríngea e pulmonar a vacinação com PhtD permitiu atingir níveis de proteção similares aos níveis atingidos quando se vacina com PsaA e PspA. A transferência passiva de anticorpos humanos naturais anti-PhtD a camundongos demonstrou proteção significativa frente a desafio letal intranasal (GODFROID et al., 2011).

A superfície de quase todas as cepas do pneumococo expressa pili, estruturas multiméricas envolvidas na adesão da bactéria às células epiteliais que consistem de três proteínas: RrgA, RrgB e RrgC (EL MORTAJI et al., 2010). Estas proteínas mostraram ser protetoras em um modelo murino de infecção intraperitoneal. Tanto a imunização passiva quanto a ativa com subunidades recombinantes de pili protegeram frente ao desafio letal com a cepa TIGR4 (GIANFALDONI et al., 2007)

1.5.1 PspA como antígeno vacinal

Entre todas as proteínas pneumocócicas estudadas destaca-se a PspA. Esta proteína constitui um fator de virulência presente na superfície do pneumococo. Foi inicialmente identificada por 'screening' imunológico de uma biblioteca de expressão genômica (em fago lambda) de *S. pneumoniae* utilizando anticorpos monoclonais contra pneumococos não encapsulados inativados por calor (MCDANIELS et al., 1984).

A PspA retarda a remoção da bactéria do sangue, interfere na fagocitose, inibe a deposição de C3 e, portanto, a ativação do complemento (REN et al., 2003, 2004; TU et al., 1999). Soro de humanos imunizados com PspA confere proteção passiva em camundongos (BRILES et al., 2000b).

Do ponto de vista estrutural a PspA é composta de quatro domínios (Figura 8): um domínio N-terminal em α -hélice altamente carregado de aproximadamente 300 aminoácidos, uma região rica em prolina de 83 resíduos de aminoácidos, um domínio de ligação a colina formado por 10 trechos repetitivos e uma pequena cauda C-terminal composta por 17 aminoácidos hidrofóbicos (BRILES et al., 1998; YOTHER; BRILES, 1992).

O domínio em α -hélice apresenta motivos antiparalelos em espiral, estrutura que é frequentemente achada em proteínas fibrosas de bactérias Gram-positivas. Estudos de mapeamento com anticorpos monoclonais sugerem que esta região em

α -hélice apresenta o maior número de epítomos protetores e constitui a parte mais exposta da molécula (SENKOVICH et al., 2007) se projetando para fora da cápsula (BERGMANN; HAMMERSCHMIDT, 2006; BRILES et al., 2000a; GOR et al., 2005).

O domínio rico em prolina se estende por toda a parede celular do pneumococo como acontece com as regiões ricas em prolina de outras proteínas de superfície de bactérias Gram-positivas, e está composto por sequências repetitivas que alternam entre resíduos de prolina e alanina, fazendo sua inclusão importante para aumentar a proteção (DANIELS et al., 2010).

Dentro do domínio N-terminal encontra-se uma região muito divergente de aproximadamente 100 aminoácidos, chamada região definidora de clado (CDR) que é a base da classificação da PspA em 3 famílias e 6 clados. A família 1 inclui os clados 1 e 2; a família 2 abrange os clados 3, 4 e 5 e a família 3 o clado 6. As PspA da mesma família apresentam CDR com mais de 55% de homologia enquanto as proteínas do mesmo clado apresentam mais de 90% de similaridade (HOLLINGSHEAD; BECKER; BRILES, 2000). Em pacientes com doença pneumocócica invasiva mais de 96% dos isolados clínicos pertencem as PspA das famílias 1 e 2 (CRONEY et al., 2012; HOLLINGSHEAD et al., 2006).

Figura 8 - Esquema representativo da estrutura da PspA mostrando os 4 domínios da proteína. O domínio N-terminal em α -hélice (incluindo a região A e a região definidora de clado [região B]) a região rica em prolina, o domínio de ligação a colina formado por dez trechos repetitivos e a cauda C-terminal.

Fonte: Adaptado de DARRIEUX et al., 2008

Anticorpos protetores são induzidos contra os domínios em α -hélice e de prolina da PspA. Alguns estudos mostram que o nível de reatividade cruzada entre diferentes fragmentos de PspA está fortemente associado ao grau de similaridade entre a sequência de aminoácidos da região definidora de clado, com uma maior tendência à reatividade cruzada entre PspA da mesma família (MIYAJI et al., 2002). No entanto, a presença de sequências conservadas presentes na região de prolina e na região N-terminal que precede a CDR, também são responsáveis pela proteção cruzada entre diferentes famílias de PspA (ROCHE et al., 2003).

Apesar da grande variabilidade na sequência de aminoácidos desta proteína, anticorpos anti-PspA desenvolvidos em camundongos e humanos conferem proteção cruzada frente à doença invasiva em camundongos por via intravenosa (BRILES et al., 2000b). Mesmo que diferentes PspA tenham demonstrado diferentes graus de reatividade cruzada 'in vitro' e diferentes graus de proteção-cruzada em camundongos (MORENO et al., 2010), uma única construção de PspA não desenvolve proteção completa frente ao desafio com cepas contendo todos os clados e famílias (BRILES et al., 2000c). Por este motivo vários autores sugerem que uma combinação de PspA das duas famílias mais representativas (família 1 e 2) seria a escolha mais adequada para proteger frente a um grande número de cepas de pneumococo (DARRIEUX et al., 2007, 2008).

Alguns estudos indicam que a imunização com proteínas híbridas contendo fragmentos das famílias 1 e 2 induzem proteção cruzada contra cepas de pneumococo das duas famílias em camundongos (DARRIEUX et al., 2008).

Piao et al., 2014 avaliaram a capacidade de reação cruzada frente a isolados clínicos de *S. pneumoniae* de três proteínas de fusão: PspA 2+3, PspA 2+4 e PspA 2+5. De forma geral a construção PspA 2+3 mostrou ser superior em termos de reatividade cruzada com isolados clínicos e cross-proteção frente ao desafio com cepas de pneumococo. Soro de animais imunizados com a proteína híbrida PspA 3+2 conferiu proteção significativa em camundongos frente ao desafio com cepas de pneumococo contendo os clados do 1 ao 5.

O emprego de PspA como proteína carreadora também tem sido avaliado. Um conjugado bivalente produzido a partir do Ps Vi de *Salmonella* Typhi e a PspA mostrou-se protetor frente à febre tifoide e à doença pneumocócica (KOTHARI et al., 2014, 2015).

O Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan vem pesquisando a conjugação entre PspA e polissacarídeos capsulares do pneumococo na expectativa de aumentar a cobertura vacinal com o emprego de um número pequeno de sorotipos. Foram obtidos e testados em camundongos conjugados dos sorotipos 23F, 14 e 6B a PspA: Ps 23F-PspA1 (CSORDAS et al., 2008), Ps 14-PspA3 (SANTAMARIA et al., 2011) e Ps 6B-PspA1 (PERCIANI et al., 2013) e Ps 6B-PspA3 (PERCIANI, 2011).

A conjugação do Ps 14 à PspA1 induziu anticorpos anti-PspA1 com capacidade para deposição de complemento e atividade opsonofagocítica maiores que PspA livre (SANTAMARIA et al., 2011).

O conjugado Ps 23F-PspA1 mostrou uma proteção maior do que a PspA1 livre no teste de desafio com uma cepa letal contendo PspA homólogo e Ps heterólogo (CSORDAS et al., 2008).

A conjugação do Ps 6B à rPspA dos clados 1 e 3 induziu anticorpos funcionais anti-PspA e anti-Ps 6B. No entanto, a resposta induzida mostrou-se dose dependente e o Ps 6B teve um comportamento pouco imunogênico. Quando avaliado o perfil da resposta imune do sorotipo 6B conjugado a PspA dos clados 1 e 3, o conjugado 6B-PspA1 induziu maiores níveis de anticorpos para deposição de complemento e opsonofagocitose comparado ao conjugado 6B-PspA3 (PERCIANI, 2011). Experimentos de espectrometria de massa realizados para determinar os sítios de ligação do Ps na proteína revelaram que na PspA1 todos os peptídeos ligantes do Ps 6B se localizam no domínio N-terminal enquanto na PspA3 o Ps 6B se liga também em peptídeos da região definidora de clado (BARAZZONE et al., 2014). Isto sugere que a conjugação do Ps à PspA3 poderia interferir com a especificidade desta proteína, modificando o espectro de reconhecimento dentro da mesma família.

1.6 Polissacarídeo 6B de *Streptococcus pneumoniae*

O sorotipo 6B teve uma das mais altas taxas de incidência em todo o mundo, constituindo uma das principais causas de infecção em crianças junto com os sorotipos 14, 19F e 23F (OVERTUF, 2000). Este sorotipo tem a mais lenta maturação da resposta que tem sido observada entre os polissacarídeos capsulares de pneumococo (LEINONEN et al., 1986). Também tem sido frequentemente associado com a resistência a vários antibióticos (DAGAN; FRASER, 2000; HENRIQUES et al., 2000). Por estas razões, está incluído em todas as preparações multivalentes que têm sido desenvolvidas, geralmente em doses maiores do que os outros sorotipos.

No Brasil durante o período anterior à introdução da PCV-10 o 6B era um dos sorotipos predominantes isolado de meningite pneumocócica e um dos mais resistentes a antibióticos (DE O MENEZES et al., 2011). Segundo dados do Sistema

Regional de Vacinas (SIREVA) de 2000 a 2005 este sorotipo era um dos de maior incidência em crianças menores de cinco anos no país (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, 2006).

A sua estrutura química foi elucidada nos anos setenta (KENNE; LINDBERG; MADDEN, 1979) e sua unidade repetitiva é composta por três monossacarídeos α -D-glicose, α -D-galactose e α -L-ramnose; um ribitol e um grupo fosfato, dispostos como se segue:

Figura 9 - Estrutura da unidade repetitiva do polissacarídeo capsular do sorotipo 6B de *S. pneumoniae*, composta pelos monossacarídeos: α -D-glicose, α -D-galactose e α -L-ramnose; ribitol e um grupo fosfato.

Este polissacarídeo apresenta uma estrutura de polímero linear com ligações fosfodiéster que conferem uma carga negativa periódica. Sua relativa simplicidade estrutural e semelhança com o ácido desoxirribonucléico (ADN) são os principais determinantes da sua baixa imunogenicidade (SUN et al., 1999).

No trabalho aqui apresentado, a PspA, uma das proteínas mais imunogênicas de *S. pneumoniae* foi conjugada ao sorotipo 6B, um dos sorotipos de maior relevância clínica no Brasil e no mundo. Foram produzidos conjugados por dois métodos de conjugação (conjugação intermediada por DMT-MM e aminação redutiva) envolvendo a ligação do Ps 6B à PspA clado 1 ou clado 3 e foi avaliada a resposta imune humoral induzida pelos conjugados.

2 OBJETIVO

-Sintetizar conjugados entre o sorotipo 6B de *S. pneumoniae* e a proteína A de superfície pneumocócica (PspA) por dois métodos de conjugação.

-Avaliar a resposta imune humoral gerada pelos conjugados.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Para uma melhor compreensão do trabalho apresentamos um esquema que resume as etapas realizadas durante o desenvolvimento do projeto. As etapas principais foram: a purificação da PspA (Figura 10), a obtenção dos conjugados e avaliação da resposta imune induzida (Figura 11).

Figura 10 - Esquema representativo das etapas de purificação da PspA.

Figura 11 - Esquema representativo das etapas de obtenção dos conjugados e avaliação da resposta imune.

3.1 Materiais

O Ps 6B utilizado neste trabalho foi adquirido da ATCC-*The American Type Culture Collection*- (Merck & Co)

3.2 Cepas bacterianas

As cepas bacterianas utilizadas nos ensaios de opsonofagocitose foram cedidas pelo Instituto Adolfo Lutz (São Paulo, S.P., Brasil) e mantidas como estoques congelados a -80°C em meio Todd-Hewitt (BD Biosciences) suplementado com 0,5% de extrato de levedura (THY) (Sigma Chemical) contendo 10% de glicerol (USB).

3.3 Purificação de fragmentos recombinantes da PspA clado 1 e clado 3

3.3.2 Obtenção dos fragmentos recombinantes da PspA1 e PspA3

Fragmentos recombinantes da PspA clado 1 e clado 3, contendo a região N-terminal e a região de prolina, foram inseridas no vetor de expressão pET-37b (+) pelo laboratório de Biotecnologia Molecular IV do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan (SILVA et al., 2007). O vetor pET-37b (+) contém uma sequência que codifica uma cauda de 6 histidinas, facilitando a purificação da proteína por cromatografia de pseudoafinidade com metais. Clones de *Escherichia coli* BL21 (DE3) contendo os vetores de expressão pET37-pspA1 e pET37-pspA3 foram cultivados no Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos, que forneceu a massa celular proveniente do cultivo para purificação da proteína.

3.3.3 Lise celular e clarificação

A purificação foi feita de acordo com CARVALHO et al., 2011. A massa celular congelada (aproximadamente 100 g) foi ressuspensa em 1 L de tampão de lise (fosfato 10 mM, EDTA 10 mM, Triton X-100 0,1% e PMSF 10 mM como inibidor de protease; pH 7,5). A suspensão celular obtida foi homogeneizada num misturador (CAT Ingenieurbüro) e após as células foram rompidas num homogeneizador contínuo a alta pressão (Gaulin APV 60) por 12 minutos a 600 bar com controle de temperatura. Após a ruptura celular, o homogenato foi clarificado por centrifugação a 17 969 g durante 2 h a 4 °C e o sobrenadante purificado por cromatografia.

3.3.4 Purificação por cromatografia

Para as etapas cromatográficas 250 mL da resina Q-Sepharose (troca aniônica), e 500 mL da resina IMAC-Sepharose (pseudo-afinidade por metal) foram empacotados em colunas XK50 (5 cm Ø), enquanto 75 mL da resina SP-Sepharose (troca catiônica) foram empacotados em coluna XK26 (2,6 cm Ø). Foi empregado um cromatógrafo (Akta Explorer). O fluxo usado para as colunas XK50 foi de 50 ml/min (2,5 mL/cm²/min) e para a coluna XK26 o fluxo foi de 13 mL/min (2,5 mL/cm²/min).

As condições iniciais foram selecionadas de acordo com o ponto isoelétrico (pI) teórico dos fragmentos recombinantes da PspA3 (pI=4,74) e da PspA1 (pI=5,11).

Para a purificação da rPspA3 (Figura 12) a Q-Sepharose foi equilibrada com tampão fosfato de sódio 0,01 M + cloreto de sódio 0,05 M, pH 7,5 e a eluição da proteína foi feita com tampão fosfato de sódio 0,01 M + cloreto de sódio 0,3 M pH 7,5. A IMAC-Sepharose foi previamente carregada com sulfato de níquel II (NiSO_4) 0,5 M, lavada e logo equilibrada com tampão fosfato de sódio 0,01 M + cloreto de sódio 0,3 M, pH 7,0; a eluição foi feita com fosfato de sódio 0,01 M + imidazol 0,2 M pH 7,5. A fração eluída desta teve o pH abaixado até um pH inferior ao ponto isoelétrico da rPspA3 e foi congelada. Por outro lado, a SP-Sepahrose foi equilibrada com tampão acetato de sódio 0,025 M pH 4,0 e a eluição foi feita com gradiente descontínuo de tampão acetato de sódio 0,025 M pH 4,0 + cloreto de sódio (de 0,5 M a 1 M).

Figura 12 - Fluxograma da purificação da rPspA3

Para a purificação da rPspA1 (Figura 13), as etapas cromatográficas foram as mesmas com algumas variações na força iônica dos tampões empregados e no número de lavagens. A Q-Sepharose foi equilibrada com tampão fosfato de sódio 0,03 M pH 7,5 e a eluição foi feita com tampão fosfatode sódio 0,03 M + cloreto de sódio 0,2 M, pH 7,5. A eluição na IMAC-Sepharose foi feita diretamente após a adsorção; com fosfato 0,01 M + imidazol 0,2 M, pH 7,5. A fração eluída desta resina foi submetida a abaixamento do pH até um pH inferior ao ponto isoelétrico da PspA e após foi congelada. A SP-Sepharose foi equilibrada com tampão acetato de sódio 0,025 M pH 4,0, e a eluição foi feita com um gradiente descontínuo de tampão acetato de sódio 0,025 M pH 4,0 + cloreto de sódio (de 0,3 M a 1 M).

Figura 13 - Fluxograma da purificação da rPspA1

As frações obtidas depois de cada etapa de purificação foram quantificadas pelo método do ácido bicinchonínico (BCA) e analisadas por SDS-PAGE 12% sob condições redutoras. A pureza relativa de cada fração (considerada como a porcentagem da banda de rPspA contra a intensidade total das bandas restantes na linha do gel de eletroforese) foi determinada por densitometria do gel de eletroforese num densitômetro Biorad GS-800 e posterior análise com o programa Quantity One 4.6.3.

3.4 Preparação do Ps 6B para conjugação

3.4.1 Hidrólise do polissacarídeo 6B

O Ps 6B foi fragmentado mediante hidrólise ácida. Ao Ps 6B em uma concentração de 10 mg/ml foi adicionado ácido clorídrico 0,5 M com aquecimento a 80 °C sob refluxo e agitação durante 1 h. A reação foi interrompida pela adição de hidróxido de sódio (NaOH) (Sigma-Aldrich) até a neutralização (pH 7,0) e purificada por cromatografia de gel filtração em SephadexTM- G25 (GE Healthcare), coluna XK26/40, empregando água como fase móvel.

3.4.2 Oxidação do polissacarídeo 6B

O Ps 6B hidrolisado foi oxidado com metaperiodato de sódio (NaIO₄) (Sigma-Aldrich) 0,01 M na presença de tampão fosfato de sódio (0,01 M) por meia hora a temperatura ambiente no escuro. A reação foi detida pela adição de glicerol (usb, USA) (10 µL por mL de reação). O glicerol oxidado e o iodeto de sódio foram eliminados através de cromatografia de gel filtração em SephadexTM- G25, coluna

XK26/40, empregando água como fase móvel. O nível de oxidação foi expresso como a porcentagem de unidades repetitivas oxidadas (URO), calculado pela seguinte fórmula: **URO= (mols de grupos C=O/mols de unidades repetitivas) x 100.**

3.4.3 Derivatização do polissacarídeo 6B com 1,8-diaminooctano

O Ps 6B oxidado a uma concentração de 10 mg/mL foi incubado por 48 horas com o espaçador 1,8-diaminooctano (OCT) (Sigma-Aldrich) e cianoborodireto de sódio (NaBH_3CN) (Sigma-Aldrich) na proporção de 50 vezes o número de moles de aldeído em meio contendo fosfato de sódio 0,01 M (pH=7,0). O produto da reação foi purificado por cromatografia de gel filtração em SephadexTM-G25, coluna XK26/40 empregando água como fase móvel.

3.5 Preparação da rPspA para conjugação

3.5.1 Proteção dos resíduos de lisina presentes na rPspA

A proteção dos resíduos de lisina presentes na rPspA foi feita mediante N-alquilação dos grupos $\epsilon\text{-NH}_2$. Acrescentou-se formaldeído (Synth) na concentração de 5% (v/v) na presença de cianoborodireto de sódio 5 M dissolvido em hidróxido de sódio (NaOH) 1 M (10 μL por mL de reação) à proteína dissolvida em tampão fosfato de sódio 0,01 M (pH=7,0) a uma concentração de 2,7 mg/mL. A reação ocorreu por 24 horas e foi parada pela adição de borodireto de sódio. A purificação foi efetuada por filtração tangencial empregando membrana de celulose com um valor de corte de 5 kDa.

3.5.2 Introdução do espaçador diidrazida do ácido adípico na rPspA

A introdução do espaçador diidrazida do ácido adípico (ADH) na proteína (rPspA1 ou rPspA3) foi intermediada pelo agente ativador hidrocloreto de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida (EDAC). A proteína foi dissolvida em tampão MES (ácido morfolino etanossulfônico) (Vetec LTDA) 0,1 M, pH=6,0 a uma concentração de 5 mg/mL, e o agente ativador EDAC (Sigma-Aldrich) foi adicionado até atingir uma concentração de 3,5 mg/mL. O espaçador ADH (Sigma-Aldrich) foi acrescentado em uma proporção 3: 1 (m:m) em relação à proteína. A reação foi

incubada durante 2 horas a temperatura ambiente e após foi purificada em *centricon* com membrana de 3 kDa. Esta proteína foi usada para a conjugação pelo método de aminação redutiva.

3.6 Conjugação

3.6.1 Conjugação intermediada pelo DMT-MM

A proteína (rPspA1 ou rPspA3) a uma concentração de 10 mg/mL foi ativada com 0,1M de cloreto de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolino (DMT-MM) (Sigma-Aldrich) e incubada com o Ps 6B-OCT (10 mg/mL) durante 24 horas a temperatura ambiente em tampão fosfato de sódio 0,01 M pH = 7,0. A reação foi parada pela adição de acetato de amônio (Synth) e logo foi purificada por cromatografia de gel filtração empregando resina Superose-12 (GE Healthcare), coluna HR 16/50 e como fase móvel uma solução de fosfato 0,05 M; cloreto de sódio 0,15 M; pH = 7,0.

3.6.2 Conjugação via aminação redutiva

O Ps 6B oxidado e a proteína modificada com ADH (rPspA1 ou rPspA3), ambos a uma concentração de 10 mg/mL foram incubados em tampão fosfato salino (PBS) pH=7,2 durante 48 h a temperatura ambiente em presença do agente redutor cianoboroidreto de sódio na proporção de 20 vezes o número de moles de aldeído. A reação foi parada pela adição de boroidreto de sódio e foi purificada por cromatografia de gel filtração empregando resina Superose-12, coluna HR 16/50 e como fase móvel uma solução de fosfato 0,05 M; NaCl 0,15 M; pH 7,0.

3.7 Ensaios imunológicos

3.7.1 Esquema de imunização

Camundongos Balb/c fêmeas entre 6 e 8 semanas fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan foram imunizados por via subcutânea num esquema de três doses em intervalo de 14 dias. Foi realizada sangria pelo plexo retro-orbital nos 13º, 27º e 41º dias após a primeira imunização. Foi usado como adjuvante hidróxido

de alumínio (125 µg por dose). A Tabela 1 mostra os ensaios efetuados assim como as doses empregadas.

Tabela 1 - Ensaios de imunização para teste dos diferentes conjugados

Experimento	Grupos	Dose Ps (µg)	Dose PspA (µg)	Nº de animais
1º	Controle (NaCl 0,9% + Al(OH) ₃)	-	-	8
	Conjugado (2)* Ps 6B(OCT)-PspA1	15	20	8
	Coadministrado Ps 6B(OCT) + PspA1	15	20	8
	Conjugado (2)* Ps 6B(OCT)-PspA1	7	10	8
	Coadministrado Ps 6B(OCT) + PspA1	7	10	8
	Conjugado (5)* Ps 6B(OCT)-PspA3	15	20	8
	Coadministrado Ps 6B(OCT) + PspA3	15	20	8
	Conjugado (5)* Ps 6B(OCT)-PspA3	8	10	8
	Coadministrado Ps 6B(OCT) + PspA3	8	10	8
2º	Controle (NaCl 0,9% + Al(OH) ₃)	-	-	3
	Conjugado (1)* Ps 6B(OCT)-PspA1	3	10	3
	Conjugado (4)* Ps 6B(OCT)-PspA3	4,5	10	3
3º	Controle (NaCl 0,9% + Al(OH) ₃)	-	-	3
	Conjugado (3)* Ps 6B(OCT)-PspA1	12,7	40	3
	Conjugado (6)* Ps 6B(OCT)-PspA3	21,6	40	3
4º	Controle (NaCl 0,9% + Al(OH) ₃)	-	-	6
	Conjugado (1)* Ps 6Box-PspA1(ADH)	7	10	6
	Coadministrado Ps 6Box + PspA1(ADH)	7	10	6
	Conjugado (3)* Ps 6Box-PspA3(ADH)	10	10	6
	Coadministrado Ps 6Box + PspA3(ADH)	10	10	6

* o número entre parêntese refere-se à ordem de obtenção dos conjugados segundo designado nas Tabelas 6 e 7 do capítulo Resultados e Discussão.

3.7.2 Determinação do título de anticorpos anti-PspA por ELISA

Placas de 96 poços Maxisorp (Nalgen Nunc International) foram sensibilizadas com 100 µL/poço de uma solução de rPspA 1 µg/mL em PBS pH=7,2 e incubadas por 24 h a 4 °C. Após o coating as placas foram bloqueadas com uma solução de leite desnatado Molico® (Nestlé, São Paulo, Brasil) 1% (m:v) por 40 minutos a 37 °C. Depois de lavadas três vezes com solução PBS-Tween 20 (0,05%) as placas foram incubadas durante 90 minutos a temperatura ambiente com 100 µL de soro previamente diluído; foram avaliadas 7 diluições seriadas 1:2, começando de uma diluição do soro de 1:100. Após nova lavagem adicionou-se 100 µL/poço de uma solução contendo anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (Sigma-Aldrich) diluído 1:1000 e incubou-se por 90 minutos a temperatura ambiente. Na

etapa final, as placas foram lavadas e incubadas por 20 minutos a temperatura ambiente no escuro com 100 μ L/poço de solução reveladora contendo 0,5 mg/mL de orto-fenilendiamina (Sigma-Aldrich) e de peróxido de hidrogênio 0,015% (v:v) em tampão citrato de sódio 0,1 M; pH=5,0. A reação foi interrompida pela adição de 50 μ L/poço de ácido sulfúrico (Synth) 4 M e a absorbância medida a 492 nm utilizando o leitor de placas Multiskan EX (Labsystems Uniscience). O título de anticorpos foi determinado como o $\log_{10}$ da diluição do soro na qual se obtém uma DO=0,1.

3.7.3 Determinação do título de anticorpos anti-Ps 6B por ELISA

Para a determinação de anticorpos IgG anti-Ps 6B placas de 96 poços Maxisorp foram sensibilizadas com 100 μ L de uma solução 50 μ g/mL de Ps 6B em PBS pH=7,2; 24 h a 37 °C. Após o coating as placas foram bloqueadas com uma solução de leite desnatado Molico® (Nestlé, São Paulo, Brasil) 1% (m:v) por 40 minutos a 37 °C. Depois de lavadas três vezes com solução PBS-Tween 20 (0,05%) as placas foram incubadas durante 90 minutos a temperatura ambiente com 100 μ L de soro previamente diluído; foram avaliadas 7 diluições seriadas 1:2, começando de uma diluição do soro de 1:20. As etapas de incubação com o anticorpo secundário e revelação foram realizadas como descrito no item 3.7.2. O título de anticorpos foi determinado como o $\log_{10}$ da diluição do soro na qual se obtém uma DO=0,1.

3.7.4 Ensaio de exposição de epítomos

Para avaliar a exposição de epítomos antigênicos nos conjugados e na proteína modificada as placas de 96 poços Maxisorp foram sensibilizadas por 24 h a 4 °C com uma solução contendo 5 μ g/mL de proteína modificada ou conjugada em PBS pH=7,2. Após o tempo de incubação as placas foram lavadas três vezes com solução de PBS-Tween 20 (0,05%) e logo bloqueadas com uma solução de leite desnatado 1% (m:v) por 40 minutos a 37 °C. Após três lavagens as placas foram incubadas durante 90 minutos a temperatura ambiente com 100 μ L/poço de soro anti-PspA1 diluído 1:200 ou soro anti-PspA3 diluído 1:600, ambos produzidos em camundongos pela imunização com PspA recombinante clado 1 ou 3. Após nova lavagem adicionou-se 100 μ L/ poço de uma solução contendo anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase diluído 1:1000 e incubou-se 90 minutos a temperatura ambiente. Na etapa final as placas foram lavadas e incubadas por 20

minutos a temperatura ambiente no escuro com 100 µL/poço de solução reveladora contendo 0,5 mg/mL de orto-fenilendiamina, e peróxido de hidrogênio 0,015% (v:v) em tampão citrato 0,1 M; pH 5,0. A reação foi interrompida pela adição de 50 µL/poço de ácido sulfúrico 4 M e a absorbância medida a 492 nm. Os resultados foram expressos em função do valor de DO obtido para cada amostra avaliada.

3.7.5 Ensaio de antigenicidade do Polissacarídeo 6B

A antigenicidade do Ps 6B conjugado foi avaliada mediante ELISA de inibição. Na primeira etapa do ensaio o soro padrão anti-Ps 6B (Serum Statens Institute) diluído 1:1500 foi inibido durante uma noite a 4 °C com o Ps 6B nas formas nativa, oxidada e conjugada em uma faixa de concentrações entre 0,005 e 0,5 mg/mL. Na segunda etapa o soro inibido foi transferido para uma placa de 96 poços Maxisorp previamente sensibilizada com Ps 6B nativo (ATCC) e bloqueada com solução de leite desnatado 1% (m:v). A placa foi incubada com o soro inibido durante 90 minutos. Depois de lavar a placa três vezes com solução PBS-Tween 20 adicionou-se 100 µL/poço de uma solução contendo anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase (Sigma-Aldrich) diluído 1:3000 e incubou-se por 90 minutos a temperatura ambiente. A continuação a etapa de revelação foi realizada como descrito no item 3.7.2. Para análise dos resultados foi construído um gráfico de porcentagem de inibição em função da concentração de antígeno que atuou como inibidor. A porcentagem de inibição foi definida por $100 - [(Abs\ I / Abs\ SI) \times 100]$, onde **Abs I** é a absorbância do soro que ficou incubado com uma determinada concentração de inibidor e **Abs SI** a absorbância do soro sem inibidor.

3.7.6 Ensaio de opsonofagocitose

Os 'pools' dos soros dos camundongos imunizados tiveram seu complemento inativado por incubação a 56 °C durante 30 minutos. As bactérias (item 3.2) foram cultivadas em meio Todd-Hewitt até a concentração de aproximadamente 10^8 UFC/mL foram centrifugadas por 5 minutos a 4000 rpm. Os 'pellets' obtidos foram lavados e ressuspensos em tampão Hank's (Invitrogen Corporation), alíquotas de 25 µL contendo $2,5 \times 10^6$ UFC foram incubadas por 30 min a 37 °C na presença do 'pool' dos soros em teste (diluições 1:8 e 1:16) em um volume final de 100 µL. Após a incubação foi acrescido 10% de soro normal de camundongo como fonte de complemento e seguiu-se uma nova incubação a 37 °C por 30 min. As amostras

foram lavadas e logo incubadas com 4×10^5 células peritoneais a 37°C por 45 min com agitação (250 rpm). As células peritoneais usadas nessa etapa foram coletadas através de lavagem do peritônio de camundongos previamente estimulados (48 h antes do ensaio) com $10\ \mu\text{g}$ de concanavalina A de *Canavalia ensiformis* (Sigma-Aldrich) (GOULART et al., 2011).

Após o término da incubação (45 min) a reação foi interrompida em gelo por 5 minutos e as amostras diluídas em PBS para plaqueamento em ágar sangue. As placas foram incubadas a 37°C , 5% de dióxido de carbono (CO_2) e o número de UFC (Unidades Formadoras de Colônias) recuperadas após 18 h de incubação foram contadas.

3.8 Técnicas analíticas

3.8.1 Quantificação de polissacarídeo

A concentração de polissacarídeo 6B foi determinada pelo método orcinol-sulfúrico (BRUCKNER, 1955). A curva padrão foi feita com D-glicose (Sigma-Aldrich) com concentrações que variaram de 0,1 e 1,0 mg/mL. Pipetou-se 100 μL de branco (água), padrão e amostra em tubos de vidro, adicionou-se 200 μL de orcinol (Sigma-Aldrich) (2% em ácido sulfúrico 25%) e 1,5 mL de ácido sulfúrico (Synth) 60%. A mistura foi vortexada. Os tubos foram incubados por 20 minutos a 80°C e após esfriados a temperatura ambiente. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro no comprimento de onda de 530 nm.

3.8.2 Quantificação de aldeído

A quantificação de aldeído no polissacarídeo oxidado foi feita pelo método de BCA (TYLLIANAKYS et al., 1994). Esta técnica baseia-se na habilidade do aldeído e da proteína de reduzir Cu^{2+} para Cu^+ , formando um complexo quelante com o ácido bicinchonínico (BCA). A curva padrão foi feita com glicose (Sigma-Aldrich) em concentrações que variaram de 100 μM a 1 mM. 25 μL de branco (água), solução padrão e amostra foram adicionados em microplacas sobre os quais se acrescentou 200 μL de uma solução (50:1 v/v) contendo BCA (Sigma-Aldrich) e sulfato de cobre 4% (Sigma-Aldrich). A microplaca foi incubada por 30 minutos a 80°C e após

esfriados a temperatura ambiente. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro no comprimento de onda de 550 nm.

3.8.3 Quantificação de grupos aminos

A quantificação de grupos amino foi feita pelo método do ácido 2,4,6-trinitrobenzenossulfônico (TNBS) (QI; KEYHANI; LEE, 1988) com algumas modificações. Para a determinação de grupos aminos no Ps 6B derivatizado com 1,8-diaminooctano, a curva padrão foi feita com 1,8-diaminooctano (Sigma-Aldrich) em concentrações que variaram de 1 mM a 4 mM; entretanto, para a determinação de grupos amino na proteína, foi empregada diidrazida do ácido adípico (ADH) (Sigma-Aldrich) como padrão em concentrações que variaram de 0,05 μ M a 0,35 μ M. 50 μ L de branco (água), padrão e amostra foram adicionados em microplacas sobre os quais se acrescentou 50 μ L de uma solução de borato de sódio 0,2 M; pH = 8,5, seguido da adição de 50 μ L de uma solução de TNBS (Sigma-Aldrich) a 1% (v/v) e incubou-se por 40 minutos a temperatura ambiente no escuro. Após foi adicionado 100 μ L de uma solução NaHCO_3 0,01 M + Na_2CO_3 0,1 M; pH = 10,8 e a absorbância foi lida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 492 nm.

3.8.4 Quantificação de proteína

A quantificação de proteína foi feita pelo método de BCA, desta vez a curva padrão empregou albumina de soro bovino (BSA) (Sigma-Aldrich) em concentrações que variaram de 0,2 mg/mL a 1 mg/mL. 25 μ L de branco (tampão fosfato 10 mM, NaCl 150 mM), solução padrão e amostra foram adicionados em microplacas sobre as quais se acrescentou 200 μ L de uma solução (50:1 v/v) contendo ácido bicinchonínico (BCA) (Sigma-Aldrich) e sulfato de cobre 4% (Sigma-Aldrich). A microplaca foi incubada por 30 minutos a 37 °C e após deixada esfriar a temperatura ambiente. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro no comprimento de onda de 550 nm.

3.8.5 Cromatografia Líquida de Alta Resolução

Esta técnica foi usada para a determinação da massa molar do polissacarídeo nativo, hidrolisado, oxidado e derivatizado com OCT assim como análise do perfil do conjugado. Para este fim a coluna de gel filtração TSK-gel GMPWXL foi calibrada

com padrões de dextran (12 kDa, 25 kDa, 50 kDa, 150 kDa, 470 kDa e 2000 kDa) (Sigma-Aldrich). Foram injetados 50 µL de cada amostra empregando como fase móvel uma solução de fosfato 0,01 M, NaCl 0,15 M, pH = 7,5 e o fluxo foi de 0,4 mL/min. Foi usado um cromatógrafo de HPLC *Agilent*.

3.8.6 Eletroforese

A eletroforese de proteínas foi realizada em géis de poliacrilamida (12%) com SDS utilizando um sistema vertical (LAEMMLI; BEGUIN; GULLEN-KELLENBERGER, 1970). Foram aplicados 10 µg de proteína por poço na forma livre ou conjugada e com auxílio do equipamento Electrophoresis Power Supply EPS301 (GE Healthcare) foi aplicada uma corrente de 0,05 A. A visualização das bandas de proteína foi feita por coloração com Coomassie Blue e a detecção de polissacarídeo no conjugado por coloração com reagente de Schiff (Sigma-aldrich).

3.8.7 Espalhamento dinâmico da luz

O raio molecular das proteínas derivatizadas com ADH, assim como dos conjugados sintetizados via aminação redutiva foi avaliado por espalhamento da luz num instrumento Zetasizer Nano S (Malvern) a 25 °C. As amostras foram preparadas a uma concentração de 1 mg/mL e foram filtradas antes de efetuar a medição. Este experimento foi realizado no Laboratório da Dra. Yolanda Cuccovia no Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

3.8.8 Análise por dicroísmo circular

Os espectros de dicroísmo circular foram obtidos no espectropolarímetro J-810 (Jasco), em comprimentos de onda que variaram entre 185 e 260 nm. Foram realizadas cinco medidas repetidas de cada amostra em tampão fosfato de sódio dibásico 10 mM (pH = 7,5) a 20 °C. O algoritmo CDSSTR foi utilizado para realizar a deconvolução dos espectros obtidos (JOHNSON, 1999).

3.9 Análises estatísticas

A análise estatística foi realizada a partir do teste paramétrico Análise de Variância (ANOVA) fator único, seguido pelo teste de Tukey. Em todas as análises adotou-se como nível de significância $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Purificação da rPspA1 e rPspA3

4.1.2 Purificação por cromatografia

Após a ruptura celular, o homogenato foi clarificado por centrifugação e o sobrenadante (ou homogenato clarificado) submetido ao processo de purificação cromatográfica que envolveu três etapas com a seguinte sequência: Q-Sepharose (troca aniônica), IMAC-Sepharose (pseudo-afinidade por interação com metais) e SP-Sepharose (troca catiônica). A troca aniônica pode ser eficiente para reduzir o LPS (ZHAO et al., 2010), além de que uma etapa prévia de purificação por troca iônica permitiria eliminar um grande número de contaminantes antes de passar para a cromatografia de afinidade e assim aumentar o tempo de vida da resina IMAC-Sepharose.

4.1.2.1 Purificação da rPspA3

Como mostra o perfil eletroforético da purificação por Q-Sepharose (Figura 14), a rPspA3 eluiu na terceira fração (QF3) com uma pureza de 92% em relação ao (homogenato clarificado), mas com alguns contaminantes ainda, razão pela qual esta fração foi submetida a refinamento por cromatografia de afinidade.

Figura 14 - Perfil eletroforético das frações eluídas da coluna Q-Sepharose durante a purificação da rPspA3. Gel de poliacrilamida 12%. Cada poço foi carregado com 10µg de proteína. Linha 1: Padrão de massa molecular (kDa); linha 2: Homogenato; linha 3: Homogenato clarificado; linha 4: QF1 (fração não adsorvida: fosfato 10 mM, NaCl 50 mM); linha 5: QF2 (fosfato 10 mM, NaCl 100 mM); linha 6: QF3 (fosfato 10 mM, NaCl 300 mM); linha 7: QF4 (fosfato 10 mM, NaCl 500 mM); linha 8: QF5 (limpeza: fosfato 10 mM, NaCl 1000 mM).

Na IMAC-Sepharose a proteína eluiu na terceira fração (NiF3), com fosfato de sódio 10mM pH 7,5 + imidazol 200 mM como mostra a Figura 15. Esta etapa permitiu recuperar a proteína com uma pureza relativa de 95%, no entanto, foram

observadas perdas consideráveis nas frações de adsorção à coluna (NiF1) e primeira lavagem (NiF2). Alguns autores atribuem a baixa recuperação desta resina a uma mudança no estado de oxidação ou a um complexo formado entre o Ni^{2+} e os componentes intracelulares do homogenato (SCHMIDT et al., 2007) mesmo que neste caso a fração adsorvida à IMAC-Sepharose tenha sido previamente purificada por troca iônica.

Figura 15 - Perfil eletroforético das frações eluídas da coluna IMAC-Sepharose durante a purificação da rPspA3. Gel de poliacrilamida 12%. Linha 1: Padrão de massa molecular (kDa); linha 2: QF3 (fração da Q-Sepharose); linha 3: NiF1(fração não adsorvida: fosfato 10 mM, NaCl 300 mM); linha 4: NiF2 (lavagem: fosfato 10 mM); linha 5: NiF3 (eluição: fosfato 10 mM, imidazol 200 mM); linha 6: NiF4 (limpeza: EDTA 200 mM); linha 7: fração pH 4; linha 8: fração crio 4.

Antes de passar para a próxima etapa cromatográfica, (troca catiônica em SP-Sepharose), a fração eluída da IMAC-Sepharose (NiF3) teve o pH acidificado até 4,0; valor inferior ao pI da PspA, observando a precipitação de contaminantes. Esta fração foi centrifugada, recuperando a PspA no sobrenadante. Seguidamente esta fração foi congelada, processo durante o qual precipitaram mais proteínas contaminantes sem perdas de PspA.

Já na purificação por SP-Sepahrose a proteína foi recuperada durante as três primeiras lavagens (frações SPF2, SPF3 e SPF4), (Figura 16) eluídas a uma concentração de NaCl de 500, 600 e 700 mM, respectivamente. No entanto, foram selecionadas as frações de mais alta pureza relativa (SPF2, 90%) e (SPF3, 92%).

Figura 16 - Perfil eletroforético das frações eluídas da coluna SP-Sepharose durante a purificação da rPspA3. Gel de poliacrilamida 12%. Linha 1: Padrão de peso molecular (kDa); linha 2: fração pH 4; linha 3: fração crio 4; linha 4: SPF1(fração não adsorvida: acetato 25 mM); linha 5: SPF2 (eluição: acetato 25 mM, NaCl 500 mM); linha 6: SPF3 (eluição: acetato 25 mM, NaCl 600 mM); linha 7: SPF4 (eluição: acetato 25 mM, NaCl 700 mM); linha 8: SPF5 (lavagem: acetato 25 mM, NaCl 800 mM) linha 9: SPF6: (lavagem: acetato 25 mM, NaCl 1000 mM); linha 10: SPF7 (limpeza: fosfato 25 mM, NaCl 1000 mM).

A não inclusão da fração SPF4 implicou em uma perda relevante para a recuperação final. Na Tabela 2 estão apresentados os resultados da purificação da rPspA3.

Tabela 2 - Resultados da purificação da rPspA3

Amostra	Proteína total (g)	Pureza relativa (%)	rPspA3 (g)	Recuperação rPspA3 (%)
Homogenato clarificado	35,1	75,6	26,5	100
Q-Sepharose (QF3)	6,71	92,3	6,19	23,3
IMAC-Sepharose (NiF3)	1,78	95,3	1,70	6,4
Frac. Precipitada a pH=4	1,45	92,2	1,34	5,0
Frac crioprecipitada	1,36	96,0	1,30	4,9
SP-Sepharose (SPF2 e SPF3)	1,73	90,0 e 92,0	1,65	6,2

4.1.2.2 Purificação da rPspA1

Como explicado anteriormente as etapas de purificação da rPspA1 foram basicamente as mesmas empregadas para purificar a rPspA3 com algumas variações na concentração dos tampões e no número de lavagens. Na IMAC-Sepharose, por exemplo, a eluição foi feita com 200 mM de imidazol diretamente após a adsorção sem realizar lavagem intermediária. Foi adotada esta alternativa devido às perdas observadas com a lavagem intermediária realizada na IMAC-Sepharose durante a purificação da rPspA3. Desta vez a proteína eluiu com uma pureza de 67% e não se verificou perdas na fração de adsorção.

Os resultados globais da purificação da rPspA1 estão apresentados na Tabela 3. Das frações eluídas da SP-Sepharose foram selecionadas as de maior pureza (SPF6, 95,0%) e (SPF7 95,4%).

Tabela 3 - Resultados da purificação da rPspA1

Amostra	Proteína total (g)	Pureza relativa rPspA1 (%)	rPspA1 (g)	Recuperação rPspA1 (%)
Homogenato clarificado	18,9	21,8	4,13	100
Q-Sepharose (QF3)	3,12	42,8	1,34	32,4
IMAC-Sepharose (NiF2)	0,72	66,6	0,48	11,6
Frac. precipitada a pH=4	0,30	86,5	0,26	6,3
Frac. crioprecipitada	0,16	93,0	0,15	3,5
SP-Sepharose(SPF6+SPF7)	0,24	95,0 e 95,4	0,23	5,6

De forma geral os fragmentos recombinantes da PspA clado 1 e clado 3 foram purificados com uma recuperação final de 6,2% para a PspA3 e 5,6% para a PspA1. A baixa recuperação está associada às perdas observadas em algumas etapas como nas frações de adsorção à coluna e lavagem intermediária na IMAC-Sepharose durante a purificação da rPspA3. Por outro lado, era necessário obter a proteína com um elevado grau de pureza por se tratar de uma biomolécula a ser usada como proteína carreadora para compor um candidato vacinal. Por este motivo na etapa de purificação da rPspA3 por SP-Sepharose, foi descartada a fração SPF4 por não apresentar um grau de pureza adequado.

Em relação à pureza relativa, para a rPspA1 observou-se um aumento da pureza com o número de etapas cromatográficas, no entanto este aumento não foi observado para a rPspA3. Desde a primeira etapa cromatográfica na Q-Sepharose a rPspA3 recuperada apresentou uma pureza relativa superior a 90%, devido à indução da proteína ter sido alta. Poderia pensar-se que etapas de purificação subsequentes não fossem necessárias, no entanto tentativas de conjugações realizados por nosso grupo com a rPspA3 purificada por duas etapas cromatográficas (IMAC-Sepharose e Q-Sepharose) revelaram que ao concentrar a proteína ocorria precipitação irreversível. Considerando a existência de contaminantes com a mesma massa molecular da rPspA foi efetuada uma eletroforese bidimensional, detectando vários 'spots' na mesma região da massa molecular da rPspA3 (PERCIANI, 2011). A partir deste momento o protocolo de purificação passou a empregar uma etapa cromatográfica adicional na resina SP-Sepharose. Pelo anteriormente exposto é de supor que mesmo que a rPspA3 tenha atingido uma elevada pureza desde a primeira etapa cromatográfica era

necessário continuar com as restantes etapas de purificação para eliminar possíveis contaminantes não aparentes no gel de eletroforese.

A recuperação final não foi satisfatória, mas as duas proteínas foram recuperadas com uma pureza relativa superior a 90%.

4.2 Preparação do Ps 6B para a conjugação

4.2.1 Hidrólise do Ps 6B

A hidrólise do polissacarídeo capsular tem como objetivo reduzir a massa molecular, e assim diminuir a viscosidade, facilitando a purificação e o desenvolvimento das próximas etapas de reação.

Cabe ressaltar que a massa molecular ótima do polissacarídeo em vacinas conjugadas é uma questão aberta. A literatura indica que polissacarídeos de elevada massa molecular induzem níveis de anticorpos mais altos (WESSELS et al., 1998), enquanto oligossacarídeos menores são menos imunogênicos que oligômeros de massa molecular média (ANDERSON et al., 1986). O exposto anteriormente sugere que deve existir um tamanho ótimo de oligossacarídeo para a obtenção de glicoconjugados imunogênicos.

Para a produção de vacinas conjugadas oligossacarídeos de massa molecular média (10-30 kDa ou 30-100 kDa) têm sido normalmente utilizados. As vacinas conjugadas existentes na atualidade contra pneumococo empregam tanto polissacarídeos nativos como seus fragmentos (BIEMANS et al., 2010; HAUSDORFF; SIBER; PARADISO, 2009).

Os locais passíveis de sofrerem hidrólise no Ps 6B são as ligações glicosídicas e a ligação fosfodiéster (Figura 17). A análise por HPAEC-PAD dos polissacarídeos 6B, 18C e 23F revelou que a ligação fosfodiéster entre o grupo fosfato e a galactose apresenta especial susceptibilidade à hidrólise com ácido trifluoroacético (TFA), não sendo assim para a ligação entre o fosfato e o ribitol, esta última se mostra lábil frente à hidrólise com ácido fluorídrico (IP et al., 1992). Estudos por ressonância magnética nuclear protônica e acoplamento heteronuclear H-P realizado por nosso grupo mostraram que a ruptura das ligações do Ps 6B durante a hidrólise ácida empregando HCl ocorre majoritariamente entre o grupo fosfato e a galactose (BARAZZONE et al., 2014).

Figura 17 - Unidade repetitiva do Polissacarídeo capsular do sorotipo 6B. Setas vermelhas apontam os locais susceptíveis à hidrólise ácida

O polissacarídeo foi fragmentado mediante hidrólise ácida, empregando ácido clorídrico em condições estabelecidas previamente no nosso laboratório (PERCIANI, 2011). A fragmentação permitiu reduzir a viscosidade do polissacarídeo e sua massa molecular (Figura 18). Foram obtidos oligossacarídeos com massa molecular entre 15 e 20 kDa e rendimentos superiores a 60%.

Para o sorotipo 6B tem sido demonstrado que oligossacarídeos de massa molecular entre 10-30 kDa e 30-100 kDa preservam sua antigenicidade, porém, oligossacarídeos entre 1 e 10 kDa tem uma redução significativa da antigenicidade, evidenciando que epítomos essenciais para o reconhecimento do Ps nativo podem perder-se durante a fragmentação do mesmo (SOUBAL et al., 2013).

Figura 18 - Perfil cromatográfico do Ps 6B nativo (linha vermelha) e Ps 6B hidrolisado (linha azul) em coluna TSK-gel GMPWXL; cromatógrafo de HPLC *Agilent*. Fluxo 0,4 mL/min; fase móvel fosfato 0,01 M + NaCl 0,15 M, pH 7,5; detecção por índice de refração (IR).

O comportamento da reação foi reprodutível nos diferentes ensaios realizados (Tabela 4), e os resultados obtidos para estes experimentos coincidem com resultados anteriores de nosso grupo (PERCIANI, 2011).

Tabela 4 - Resultados da hidrólise do Ps 6B

Experimento	Rendimento (%)	Peso molecular (kDa)
1	80	17
2	65	16,6
3	63	16,4

4.2.2 Oxidação do Ps 6B

Depois de reduzir a massa molecular do polissacarídeo procedeu-se a sua ativação mediante oxidação periódica. O periodato de sódio oxida dióis vicinais (dois carbonos adjacentes com grupos hidroxila), convertendo-os em aldeídos (C=O) com a quebra da ligação C-C (MORRISON; BOYD, 2005). Os grupos carbonila gerados nesta etapa podem reagir com grupos aminas presentes na proteína mediante aminação redutiva ou podem reagir com um espaçador contendo radical amina para posterior conjugação à proteína.

A unidade repetitiva do Ps 6B apresenta três locais passíveis de oxidação: dois entre os carbonos C1-C2 e C2-C3 do ribitol e outro entre os carbonos C3-C4 da galactose (Figura 19). Segundo descrito por Kim et al. 2006, a ordem de oxidação é a seguinte: alcoóis primários são mais susceptíveis de sofrerem oxidação periódica, seguido por dióis em configuração *cis* e por último dióis em configuração *trans*. E para dióis *cis* ou *trans* no anel do açúcar são mais susceptíveis de se oxidar quando localizados em resíduos terminais do que em resíduos presentes no interior da cadeia do oligossacarídeo. Uma análise por HPLC utilizando coluna Supelcosil™ LC-NH₂ (Supelco) realizada por nosso grupo para avaliar os sítios de oxidação no Ps 6B (PERCIANI, 2011) revelou que o resíduo de galactose não sofre alteração depois da oxidação, indicando que no Ps 6B a oxidação ocorre majoritariamente no resíduo de ribitol. Isso se justifica pelo fato do ribitol conter grupos hidroxilas primários; enquanto o resíduo de galactose contém hidroxilas secundárias, além de que neste caso a oxidação está mais impedida estericamente por se localizar no meio da cadeia oligossacarídica.

Figura 19 - Unidade repetitiva do Polissacarídeo capsular do sorotipo 6B ressaltando os locais passíveis de sofrerem oxidação periódica.

A reação de oxidação foi feita de acordo com o protocolo estabelecido no laboratório (PERCIANI, 2011). Foram obtidos oligossacarídeos com graus de ativação de aproximadamente 10 moles de aldeído por mol de polissacarídeo, o que corresponde a 20% das unidades repetitivas oxidadas (Tabela 5), sendo este comportamento reprodutível entre os diferentes ensaios realizados.

Tabela 5 - Resultados da oxidação do Ps 6B

Experimento	Rendimento (%)	URO (%)	Peso molecular (kDa)
1	80	18	15,3
2	89	20	14,5
3	75	20	14,7

Estudos de oxidação do Ps 6B mostram que um número de Unidades Repetitivas Oxidadas (URO) maior do que 24% reduz a antigenicidade do Ps, provavelmente devido a que os locais envolvidos na oxidação, principalmente o ribitol, formam parte de epítomos antigênicos do Ps, demonstrando que seria necessário manter intacto aproximadamente um terço destes resíduos para garantir seu reconhecimento antigênico (SOUBAL et al., 2013).

Depois da ativação do Ps deve ser avaliada sua massa molecular pois a química da ativação pode reduzir significativamente seu tamanho (FRASCH, 2009). A massa molecular foi medida por HPLC e como mostra a Figura 20 foi confirmado que não houve redução da massa molecular do Ps depois da oxidação. Os rendimentos da reação de oxidação (> 70%) também confirmam que

não houve perdas consideráveis associadas à fragmentação do polissacarídeo durante sua ativação.

Figura 20 - Perfil cromatográfico do Ps 6B hidrolisado (linha vermelha) e Ps 6B oxidado (linha azul) em coluna TSK-gel GMPWXL; cromatógrafo de HPLC *Agilent*. Fluxo 0,4 mL/min; fase móvel fosfato 0,01 M + NaCl 0,15 M, pH 7,5; detecção por índice de refração (IR).

4.2.3 Derivatização do Ps 6B

O Ps 6B oxidado reagiu diretamente com os grupos aminos da proteína via aminação reductiva (descrito mais adiante) ou foi acoplado ao espaçador 1,8-diaminooctano (OCT) também por aminação reductiva, para posterior reação com a proteína através do agente ativador DMT-MM (Figura 21).

Figura 21 - Unidade repetitiva do Polissacarídeo capsular do sorotipo 6B representando o sítio de introdução do espaçador 1,8-diaminooctano.

A relação de espaçador (OCT) por molécula de Ps ficou entre 5 e 8, o que representa 50% dos terminais oxidados ligados ao espaçador. Nesta etapa de reação a massa molecular diminuiu, fato este provavelmente associado à química da reação (Figura 22). Os oligossacarídeos obtidos apresentaram um peso molecular médio de 12 kDa.

Figura 22 - Perfil cromatográfico do Ps 6B oxidado (linha vermelha) e Ps 6B-OCT (linha azul) em coluna TSK-gel GMPWXL; cromatógrafo de HPLC *Agilent*. Fluxo 0,4 mL/min; fase móvel fosfato 0,01 M + NaCl 0,15 M, pH 7,5; detecção por índice de refração (IR).

4.4 Conjugação

4.4.1 Conjugação intermediada por DMT-MM

A conjugação foi dividida em duas etapas: a modificação da proteína e a conjugação ao Ps 6B. Uma representação esquemática das reações químicas envolvidas para a obtenção deste tipo de conjugado está representada na Figura 23.

Figura 23 - Esquema representativo das etapas de conjugação via DMT-MM

Previamente à conjugação a proteína foi modificada com o objetivo de evitar reações intramoleculares e precipitações durante a conjugação. A lisina, um dos grupos mais reativos presentes na proteína pode se ligar covalentemente aos grupos carboxilas dos resíduos de ácido aspártico e glutâmico, ativados em presença de DMT-MM, formando ligações intramoleculares e eventuais precipitações. A proteína foi tratada com formaldeído em presença de cianoboroidreto de sódio como agente redutor com a finalidade de metilar os grupos ϵ -amina dos resíduos de lisina e assim bloqueá-los.

Figura 24 - Perfil eletroforético da proteína modificada em gel de poliacrilamida com SDS 12%, coloração com azul Coomassie. Linha 1: rPspA1 modificada; linha 2: rPspA1 nativa; linha 3: Padrão de massa molecular (kDa); linha 4: rPspA3 nativa; linha 5: rPspA3 modificada.

É conhecido que o formaldeído reage com grupos amina primários das proteínas para formar uma base de Schiff (THAYSEN-ANDERSEN et al., 2007), um composto instável cuja dupla ligação entre o carbono e o nitrogênio deve ser reduzida para estabilizá-la.

Depois da metilação redutiva dos grupos amina da rPspA3 foi observado um pequeno aumento da massa molecular em relação à proteína nativa como mostra o perfil eletroforético (Figura 24). No caso da rPspA1 observou-se duas populações: uma de igual massa molecular que a proteína nativa e uma população minoritária de maior massa molecular.

Esta modificação permitiu bloquear quase 100% dos resíduos de lisina presentes em ambas as proteínas, determinado por ensaio de TNBS. Estudos anteriores de nosso grupo mostram que a metilação redutiva dos grupos amina da rPspA não interfere na imunogenicidade da proteína (SANTAMARIA et al., 2011). Doravante o termo rPspA modificada será usado para se referir à rPspA cujos grupos amina foram bloqueados por metilação redutiva.

O agente ativador cloreto de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolino (DMT-MM) foi inicialmente desenvolvido para a síntese peptídica (KUNISHIMA et al., 1999), mas também tem sido usado para a ativação de glicanos em meio orgânico (BERGMAN et al., 2007) e aquoso (FARKAS; BYSTRICKY, 2007). Recentemente foi avaliada a eficiência deste reagente na bioconjugação comparado com o hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil carbodiimida) (EDAC), tradicionalmente empregado na ativação de grupos carboxila em vacinas conjugadas (D'ESTE; EGLIN; ALINI, 2014; FARKAS et al., 2013). A estabilidade em água do DMT-MM (RAW, 2009), a não necessidade de um controle preciso do pH e do tampão durante a reação e a formação de um éster estável resistente à hidrólise são algumas das vantagens deste reagente sobre o EDAC. Nosso grupo já explorou o uso do DMT-MM na conjugação de polissacarídeos de pneumococo à rPspA (BARAZZONE et al., 2011; PERCIANI et al., 2013).

A Figura 25 mostra o mecanismo de reação do agente ativador DMT-MM na formação da ligação amida entre um grupo carboxila e um grupo amina.

Figura 25 - Mecanismo de reação do DMT-MM. O grupo carboxila (1) ataca o carbono eletrofílico do anel triazínico do DMT-MM (2) gerando um intermediário reativo (3) e liberando o anel morfolino (4). O intermediário reativo (3) reage com um grupo amina (5) formando a ligação amida (6) e liberando o anel triazínico (7).

Os conjugados formados entre o Ps 6B-OCT e a rPspA1 ou rPspA3 foram purificados por cromatografia de exclusão molecular em coluna Superose-12 e seu perfil é apresentado na figura 26.

Figura 26 - Cromatograma de purificação da reação de conjugação entre o Ps 6B-OCT e a rPspA1 (A) e entre o Ps 6B-OCT e a rPspA3 (B); em coluna Superose-12. Fase móvel: NaCl 0,15 M + fosfato 0,05 M, pH 7,0; fluxo: 0,5 mL/min.

A cromatografia de exclusão molecular baseia seu princípio na separação pela diferença entre as massas moleculares. A análise dos cromatogramas confirmou a formação de uma macromolécula de maior massa molecular que a proteína e o que Ps 6B-OCT livres.

A análise físico-química dos conjugados está representada na Tabela 6. De forma geral foram obtidos conjugados com relações (mol:mol) polissacarídeo: proteína que variaram de 1:1 a 1:2,78 a favor do polissacarídeo enquanto os rendimentos alcançados para o polissacarídeo variaram entre 20 e 30%.

Tabela 6 - Características físico-químicas dos conjugados sintetizados via DMT-MM

Número de Conjugados	Rendimento de Polissacarídeo ^a	Relação Ps:Proteína (m:m)	Relação Ps:Proteína (mol:mol) ^b
rPspA clado 1			
1	18%	0,31	1,00
2	32%	0,71	1,90
3	23%	0,56	1,85
rPspA clado 3			
4	30%	0,45	1,00
5	21%	0,83	2,78
6	18%	0,67	2,23

^a calculados com base na quantidade de Ps 6B contida na fração de conjugado em relação a quantidade total de Ps 6B recuperada da coluna.

^b considerando massa molecular do Ps 6B-OCT como sendo 12 kDa e da PspA de 40 kDa

Os conjugados foram caracterizados por eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, revelando os géis com dois corantes diferentes: azul Coomassie para a detecção de proteína e reagente de Schiff para a detecção diferencial de Ps. O perfil eletroforético está apresentado na Figura 27.

Figura 27 - Perfil eletroforético dos conjugados em gel de poliacrilamida com SDS 12%. (A, B e C): coloração com azul Coomassie; (D): coloração com reagente de Schiff. Linha 1: Padrão de massa molecular (kDa); linha 2: Conjugado 6B-PspA1; linha 3: rPspA1 modificada; linha 4: Conjugado 6B-PspA3; linha 5: rPspA3 modificada.

Nota-se que os conjugados apresentam um perfil característico de um “smear”, mais concentrados no início devido a sua elevada massa molecular, pelo número variável de monómeros de Ps ligados à proteína e a polidispersão dos mesmos.

O reagente de Schiff é empregado para a detecção diferencial de glicoproteínas, pois reage especificamente com os grupos aldeídicos livres presente no Ps, formando um produto de condensação de cor roxo. A revelação com o reagente de Schiff permitiu confirmar a presença de Ps no conjugado,

observando-se só a coloração das linhas correspondentes ao conjugado e não as linhas da proteína.

4.4.1.1 Avaliação imunológica dos conjugados sintetizados intermediados por DMT-MM

Os conjugados obtidos pela introdução de uma molécula espaçadora no Ps e posterior conjugação à rPspA intermediada por DMT-MM foram testados em camundongos Balb/c, empregando duas doses diferentes de proteína (10 e 20 µg) conforme descrito no capítulo de materiais e métodos (Tabela 1, Experimento 1). Sabe-se que a quantidade mínima para se verificar resposta imune humoral anti-PspA é 5 µg, no entanto, como o interesse inicial era avaliar a resposta anti-proteína decidimos empregar o dobro desse valor nas imunizações para garantir uma robusta resposta de anticorpos. O emprego de uma segunda dose maior equivalente a 20 µg deve-se ao fato de aumentar a dose de Ps. Considerando a baixa imunogenicidade do Ps 6B decidimos empregar uma dose alta do mesmo (15 µg) e devido à relação Ps:Prt destes conjugados 15 µg de Ps se corresponderia com aproximadamente 20 µg de proteína.

Inicialmente foi avaliada a resposta induzida pela proteína carreadora (Figura 28). A resposta de anticorpos induzida pelos grupos imunizados com conjugados, independentemente da dose administrada, foi precária; ao contrário dos grupos imunizados com o Ps e a rPspA coadministrados onde houve indução de altos títulos de anticorpos anti-PspA.

reconhecimento do soro pela proteína modificada ou nativa (Figura 29). Esses fatos sugerem que depois da conjugação a antigenicidade da proteína foi afetada.

Figura 29 - Ensaio de reconhecimento de epítomos antigênicos na rPspA nativa, modificada e conjugada via DMT-MM.

Os conjugados imunizados (conjugados 2 e 5) não foram reconhecidos pelo soro enquanto os conjugados 1 e 4 apresentam algum nível de reconhecimento, embora baixo. A diferença entre estes dois pares de conjugados está na relação polissacarídeo: proteína. Os conjugados 2 e 5 têm relações molares de Ps: Prt próximas de 1,90 e 2,78 respectivamente, isto significa que estão mais carregados em polissacarídeo. Por outro lado, os conjugados 1 e 4 possuem relações molares Ps: Prt próximas de 1. Ou seja, os conjugados que possuem uma proporção molar maior de polissacarídeo foram menos reconhecidos.

A relação Ps: Prt é um dos fatores que influencia a resposta imune em vacinas conjugadas. Uma carga elevada de Ps na proteína pode mascarar os epítomos antigênicos da proteína e ter um impacto negativo na imunogenicidade do conjugado (MAWAS et al., 2002). No entanto, ao avaliar em camundongos os conjugados 1 e 4 (Tabela 1, Experimento 2), não foi evidenciada uma mudança no padrão da resposta imune (Figura 30). Para o conjugado 6B(OCT)-PspA1 dois terços dos camundongos imunizados induziram baixos títulos de anticorpos anti-PspA, enquanto para o conjugado 6B(OCT)-PspA3 só um terço dos animais induziram anticorpos.

Figura 30 - Título de anticorpos anti-PspA. Soro obtido na terceira sangria após a imunização dos conjugados 1 e 4 (Tabela 6) sintetizados via DMT-MM.

Estudos anteriores de nosso grupo observaram uma dependência da dose de proteína com a funcionalidade dos anticorpos induzidos (PERCIANI, 2011). Considerando este fato foram imunizados os conjugados 3 e 6 que têm uma relação molar Ps: Prt de 1,85 e 2,23 respectivamente, em dose 4 vezes maior à dose empregada no experimento anterior (Tabela 1, Experimento 3). Novamente observou-se uma precária resposta de anticorpos: para o conjugado 6B ox-PspA1(conjugado de menor proporção molar de Ps em relação à proteína) dois terços dos camundongos imunizados induziram anticorpos anti-PspA, enquanto para o conjugado 6Box-PspA3 só um terço dos animais induziram anticorpos (Figura 31).

Figura 31 - Título de anticorpos anti-PspA. Soro obtido na terceira sangria após a imunização dos conjugados 3 e 6 (Tabela 6) sintetizados via DMT-MM.

A perda de imunogenicidade da proteína observada nestes experimentos pode estar associada ao mascaramento dos epítomos antigênicos devido a alguma modificação estrutural ou a uma maior predominância de polissacarídeo em relação à proteína.

O método de conjugação que emprega DMT-MM como agente ativador já foi usado por nosso grupo para a obtenção de conjugados entre PspA e vários sorotipos pneumocócicos (1, 6B e 14). No caso do sorotipo 1 foi observado uma diminuição da resposta de anticorpos frente à proteína depois da conjugação (MACHADO, 2015). Para o sorotipo 6B, inicialmente não se observou diferenças no nível de anticorpos induzidos pela proteína conjugada e coadministrada, no entanto, ao avaliar a funcionalidade destes anticorpos através da deposição do complemento na superfície da bactéria, não foi observado este efeito, requerendo doses maiores do antígeno para conseguir a deposição de complemento (PERCIANI, 2011). Neste trabalho, na tentativa de conseguir a indução de anticorpos anti-PspA foram imunizados conjugados com diferentes relações Ps: proteína e em doses diferentes, contudo nenhuma destas alternativas reverteram a incapacidade de gerar anticorpos em quantidade satisfatória.

Segundo a teoria clássica do mecanismo de ação das vacinas conjugadas a função da proteína carreadora é conferir um caráter T-dependente ao polissacarídeo, portanto a resposta do Ps está condicionada à capacidade da proteína de ativar as células T. As células T uma vez ativadas estimulam a proliferação e diferenciação das células B, as quais desenvolvem uma resposta específica tanto para o Ps como para a proteína. Pelo anteriormente exposto se infere que a não indução de resposta para a proteína também implica em não indução de resposta para o Ps. Neste trabalho a PspA foi escolhida como proteína carreadora para constituir um candidato vacinal com o sorotipo 6B, visando aumentar a cobertura vacinal entre diferentes sorotipos através da resposta induzida contra a PspA. Sendo assim a PspA tem duas funções, como proteína carreadora e como antígeno; portanto é de fundamental importância que o processo de conjugação não comprometa a sua imunogenicidade. Devido à falha imunológica dos conjugados sintetizados via DMT-MM foi empregada outra estratégia de conjugação que permitisse obter conjugados imunogênicos.

4.4.2 Conjugação pelo método de aminação redutiva.

A conjugação por aminação redutiva ocorre, como descrito no capítulo introdutório, através da reação dos grupos aldeídicos do Ps com os grupos amina da proteína, formando um intermediário imina (base de Schiff) que posteriormente é reduzido a uma amina secundária na presença de cianoboroidreto de sódio.

A aminação redutiva tradicional, com ausência de moléculas espaçadoras é um método de baixa eficiência, basicamente 20% de incorporação de Ps no conjugado, isto significa que aproximadamente 80% do Ps é perdido na reação de conjugação, requerendo uma minuciosa etapa de purificação para eliminar todos os elementos livres o que encarece o produto. Os rendimentos da conjugação podem ser incrementados pela adição de grupos reativos na proteína ou no Ps (LEE; FRASCH, 2007).

A estratégia usada neste trabalho foi a derivatização da proteína com diidrazida do ácido adípico (ADH) prévio à conjugação com o Ps oxidado. Uma representação esquemática das reações químicas envolvidas para a obtenção deste tipo de conjugado está representada na Figura 32.

A introdução de grupos hidrazida na proteína aumenta a eficiência da conjugação devido à alta reatividade deste grupo comparado com os grupos ϵ -amino dos resíduos de lisina da proteína, somado ao fato do ADH ser uma molécula espaçadora de 6 átomos de carbono que contribuiria para diminuir impedimentos estéricos durante a conjugação.

Figura 32 - Esquema representativo das etapas de conjugação por aminação redutiva

Como apresentado na Figura 33 foi verificado a formação de agregados macromoleculares depois da introdução do espaçador ADH na proteína. Este fato foi mais acentuado no caso da rPspA3 do que na rPspA1, para esta última observaram-se duas populações, porém durante a incubação da reação não foi observada a formação de gel e nem de precipitados. A formação destes polímeros resulta das ligações intramoleculares do ADH que ao ser um espaçador homobifuncional pode ligar-se por ambos os extremos aos grupos carboxila dos resíduos de ácido aspártico e glutâmico ativados em presença de EDAC. Nesta reação os grupos amina dos resíduos de lisina próprios da proteína também podem competir por se ligar às carboxilas ativas, contribuindo ainda mais para a formação de agregados moleculares da proteína.

Figura 33 - Perfil eletroforético da rPspA nativa e derivatizada com ADH em gel de poliacrilamida com SDS 12%; coloração com azul Coomassie. Linha 1: Padrão de massa molecular (kDa); linha 2: rPspA1 nativa; linha 3: rPspA1-ADH; linha 4: rPspA3-ADH; linha 5: rPspA3 nativa.

Uma análise por espalhamento da luz revelou um aumento do raio molecular da proteína derivatizada em relação à proteína nativa. Houve um aumento de 5 vezes para a rPspA1 (de 10,4 nm para 53,4 nm) e 10 vezes para a rPspA3 (de 5,3 nm para 49,8 nm).

Com a finalidade de evitar a formação de agregados macromoleculares foram exploradas várias condições reacionais, como diminuição do tempo de reação, variação das proporções de agente ativador (EDAC) e molécula espaçadora (ADH) assim como mudanças no tampão e no pH da reação, contudo a proteína derivatizada continuou polimerizando.

Apesar deste evento, a quantificação dos grupos amina pelo método de TNBS mostrou que a incorporação do ADH foi efetiva, dobrando o número de grupos amina na proteína. No caso da rPspA1 aumentou de 4,4 mol de NH_2/mol

Prt para 10,7 mol de NH_2 /mol Prt enquanto para a rPspA3 teve um incremento de 5,3 de mol NH_2 /mol Prt para 9,7 mol de NH_2 /mol Prt.

Os conjugados obtidos a partir da rPspA derivatizada com ADH foram purificados em coluna Superose-12 e seus perfis estão apresentados na Figura 34.

Figura 34 - Cromatograma de purificação da reação de conjugação entre o Ps 6B ox e a rPspA1 (A) e entre o Ps 6B ox e a rPspA3 (B); em coluna Superose-12. Fase móvel: NaCl 0,15 M + fosfato 0,05 M, pH 7,0; fluxo: 0,5 mL/min.

Nota-se que para o conjugado 6B-PspA3 (Figura 34B), pelo fato da proteína derivatizada com ADH ter polimerizado, não se observa uma separação nítida entre a rPspA livre e conjugada, pois ambas eluem no volume de exclusão da coluna; e, portanto, não é possível determinar a presença de proteína livre no

conjugado. No entanto, observa-se que depois da reação de conjugação a maior parte da população de Ps livre desloca-se para a fração de conjugado, indicando que provavelmente ficou pouca proteína na forma livre.

A caracterização físico-química dos conjugados revelou rendimentos de Ps na fração conjugada superiores aos atingidos para os conjugados sintetizados via DMT-MM confirmando a alta eficiência deste método (Tabela 7). Para os conjugados à rPspA1 o rendimento de Ps ficou em torno de 50%, enquanto para os conjugados à rPspA3 o rendimento esteve próximo de 60%.

Tabela 7 - Características físico-químicas dos conjugados sintetizados por aminação redutiva

Número de Conjugados	Rendimento de Polissacarídeo^a	Relação Polissacarídeo:Proteína (m:m)
rPspA clado 1		
1	50%	0,67
2	49%	0,54
rPspA clado 3		
3	60%	0,83
4	64%	1,02

^a calculados com base na quantidade de Ps 6B contida na fração de conjugado em relação a quantidade total de Ps 6B recuperada da coluna.

Este método de conjugação (aminação redutiva com introdução de espaçadores, ou seja, a introdução de grupos hidrazida na proteína para reagir com grupos aldeído ou ésteres de cianeto no Ps) tem sido empregado para a síntese de conjugados de Ps bacterianos a proteínas carreadoras como toxóide tetânico, reportando rendimentos de 60% (LEE; FRASCH, 2007).

A caracterização por SDS-PAGE dos conjugados (Figura 35) confirmou a formação de uma macromolécula de maior peso molecular que a proteína livre e a coloração de Schiff corroborou a incorporação de Ps no conjugado.

Figura 35 - Perfil eletroforético dos conjugados sintetizados por aminação redutiva em gel de poliacrilamida com SDS 12%. (A e B): coloração com azul Coomassie; (C): coloração com reagente de Schiff. Linha 1: Padrão de massa molecular (kDa); linha 2 e linha 8: rPspA1-ADH; linha 3 e linha 6: Conjugado 6Box-PspA1; linha 4 e linha 7: Conjugado 6Box-PspA3; linha 5 e linha 9: rPspA3-ADH.

Antes de prosseguir com a avaliação imunológica destes conjugados foi realizado um ensaio de reconhecimento da proteína derivatizada e o conjugado por um soro anti-PspA para determinar se os epítomos antigênicos foram comprometidos.

Como se observa através da Figura 36 apesar de haver uma diminuição no valor de D.O. em relação à proteína nativa, os epítomos das proteínas derivatizadas e conjugadas ainda mantêm o reconhecimento antigênico, indicando que conservam sua integridade.

Figura 36 - Ensaio de reconhecimento de epítomos antigênicos na rPspA nativa, modificada e conjugada por aminação redutiva.

Para avaliar a antigenicidade do Ps conjugado foi realizado ELISA de inibição. Neste ensaio foi avaliada a capacidade de reconhecimento de um soro

padrão anti-Ps 6B frente ao Ps conjugado à PspA1 e 3 e foram empregados como controles o Ps oxidado e nativo. Foi usado como controle negativo do ensaio um Ps pertencente a outro sorotipo, o Ps 1.

Figura 37 - Resultados do ensaio de antigenicidade do Ps 6B conjugado por ELISA de inibição.

Como apresentado na Figura 37 o Ps nativo é capaz de inibir mais de 98% do soro até uma concentração de antígeno de 5 µg/mL, porém o Ps oxidado apresentou um perfil diferente, observando-se uma diminuição no reconhecimento pelo soro. No entanto, após a conjugação observa-se que o reconhecimento do Ps aumenta, adotando um perfil mais próximo do Ps nativo; provavelmente a conjugação provocou uma mudança na conformação expondo de forma eficiente epítomos do Ps que não se manifestavam na sua forma livre.

Desta forma confirmamos integridade dos epítomos na proteína e no polissacarídeo após o processo de conjugação.

4.4.2.1 A 1 avaliação imunológica dos conjugados sintetizados via aminação redutiva

Começamos a análise da resposta imune gerada pelos conjugados através da avaliação dos anticorpos anti-PspA devido a sua relevância como antígeno. Foram imunizados 10 µg de PspA conjugada e coadministrada com o Ps 6B (Tabela 1, Experimento 4). A PspA é uma proteína altamente imunogênica (BRILES et al., 1998) e os anticorpos anti-PspA têm mostrado uma função relevante na proteção frente às infecções pneumocócicas (MORENO et al., 2010). Como mostra a Figura 38 foram induzidos altos títulos de IgG anti-PspA, tanto para a proteína livre como conjugada, com diferenças significativas em relação ao grupo controle. Não se observam diferenças significativas entre a proteína livre e

conjugada, o que indica que as modificações estruturais realizadas sobre a proteína não alteraram de forma significativa seus epítomos.

Figura 38 - Título de anticorpos anti-PspA. Soro obtido na terceira sangria após a imunização dos conjugados 1 e 3 (Tabela 7) sintetizados por aminação redutiva. (ns) indica diferenças não significativas. (*) indica diferenças significativas $p < 0,05$ (ANOVA fator único, teste de Tukey).

Em relação à resposta frente ao Ps a indução de anticorpos anti-Ps não foi elevada, como mostrado na Figura 39. Não foi observado diferenças significativas entre os grupos imunizados com Ps conjugado e Ps coadministrado nem com o grupo controle. Em uma tentativa de diminuir a resposta anti-Ps observada para o grupo controle foram efetuadas várias alterações no ensaio ELISA, tais como alterações na sensibilização (emprego de albumina metilada para aumentar a aderência do Ps à placa), alterações no bloqueio (tempo e concentração de leite desnatado), no entanto, nenhuma destas modificações solucionou o problema. A qualidade dos camundongos utilizados neste ensaio pode também ter influenciado neste resultado.

Figura 39 - Título de anticorpos anti-Ps 6B. Soro obtido na terceira sangria após a imunização dos conjugados 1 e 3 (Tabela 7) sintetizados por aminação redutiva. (ns) indica diferenças não significativas. (*) indica diferenças significativas $p < 0,05$ (ANOVA fator único, teste de Tukey).

A baixa resposta observada para este polissacarídeo pode ser atribuída a várias razões: a baixa imunogenicidade do Ps 6B, a baixa responsividade do modelo animal ou o emprego de uma dose inadequada. A continuação se expõem argumentos baseados em evidências encontradas na literatura e que justificam estas hipóteses.

O Ps 6B junto com o Ps 23F tem mostrado ser os menos imunogênicos dentre todos os polissacarídeos de pneumococo (LEINONEN et al., 1986; LUCAS et al., 1997). Em um modelo murino de memória onde camundongos Balb/c foram imunizados com a vacina comercial Prevenar-7 e 26 semanas após receberam um booster com Ps; o número de células secretoras de anticorpos específicas para o Ps 6B foi similar ao grupo controle, diferentemente dos Ps 4 e 14 que induziram altos níveis destas células (MORENO et al., 2004).

CHU et al., 2000 em um estudo onde avaliaram o efeito adjuvante de oligodeoxinucleotídeos CpG, a imunização de 5 µg de Ps 6B conjugado a CRM197 sem adjuvante não ultrapassou o título de 10.

A baixa imunogenicidade deste sorotipo faz com que seja empregado com o dobro da dose (4 µg), em relação aos demais sorotipos, nas vacinas conjugadas comerciais Prevenar-7 e Prevenar-13. Neste trabalho as doses de Ps empregadas oscilaram entre 7 e 10 µg, no entanto, estudos anteriores de nosso grupo observaram que a imunização de doses maiores de Ps conjugado (30 µg)

em camundongos Blab/c não foi capaz de elevar o título de anticorpos anti-Ps (PERCIANI, 2011).

Outra razão que explica a baixa resposta observada para este sorotipo é o modelo animal empregado. Fairchild e Braley-Mullen investigaram a resposta do sorogrupo 6 em diferentes modelos murinos. Quando imunizado em doses entre 1 e 5 µg, foi induzida uma resposta celular de curta duração com a produção de anticorpos do tipo IgM. Os autores sugerem que a baixa imunogenicidade deste sorogrupo em camundongos está relacionada a uma ineficiente estimulação de células imunocompetentes devido a uma baixa união do antígeno aos receptores de imunoglobulinas das células B específicas pelo polissacarídeo. Esta hipótese ainda é motivo de estudo (FAIRCHILD; BRALEY-MULLEN, 1983).

Diante das dificuldades encontradas na avaliação da resposta de anticorpos para o Ps 6B, prosseguimos os ensaios imunológicos com a avaliação da funcionalidade dos anticorpos.

Além de determinar a concentração de anticorpos induzidos contra o antígeno de interesse é importante também avaliar o nível de proteção conferido por estes anticorpos. Em vacinas conjugadas o ensaio empregado para esta finalidade é o ensaio de opsonofagocitose. No caso particular de *S. pneumoniae* a fagocitose é um importante mecanismo imunológico para o controle da infecção (POOLMAN, 2004), sendo a opsonofagocitose dependente do complemento essencial para a eliminação do pneumococo da circulação (BROWN; HOSEA; FRANK, 1983). A proteção conferida pelas vacinas comerciais deve-se ao efeito opsonofagocítico dos anticorpos anti-Ps, portanto a opsonofagocitose é o ensaio recomendado pela OMS para avaliar a eficácia destas vacinas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009). Neste estudo devido à baixa indução de anticorpos anti-Ps 6B não foi possível avaliar a funcionalidade dos mesmos.

Para anticorpos anti-proteínas de pneumococo não tem sido estabelecido até o momento nenhum correlato de proteção, devido à não existência de uma vacina de natureza proteica para uso em humanos. No entanto, pela capacidade da PspA inibir a deposição do complemento na superfície da bactéria (REN et al., 2003, 2004; TU et al., 1999), poderia esperar-se que anticorpos anti-PspA

bloqueassem este efeito e gerassem uma função protetora, promovendo a fagocitose.

Ao avaliar a capacidade opsonofagocítica dos anticorpos anti-rPspA utilizando macrófagos da cavidade peritoneal de camundongos foi observado que o soro anti-rPspA coadministrada e o soro anti-rPspA conjugada reduziram de forma significativa o número de unidades formadoras de colônias recuperadas em relação ao grupo controle (Figura 40). Este comportamento foi similar tanto para a rPspA do clado 1 como para a rPspA do clado 3.

Figura 40 - Ensaio de opsonofagocitose. (A): soro anti-PspA1 (cepa 245: clado 1, sorotipo 14); (B): soro anti-PspA3 (cepa TIGR 4: clado 3, sorotipo 4). Soros em teste, diluídos 1:16 foram incubados com a bactéria, seguido de 10% de fonte de complemento e células isoladas do peritônio. As bactérias foram plaqueadas em ágar sangue e o número de UFCs foi determinado após 20 h. (ns) indica diferenças não significativas. (*) indica diferenças significativas $p < 0,05$ (ANOVA fator único, teste de Tukey).

A observação de uma eficácia protetora semelhante tanto para o soro obtido após a imunização com a proteína livre como conjugada, sugere que a ligação do polissacarídeo à rPspA não modificou os epítomos responsáveis pelo reconhecimento antigénico, sendo os anticorpos anti-rPspA capazes de reconhecer a proteína na superfície da bactéria e promover a fagocitose.

4.5 Determinação da estrutura secundária da PspA

Com a finalidade de determinar se a perda de imunogenicidade da rPspA observada nos conjugados sintetizados via DMT-MM estava relacionada com possíveis modificações estruturais ocorridas durante a conjugação, avaliamos através de dicróismo circular, a composição da estrutura secundária da proteína nativa, modificada e dos conjugados sintetizados via DMT-MM e por aminação redutiva, o que nos permitiu comparar as estruturas secundárias da PspA em cada condição.

O dicróismo circular é uma técnica frequentemente usada para avaliar a conformação e estabilidade de proteínas em diferentes condições (temperatura, força iônica e presença de agentes denaturantes) (KELLY; JESS; PRICE, 2005). Esta técnica oferece informação sobre a composição da estrutura secundária de uma proteína (GREENFIELD, 2006) (porcentagem de α -hélice, folha- β , giros e estrutura não ordenada), e tem sido usada para avaliar as alterações estruturais ocorridas em proteínas carreadoras como toxóide diftérico e CRM197 após a ligação do polissacarídeo (CRANE; BOLGIANO; JONES, 1997; PACETTA et al., 2015).

A estrutura secundária da rPspA nativa, modificada e conjugada foi determinada através da deconvolução dos espectros obtidos por dicróismo circular utilizando o algoritmo CDSSTR.

Ao analisarmos os dados de predição de estrutura para a rPspA1 (Figura 41A) se observa uma redução na quantidade de α -hélice da proteína modificada e dos conjugados 6B(OCT)-PspA1 (1) e 6B(OCT)-PspA1 (2) em relação à proteína nativa. Estes conjugados não induziram ou induziram poucos anticorpos anti-rPspA, porém, a proteína modificada que também apresentou uma perda de estrutura manteve sua capacidade de induzir anticorpos. Já o conjugado 6B(OCT)-PspA1 (3) que também induziu poucos anticorpos anti-PspA apresentou o mesmo perfil de estrutura que a proteína nativa.

Figura 41 - Predição da estrutura secundária da rPspA (nativa, modificada e conjugada) a partir da deconvolução dos dados obtidos por dicroísmo circular. Porcentagem de cada estrutura é apresentada acima de sua respectiva barra. (A): dados correspondentes à rPspA1; (B): dados correspondentes à rPspA3.

Por outro lado, a proteína derivatizada com ADH teve uma redução do conteúdo de α -hélice de mais de 50% em relação à proteína nativa, enquanto depois da conjugação foi observado um aumento na quantidade de α -hélice [6Box-PspA1 (1)], no entanto podemos afirmar que estas modificações estruturais não tiveram um impacto negativo na imunogenicidade, pois tanto o conjugado quanto a proteína derivatizada induziram altos níveis de anticorpos. É possível que a introdução do espaçador ADH na proteína tenha causado modificações

estruturais, sem ocultar nem afetar seus epítomos antigênicos. Já a ligação do polissacarídeo durante a conjugação transformou a estrutura da proteína causando um aumento da quantidade de α -hélice também sem comprometer os epítomos.

Ao analisar o perfil de estrutura da rPspA3 (Figura 41B) observa-se que tanto a proteína modificada como a proteína derivatizada com ADH mostraram uma redução na quantidade de α -hélice em relação à proteína nativa, entretanto o comportamento imunogênico de ambas foi similar. Por outro lado, ao examinar o perfil dos conjugados observa-se um aumento da estrutura de α -hélice comparado com as proteínas modificadas, chegando a atingir valores similares à proteína nativa. Apesar deste fato os conjugados 6B(OCT)-PspA3 (4), (5) e (6) induziram pouco ou nenhum anticorpo anti-PspA indicando que o ganho estrutural após a conjugação não é decorrente de uma recuperação da estrutura inicial da proteína e que alguns epítomos possam ter sido afetados durante o processo. A diferença dos conjugados sintetizados via DMT-MM, o conjugado sintetizado por aminação redutiva [6B ox -PspA3 (3)] que também teve um aumento da estrutura de α -hélice comparado com a PspA3-ADH, foi imunogênico, gerando altos títulos de anticorpos anti-PspA.

Da análise anterior podemos concluir que não existe uma correlação entre os resultados imunológicos observados neste trabalho e a informação estrutural fornecida por dicroísmo circular, sugerindo que para um melhor entendimento das modificações estruturais ocorridas na proteína após a conjugação intermediada por DMT-MM e que levaram a uma perda de sua imunogenicidade, seria necessário o emprego de outras ferramentas físico-químicas que provejam uma descrição mais detalhada sobre a estrutura e conformação da proteína.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O descobrimento da mudança do caráter T-independente dos polissacarídeos bacterianos através da ligação química a proteínas carreadoras abriu novos espaços para o desenvolvimento de vacinas conjugadas contra bactérias encapsuladas. O sucesso que esta técnica mostrou nos anos oitenta com *Haemophilus influenzae* tipo b conduziu a sua aplicação em vacinas conjugadas para outras bactérias encapsuladas como *Neisseria meningitidis* e *Streptococcus pneumoniae*.

Após a introdução da primeira vacina conjugada contra *S. pneumoniae* nos Estados Unidos e Europa verificou-se na população infantil a geração de uma robusta resposta de anticorpos sorotipo específica, assim como uma redução no estado portador e nos casos de doença invasiva causada pelos sorotipos vacinais. Paralelamente, registrou-se um aumento no número de infecções pneumocócicas causada pelos sorotipos não vacinais como decorrência da substituição de sorotipos (LIPSITCH, 1999). A expansão da cobertura vacinal através da inclusão de novos sorotipos seria conveniente, mas aumentaria o custo e complexidade destas vacinas sem alcançar uma cobertura total. Para superar as limitações das vacinas conjugadas novas estratégias vacinais baseadas no emprego de proteínas pneumocócicas têm sido estudadas.

No presente trabalho avaliou-se o uso de um fragmento recombinante da proteína A de superfície pneumocócica (PspA) como proteína carreadora conjugada ao sorotipo 6B como alternativa de aumentar a cobertura vacinal. O objetivo inicial deste estudo era avaliar a capacidade de proteção cruzada da PspA clado 1 e clado 3 depois de conjugadas ao sorotipo 6B pelo método de conjugação que emprega DMT-MM, no entanto, os desafios afrontados durante o desenvolvimento do projeto modificaram o objetivo principal que foi direcionado para a obtenção e caracterização de conjugados Ps-proteína por métodos de conjugação diferentes e a avaliação da resposta imune induzida.

Em contraste a resultados anteriores de nosso grupo com o emprego do agente ativador DMT-MM para a conjugação entre a PspA e o Ps 6B, os conjugados sintetizados por esta via não foram imunogênicos, nem mesmo com a imunização de doses maiores do antígeno, fato este que pode estar relacionado a alguma

modificação estrutural na proteína ou a um predomínio do polissacarídeo no conjugado que mascara epítomos antigênicos da proteína.

Por outro lado, os conjugados sintetizados por aminação redutiva apresentaram rendimentos elevados para o Ps e induziram altos títulos de anticorpos anti-rPspA capazes de promover a fagocitose da bactéria. Porém, o polissacarídeo 6B teve um comportamento pouco imunogênico, conforme reportado na literatura para este sorotipo.

A análise da estrutura secundária da proteína conjugada por dicroísmo circular não permitiu chegar a conclusões sobre a perda de antigenicidade observada para os conjugados sintetizados via DMT-MM. Para responder a esta questão serão necessárias análises adicionais.

REFERÊNCIAS*

ADAMOU, J. E.; HEINRICHS, J. H.; ERWIN, A. L.; WALSH, W.; GAYLE, T.; DORMITZER, M.; DAGAN, R.; BREWAH, Y. A.; BARREN, P.; LATHIGRA, R.; LANGERMANN, S.; KOENIG, S.; JOHNSON, S. Identification and characterization of a novel family of pneumococcal proteins that are protective against sepsis. **Infect. Immun.**, v. 69, n. 2, p. 949-958, 2001.

ALBERICIO, F. Developments in peptide and amide synthesis. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 8, n. 3, p. 211–221, 2004

ALONSO DE VELASCO, E.; VERHEUL, A. F.; VERHOEF, J.; SNIPPE, H. *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors, pathogenesis, and vaccines. **Microbiol. Rev.**, v. 59, n. 4, p. 591–603, 1995.

ALVARES J. R.; MANTESE, O. C.; PAULA, A.; WOLKERS, P. C.; ALMEIDA, V. V.; ALMEIDA, S. C.; GUERRA, M. L.; BRANDILEONE, M. C. Prevalence of pneumococcal serotypes and resistance to antimicrobial agents in patients with meningitis: ten-year analysis. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 15, n. 1, p.22-27, 2011.

ANDERSON, P. W.; PICHICHERO, M. E.; INSEL, R. A.; BETTS, R.; EBY, R.; SMITH, D. H. Vaccines consisting of periodate-cleaved 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.**, v. 137, n. 4, p. 1181–1186, 1986.

ANDRADE, A. L.; TERNES Y. M.; VIEIRA, M. A.; MOREIRA, W. G.; LAMARO-CARDOSO, J.; KIPNIS A.; CARDOSO, M. R.; BRANDILEONE, M. C.; MOURA, I.; PIMENTA, F. C.; CARVALHO M. G.; SARAIVA F. O.; TOSCANO, C. M.; MINAMISAVA, R. Direct Effect of 10-Valent Conjugate Pneumococcal Vaccination on Pneumococcal Carriage in Children Brazil. **PLoS One**, v. 9, n. 6, 2014.

AUSTRIAN, R. Some observations on the pneumococcus and the current status of pneumococcal disease and its prevention. **Rev. Infect. Dis.**, v. 3, Suppl. S1-S17, 1981.

*De acordo com:

Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração, Rio de Janeiro, 2002.

AVCI, F. Y.; LI, X.; TSUJI, M.; KASPER, D. L. A mechanism for glycoconjugate vaccine activation of the adaptive immune system and its implications for vaccine design. **Nat. Med.**, v. 17, n. 12, p. 1602-1609, 2011

AVERY, O. T.; GOEBEL, W. F. Chemo-immunological studies on conjugated carbohydrate-proteins. Immunological specificity of synthetic sugar–protein antigens. **J. Exp. Med.**, v. 50, n. 4, p. 533-550, 1929.

BARAZZONE, G. C.; PERCIANI, C. T.; RAW, I.; TANIZAKI, M. M. Método de conjugação de polissacarídeo capsular a uma proteína carreadora, para uso como antígeno vacinal contra bactérias encapsuladas, utilizando o reagente cloreto de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolino (DMT-MM). Brazilian patent PI0904528-7. 2011. [Patente].

BARAZZONE, G. C.; PINTO, V.; DONNARUMMA, D.; TANIZAKI, M. M.; NORAIS, N.; BERTI, F. Identification of glycosylated regions in pneumococcal PspA conjugated to serotype 6B capsular polysaccharide. **Glicoconj. J.**, v. 31, n. 3, p. 259-269, 2014.

BAUMINGER, S.; WILCHECK, M. The use of carbodiimides in the preparation of immunizing conjugates. **Meth. Enzymol.**, v. 70 (A), p. 151–159, 1980.

BERGERON, Y.; OUELLET, N.; DESLAURIERS, A. M.; SIMARD, M.; OLIVIER, M.; BERGERON, M. G. Cytokine kinetics and other host factors in response to pneumococcal pulmonary infection in mice. **Infect. Immun.**, v. 66, n. 3, p. 912-922, 1998.

BERGMAN, K.; ELVINGSON, C.; HILBORN, J.; SVENSK, G.; BOWDEN, T. Hyaluronic acid derivatives prepared in aqueous media by triazine-activated amidation. **Biomacromolecules.**, v. 8, n. 7, p. 2190–2195, 2007.

BERGMANN, S.; HAMMERSCHMIDT, S. Versatility of pneumococcal surface proteins. **Microbiology**. v. 152, p. 295-303, 2006.

BIEMANS, R.L.; GARCON, N. M.; HERMAND, P. V.; POOLMAN, J.; VAN MECHELEN, M. P. **Pneumococcal polysaccharide conjugate vaccine**. US nº 9107872. 2010. [Patente]

BOGAERT, D.; DE GROOT, R.; HERMANS, P. W. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. **Lancet Infect. Dis.** v. 4, n. 3, p.144–154, 2004

BOGAERT, D.; HERMANS, P. W.; ADRIAN, P. V.; RUMKE, H. C.; GROOT, R. Pneumococcal vaccines: an update on current strategies. **Vaccine.**, v. 22, n. 17-18, p. 2209 – 2220, 2004.

BRILES, D. E.; HOLLINGSHEAD, S. K.; KING, J.; SWIFT, A.; BRAUN, P. A.; PARK, M. K.; FERGUSON, L. M.; NAHM, M. H.; NABORS, G. S. Immunization of humans with recombinant pneumococcal surface protein A (PspA) elicits antibodies that passively protect mice from fatal infection with *Streptococcus pneumoniae* bearing heterologous PspA. **J. Infect. Dis.**, v. 182, n. 6, p. 1694–1701, 2000b.

BRILES, D. E.; HOLLINGSHEAD, S. K.; NABORS, G. S.; PATON, J. C.; BROOKS-WATER, A. The potential for using protein vaccines to protect against otitis media caused by *Streptococcus pneumoniae*. **Vaccine**, v. 19 (Suppl. 1), p. S87–95, 2000c.

BRILES, D. E.; HOLLINGSHEAD, S.; BROOKS-WALTER, A.; NABORS, G. S.; FERGUSON, L.; SCHILLING, M.; GRAVENSTEIN, S.; BRAUN, P.; KING, J.; SWIFT, A. The potential to use PspA and other pneumococcal proteins against pneumococcal infection. **Vaccine**, v. 18, n. 16, p. 1707-1711, 2000a.

BRILES, D. E.; TART, R. C.; SWIATLO, E.; DILLARD, J. P.; SMITH, P.; BENTON, K. A.; RALPH, B. A.; WALTER, A. B.; CRAIN, M. J.; HOLLINGSHEAD, S. K.; MCDANIEL, L. S. Pneumococcal diversity: considerations for new vaccine strategies with emphasis on pneumococcal surface protein A (PspA). **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, n. 4, p. 645–657, 1998.

BROWN, E. J.; HOSEA, S. W.; FRANK, M. M. The role of antibody and complement in the reticuloendothelial clearance of pneumococci from the bloodstream. **Rev. Infect. Dis.**, v. 5, p. S797-805, 1983, Suppl 4.

BRUCKNER J. Estimation of monosaccharides by the orcinol-sulphuric acid reaction. **Biochem. J.**, v. 60, n. 2, p. 200–205, 1955.

BULPITT, P.; AESCHLIMANN, D. New strategy for chemical modification of hyaluronic acid: Preparation of functionalized derivatives and their use in the formation of novel biocompatible hydrogels. **J. Biomed. Mat. Res.**,(A), v. 47, n. 2, p. 152–169, 1999.

CARVALHO, R. J.; CABRERA-CRESPO, J.; TANIZAKI, M. M.; GONÇALVES, V.M. 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, 2011.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Pneumococcal polysaccharide vaccine usage, United States. **Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, v. 33, p. 273-6281, 1984.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Pneumonia hospitalizations among young children before and after introduction of pneumococcal conjugate vaccine-United States, 1997–2006. **Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, 16 Jan, v. 58, n. 1, p. 1-4, 2009

CHU, R. S.; MCOOL, T.; GREENSPAN, N. S.; SCHREIBER, J. R.; HARDING, C. V. CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants for pneumococcal polysaccharide-protein conjugate vaccines and enhance anti-polysaccharide immunoglobulin G2a (IgG2a) and IgG3 antibodies. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 3, p. 1450-1456, 2000

CHU, C.; SCHNEERSON, R.; ROBBINS, J. B.; RASTOGI, S. C. Further studies on the immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b and pneumococcal type 6B polysaccharide–protein conjugates. **Infect. Immun.**, v. 40, n. 1, p. 245–256, 1983.

COSTANTINO, P.; RAPPUOLI, R.; BERTI, F. The design of semi-synthetic and synthetic glycoconjugate vaccines. **Expert. Opin. Drug. Discov. Rew.**, v. 6, n. 10, p. 1045-1066, 2011.

CRANE, D. T., BOLGIANO, B.; JONES, C. Comparison of the difteria mutant toxin, CRM197, with a *Haemophilus influenzae* type-b polysaccharide-CRM197 conjugate by optical spectroscopy. **Eur. J. Biochem.**, v. 246, n. 2, p. 320-327, 1997.

CRONEY, C. M.; COATS, M. T.; NAHM, M. H.; BRILES, D. E.; CRAIN, M. J. PspA family distribution, unlike capsular serotype, remains unaltered following introduction of the heptavalent pneumococcal conjugate vaccine. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 19, n. 6; p. 891–896, 2012.

CSORDAS, F. L.; PERCIANI, C. T.; DARRIEUX, M.; GONCALVES, V. M.; CABRERA-CRESPO, J.; TAKAGI, M.; SBROGIO-ALMEIDA, M. E.; LEITE, L. C.; TANIZAKI, M. M. Protection induced by pneumococcal surface protein A (PspA) is enhanced by conjugation to a *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide. **Vaccine**, v. 26, n. 23, p. 2925-2929, 2008.

CUNDELL, D. R.; Tuomanen, E.I. Identification of carbohydrate receptor specificity of *Streptococcus pneumoniae* for pulmonary and vascular cells. **Microb. Pathog.**, v. 17, p. 361-374, 1994.

D'ESTE, M.; EGLIN, D.; ALINI, M. A systematic analysis of DMT-MM vs EDC/NHS for ligation of amines to Hyaluronan in water. **Carbohydr. Polym.**, v. 108, p. 239–246, 2014.

DAGAN, R.; FRASER, D. Conjugate pneumococcal vaccine and antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae*: herd immunity and reduction of otitis morbidity. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 19, Suppl. 5, p. S79-88, 2000.

DANIELS, C. C.; COAN, P.; KING, J.; HALE, J.; BENTON, K. A.; BRILES, D. E.; HOLLINGSHEAD, S. K. The proline-rich region of pneumococcal surface proteins A and C contains surface-accessible epitopes common to all pneumococci and elicits antibody-mediated protection against sepsis. **Infect. Immun.**, v. 78, n. 5, p. 2163–2172, 2010.

DARRIEUX, M.; MIYAJI, E. N.; FERREIRA, D. M.; LOPES, L. M.; LOPES, A.; REN, B.; BRILES, D. E.; HOLLINGSHEAD, S. K.; LEITE, L. C. Fusion proteins containing family 1 and family 2 PspA fragments elicit protection against *Streptococcus pneumoniae* that correlates with antibody-mediated enhancement of complement deposition. **Infect. Immun.**, v. 75, n. 12, p. 5930–5938, 2007.

DARRIEUX, M.; MORENO, A. T.; FERREIRA, D. M.; PIMENTA, F. C.; DE ANDRADE, A. L. Recognition of pneumococcal isolates by antisera raised against PspA fragments from different clades. **J. Med. Microbiol.**, v. 57 (Pt 3), p. 273–278, 2008.

DE O MENEZES A. P.; CAMPOS, L. C.; DOS SANTOS, M. S.; AZEVEDO, J.; DOS SANTOS, R. C.; CARVALHO, M. G.; BEALL, B. W.; MARTIN, S. W.; SALGADO, K.; REIS, M. G.; KO, A. I.; REIS, J. N. Serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* prior to introduction of the 10-valent pneumococcal conjugate vaccine in Brazil, 2000–2007. **Vaccine**, v. 29, n. 6, p. 1139–1144, 2011.

DOMINGUES, C.A.; VERANI, J.R.; RENOINER, E. M.; BRANDILEONE, M.C.; FLANNERY, B.; OLIVEIRA, L.H.; SANTOS, J.B.; MORAES, J.C. Effectiveness of ten-valent pneumococcal conjugate vaccine against invasive pneumococcal disease in Brazil: a matched case-control study. **Lancet Resp. Med.**, v. 2, n. 6, p. 464-471, 2014

DOS SANTOS S. R.; PASSADORE, L. F.; TAKAGI, E. H.; FUJII, C. M.; YOSHIOKA, C.R.; GILIO, A. E.; MARTINEZ, M. B. Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* isolated from patients with invasive pneumococcal disease in Brazil before and after ten-pneumococcal conjugate vaccine implementation. **Vaccine**, v. 31, n. 51, p. 6150– 6154, 2013.

EL MORTAJI, L.; TERRASSE, R.; DESSEN, A.; VERNET, T.; DI GUILMI, A. M. Stability and assembly of pilus subunits of *Streptococcus pneumoniae*. **J. Biol. Chem.**, v. 285, n. 16, p. 12405-12415, 2010.

ESPOSITO, S.; PRINCIPI, N. Impacts of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in children. **J. Immunol. Res.** Jan. 2015. Disponível em:< <http://www.hindawi.com/journals/jir/2015/591580/>>. Acesso em: 15 Fev. 2016.

FAIRCHILD, R. L.; BRALEY-MULLEN, H. Characterization of the murine immune response to type 6 pneumococcal polysaccharide. **Infect. Immun.**, v. 39, n.2, p. 615-622, 1983.

FARKAS, P.; BYSTRICKY, S. Efficient activation of carboxyl polysaccharides for the preparation of conjugates. **Carbohydr. Polym.**, v. 68, n. 1, p. 187–190, 2007.

FARKAS, P.; CIZOVA, A.; BEKESOVA, S.; BYSTRICKY, S. Comparison of EDC and DMT-MM efficiency in glycoconjugate preparation. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 60, p. 325– 327, 2013.

FRASCH, C. E. Preparation of bacterial polysaccharide–protein conjugates: analytical and manufacturing challenges. **Vaccine**, v. 27, n. 46, p. 6468–6470, 2009.

GHAFFAR, F.; FRIEDLAND, I. R.; MCCracken, G. H. Dynamics of nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae*. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 18, n. 7, p. 638–646, 1999.

GIANFALDONI, C.; CENSINI, S.; HILLERINGMANN, M.; MOSCHIONI, M.; FACCIOTTI, C.; PANSEGRAU, W.; MASIGNANI, V.; COVACCI, A.; RAPPOULI, R.; BAROCHI, M. A.; Ruggiero, P. *Streptococcus pneumoniae* pilus subunits protect mice against lethal challenge. **Infect. Immun.**, v. 75, n. 2, 1059-1062, 2007.

GIVON-LAVI, N.; FRASER, D.; PORAT, N.; DAGAN, R. Spread of *Streptococcus pneumoniae* and antibiotic-resistant *S. pneumoniae* from day-care center attendees to their younger siblings. **J Infect. Dis.** v. 186, n. 11, p. 1608-1614, 2002.

GODFROID, F.; HERMAND, P.; VERLANT, V.; DENOËL, P.; POOLMAN, J. T. Preclinical evaluation of the Pht proteins as potential cross-protective pneumococcal vaccine antigens. **Infect Immun.**, v. 79, n. 1, p. 238-245, 2011.

GOR, D. O.; DING, X.; BRILES, D. E.; JACOBS, M. R.; GREENSPAN, N. S. Relationship between surface accessibility for PpmA, PsaA and PspA and antibody-mediated immunity to systemic infection by *Streptococcus pneumoniae*. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 3, p. 1304-1312, 2005.

GOULART, C.; DARRIEUX, M.; RODRIGUEZ, D.; PIMENTA, F. C.; BRANDILEONE, M. C.; DE ANDRADE, A. S.; LEITE, L. C. Selection of family 1 PspA molecules capable of inducing broad-ranging cross-reactivity by complement deposition and opsonophagocytosis by murine peritoneal cells. **Vaccine**, v. 29, n. 8, p. 1634–1642, 2011.

GRAY, B.M.; CONVERSE, G.M.; DILLON, H.C. Jr. Epidemiologic studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: acquisition, carriage, and infection during the first 24 months of life. **J. Infect. Dis.**, v. 142, n. 6, p. 923-933, 1980.

GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. **Nat. Protoc.**, v. 1, n. 6, p. 2876-2890, 2006.

HAUSDORFF, W. P.; SIBER, J. R.; PARADISO, P. R. **Multivalent pneumococcal polysaccharide-protein conjugate composition**. US nº 0130137 A1. 2009. [Patente]

HENRIQUES, B.; KALIN, B.; ORTQVIST, A.; LILJEQUIST, B.; ALMELA, M.; MARRIE, T. J.; MUFSON, M. A.; TORRES, A.; WOODHEAD, M. A.; SVENSON, S. B.; KALLENIOUS, G. Molecular epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* causing invasive disease in 5 countries. **J. Infect. Dis.**, v. 182, n. 3, p. 833-839, 2000.

HERMANSON, G. T. **Bioconjugate techniques**. San Diego, CA, USA: Academic Press, Inc. 1996.

HOLLINGSHEAD, S. K.; BARIL, L.; FERRO, S.; KING, J.; COAN, P.; BRILES, D.E. Pneumococcal surface protein A (PspA) family distribution among clinical isolates from adults over 50 years of age collected in seven countries. **J. Med. Microbiol.**, v. 55 (Pt 2), p. 215–221, 2006.

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, 2000.

IP, C. Y.; MANAM, V.; HEPLER, R.; HENNESSEY, J. P. Carbohydrate composition analysis of bacterial polysaccharides: optimized acid hydrolysis conditions for HPAEC-PAD analysis. **Anal. Biochem.**, v. 201, n. 2, p. 343-349, 1992.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. J. Reconhecimento do antígeno pelos receptores de células B e células T. In: **Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. p. 116-144.

JEFFERIES, J.M.; MACDONALD, E.; FAUST, S. N.; CLARKE, S. C. 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV13). **Hum. Vaccin.**, v. 7, n. 10, p. 1012-1018, 2011.

JENNINGS, J. H.; LUGOWSKI, C. **Immunogenic polysaccharide-protein conjugates**. USA nº 4365170. 1982. [Patente]

JESSOUROUN, E.; DA SILVA I. F.; BASTOS, R. C.; FRASCH, C. E.; LEE, C. H. Process for preparing polysaccharide-protein conjugate vaccines. WO 2005/037320 A2, 2005 [Patente]

JODAR, L.; FEATHERS, I. M.; SALISBURY, D.; GRANOFF, D. M. Development of vaccines against meningococcal disease. **Lancet**, v. 359, n. 9316, p. 1499-1508, 2002.

JOHNSON, W. C. Analyzing protein circular dichroism spectra for accurate secondary structures. **Proteins**, v. 35, n. 3, p. 307-312, 1999

JOHNSTON, R. B. Pathogenesis of pneumococcal pneumonia. **Rev. Infect. Dis.**, v. 13, Suppl. 6, S509–S517, 1991

KAMERLING, J. P. Pneumococcal polysaccharides: a chemical view. In: Tomasz A. (Ed.) ***Streptococcus pneumoniae molecular biology & mechanisms of disease***. Larchmont: Mary Ann Liebert Publishers Inc., 2000. p. 81–114.

KAYE, P.; ANDREWS, N.; SLACK, M.; GEORGE, R.; MILLER, E. The impact of pneumococcal conjugate vaccination in children in England and Wales four years after the introduction of PCV7. In: 29th Annual Meeting of the European Society for Pediatric Infectious Diseases (ESPID), 2011, The Hague. Abstract. The Netherlands: European Society for Pediatrics Infectious Diseases, 2011.

KELLY, S. M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1751, n. 2, p. 119-139, 2005.

KENNE, L.; LINDBERG, B.; MADDEN, J. Structural studies of the capsular antigen from *Streptococcus pneumonia* Type 26. **Carbohydr. Res.**, v. 73, p. 175-182, 1979.

KIM, J. S.; LASKOWICH, E. R.; MICHON, F.; KAISER, R. E.; ARUMUGHAM, R. G. Monitoring activation sites on polysaccharides by GC–MS. **Anal. Biochem.**, v. 358, n. 1, p. 136–142, 2006.

KLUGMAN, K.P. Herd protection induced by pneumococcal conjugate vaccine. **Lancet**, v. 2, p. 365-366, 2014.

KOTHARI, N.; KOTHARI, S.; CHOI, Y. J.; DEY, A.; BRILES, D. E.; RHEE, D. K.; CARBIS, R. A bivalent conjugate vaccine containing PspA families 1 and 2 has the potential to protect against a wide range of *Streptococcus pneumoniae* strains and *Salmonella* Typhi. **Vaccine**, v. 33, n. 6, p. 783-788, 2015.

KOTHARI, N.; GENSCHMER, K. R.; KOTHARI, S.; KIM, J. H.; BRILES, D. E.; RHEE, D. K.; CARBIS, R. Preparation and testing of a Vi conjugate vaccine using

pneumococcal surface protein A (PspA) from *Streptococcus pneumoniae* as the carrier protein. **Vaccine**, v. 32, n. 43, p. 5755-5760, 2014.

KUNISHIMA, M.; KAWACHI, C.; MORITA, J.; TERAOKA, K.; IWASAKI, F.; TANI, S. 4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium Chloride: An Efficient Condensing Agent Leading to the Formation of Amides and Esters. **Tetrahedron**, v. 55, n. 46, p. 13159-13170, 1999.

LAEMMLI, U. K.; BEGUIN, F.; GUJER-KELLENBERGER, G. A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. **J. Mol. Biol.** v. 47, n. 1, p. 69-85, 1970.

LAFERRIÈRE, C. A.; SOOD, R. K.; MUYS, J. M.; MICHON, F.; JENNINGS, H. J. The synthesis of *Streptococcus pneumoniae* polysaccharide-tetanus toxoid conjugates and the effect of chain length on immunogenicity. **Vaccine.**, v. 15, n. 2, p. 179-186, 1997.

LAINE, C.; MWANGI, T.; THOMPSON, C. M.; OBIERO, J.; LIPSITCH, M.; SCOTT, J. A. Age-specific immunoglobulin G (IgG) and IgA to pneumococcal protein antigens in a population in coastal Kenya. **Infect. Immun.**, v. 72, n. 6, p. 3331-3335, 2004.

LEE, C. H.; FRASCH, C. E. Polysaccharide-protein conjugate vaccines. US n° 0141084 A1, 2007. [Patente]

LEES, A.; NELSON, B. L.; MOND, J. J. Activation of soluble polysaccharides with 1-cyano-4-dimethylaminopyridinium tetrafluoroborate for use in protein-polysaccharide conjugate vaccines and immunological reagents. **Vaccine**, v. 14, n. 3, p. 190-198, 1996.

LEINONEN, M.; SAKKINEN, A.; KALLIOSKI, R.; LUOTONEN, J.; TIMONEN, M.; MAKELA, H. Antibody response to 14-valent pneumococcal capsular polysaccharide vaccine in pre-school age children. **Pediatr. Infect. Dis.**, v. 5, n. 1, p. 39-44, 1986.

LI, J.; GLOVER, D. T.; SZALAI, A. J.; HOLLINGSHEAD, S. K.; BRILES, D. E. PspA and PspC minimize immune adherence and transfer of pneumococci from erythrocytes to macrophages through their effects on complement activation. **Infect. Immun.**, v. 75, n. 12, p. 5877-5885, 2007.

LINARES, J.; ARDANUY, C.; PALLARES, R.; FENOLL, A. Changes in antimicrobial resistance, serotypes and genotypes in *Streptococcus pneumoniae* over a 30-year period. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 16, n. 5, p. 402-410, 2010.

LIPSITCH, M. Bacterial vaccines and serotype replacement: lessons from *Haemophilus influenzae* and prospects for *Streptococcus pneumoniae*. **Emerg. Infect. Dis.** v. 5, n. 3, p. 336-345, 1999.

LIPSITCH, M.; WHITNEY, C. G.; ZELL, E.; KAIJALAINEN, T.; DAGAN, R.; MALLEY, R. Are anticapsular antibodies the primary mechanism of protection against invasive pneumococcal disease? **PLoS Med.**, v. 2, n. 1, p. 62-68, 2005.

LUCAS, A. H.; GRANOFF, D. M.; MANDRELL, R. E.; CONNOLLY, C. C.; SHAN, A. S.; POWERS, D. C. Oligoclonality of serum immunoglobulin G antibody response to *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide serotypes 6B, 14 and 23F. **Infect. Immun.**, v. 65, n. 12, p. 5103-5109, 1997.

LYNCH, J. P.; ZHANEL, G. G. *Streptococcus pneumoniae*: epidemiology and risk factors, evolution of antimicrobial resistance, and impact of vaccines. **Curr. Opin. Pulm. Med.**, v.16, n. 3, p. 217–25, 2010.

MACHADO, L. O. **Desenvolvimento de um método de conjugação entre o polissacarídeo capsular sorotipo 1 de *Streptococcus pneumoniae* e a proteína de superfície pneumocócica A.** 2015. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

MALLEY, R.; LIPSITCH, M.; STACK, A.; SALADINO, R.; FLEISHER, G.; PELTON, S.; THOMPSON, C.; BRILES, D.; ANDERSON, P. Intranasal immunization with killed unencapsulated whole cells prevents colonization and invasive disease by capsulated pneumococci. **Infect. Immun.**, v. 69, n. 8, p. 4870–4873, 2001.

MAUS, U. A.; SRIVASTAVA, M.; PATON, J. C.; MACK, M.; EVERHART, M. B.; BLACKWELL, T. S.; CHRISTMAN, J. W.; SCHLONDORFF, D.; SEEGER, W.; LOHMEYER, J. Pneumolysin-induced lung injury is independent of leukocyte trafficking into the alveolar space. **J. Immunol.**, v. 173, n. 2, p. 1307-1312, 2004.

MAWAS, F.; NIGGEMANN, J.; JONES, C.; CORBEL, M. J.; KAMERLING, J. P.; Vliegenthart, J. F. Immunogenicity in a mouse model of a conjugate vaccine made with a synthetic single repeating unit of type 14 pneumococcal polysaccharide coupled to CRM197. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 9, p. 5107-5114, 2002.

MCDANIELS, L. S.; SCOTT, G.; KERANEY, J. F.; BRILES, D. E. Monoclonal antibodies against protease- sensitive pneumococcal antigens can protect mice from fatal infection with *Streptococcus pneumoniae*. **J. Exp. Med.**, v. 160, n. 2, p. 386-397, 1984.

MCLEOD, C. M.; HODGES, R. G.; HEIDELBERGGER, M.; BERNHARD, W. G. Prevention of pneumococcal pneumonia by immunization with specific capsular polysaccharides. **J. Exp. Med.**, v. 82, n. 6, p. 445-465, 1945.

MEHR, S.; WOOD, N. Streptococcus pneumoniae – a review of carriage, infection, serotype replacement and vaccination. **Pediatr. Respir. Rev.**, v. 13, n. 4, p. 258–264, 2012.

MEULEN, A. S.; VESIKARI, T.; MALACAMAN, E. A.; SHAPIRO, S. A.; DALLAS, M. J.; HOOVER, P. A.; MCFETRIDGE, R.; STEK, J. E.; MARCHESE, R. D.; HARTZEL, J.; WATSON, W. J.; MUSEY, L. K. Safety, Tolerability and Immunogenicity of 15-valent Pneumococcal Conjugate Vaccine in Toddlers Previously Vaccinated With 7-valent Pneumococcal Conjugate Vaccine. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 34, n. 2, p. 186–194, 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Casos Confirmados, Óbitos, Incidência (por 100.000 habitantes) e letalidade por tipo de meningite, Brasil, 2010 a 2013. Disponível em [http://portalsaude.gov.br/Sala de Apoio à Gestão Estratégica/Dados/Meningite bacteriana](http://portalsaude.gov.br/Sala_de_Apoio_à_Gestão_Estratégica/Dados/Meningite_bacteriana). Acesso em: 22 jan. 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Coordenação-geral do Programa Nacional de Imunizações. **Informe técnico da vacina pneumocócica 10-valente (conjugada)**. Brasília, 2010. 18 p

MIYAJI, E. N.; FERREIRA, D. M.; LOPES, A. P.; BRANDILEONE, M. C. DIAS, W. O.; LEITE, L. C. Analysis of sérum cross-reactivity and cross-protection elicited by immunization with DNA vaccines against Streptococcus pneumonia expressing PspA fragments from different clades. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 9, p. 5086-5090, 2002

MONTALBETTI, C. G.; FALQUE, V. Amide bond formation and peptide coupling. **Tetrahedron**, v. 61, p. 10827–10852, 2005.

MORENO, A. T.; OLIVEIRA, M. L.; FERREIRA, D. M.; HO, P. L.; DARRIEUX, M.; LEITE, L. C.; FERREIRA, J. M.; PIMENTA, F. C.; ANDRADE, A. L.; MIYAJI, E. N. Immunization of mice with single PspA fragments induces antibodies capable of mediating complement deposition on different pneumococcal strains and cross-protection. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 17, n. 3, p. 439–446, 2010.

MORENO, R. L.; SAMPSON, J. S.; ROMERO-STEINER, S.; WONG, B.; JOHNSON, S. E.; ADES, E.; CARLONE, G. M. A murine model for the study of immune memory in response to pneumococcal conjugate vaccination. **Vaccine**, v. 22, n. 23-24, p. 3069-3079, 2004.

MORRISON, R.; BOYD, R. **Química Orgânica**. Lisboa: Fundação Calouste Guilbenkian, 2005. 1510 p.

NIELSEN, S. V.; SORENSEN, U. B.; HENRICHSEN, J. Antibodies against pneumococcal C-polysaccharide are not protective. **Microb. Pathog.**, v. 14, n. 4, p. 299-305, 1993.

NOVAK, R.; TUOMANEN, E. Pathogenesis of pneumococcal pneumonia. **Semin. Respir. Infect.**, v. 14, p. 209-217, 1999.

O'BRIEN, K. L.; WOLFSON, L. J.; WATT, J. P.; HENKLE, E.; DELORIA-KNOLL, M.; MCCALL, N.; LEE, E.; MULHOLLAND, K.; LEVINE, O. S.; CHERIAN, T. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. **Lancet**, v. 374, n. 9693, p. 893–902, 2009.

OBARO, S. The new pneumococcal vaccine. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 8, n. 10, p. 623-633, 2002.

OGUNNIYI, A. D.; FOLLAND, R. L.; BRILES, D. E.; HOLLINGSHEAD, S. K.; PATON, J. C. Immunization of mice with combinations of pneumococcal virulence proteins elicits enhanced protection against challenge with *Streptococcus pneumoniae*. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 5, p. 3028 – 3033, 2000.

OGUNNIYI, A. D.; GRABOWICZ, M.; BRILES, D. E.; COOK, J.; PATON, J. C. Development of a vaccine against invasive pneumococcal disease: based on combinations of virulence proteins of *Streptococcus pneumoniae*. **Infect. Immun.**, v. 75, n. 1, p. 350-357, 2007.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. 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. **Informe Regional de SIREVA II, 2000-2005**. Washington, D.C: OPS, 2006. 315 p.

OVERTURF, G. D. Technical report: prevention of pneumococcal infections, including the use of pneumococcal conjugate and polysaccharide vaccines and antibiotic prophylaxis. **Pediatrics**, v. 106, n. 2, p. 367-376, 2000.

OVODOV, Y. S. Capsular antigens of bacteria. Capsular antigens as the basis of vaccines against pathogenic bacteria. **Biochem.**, v. 71, n. 9, p. 955-961, 2006.

PATON, J. C. The contribution of pneumolysin to the pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. **Trends Microbiol.**, v. 4, n. 3, p. 103-106, 1996.

PECETTA, S.; SURDO, P. L.; TONTINI, M.; PROIETTI, D.; ZAMBONELLI, C.; BOTTOMLEY, M. J.; BIAGINI, M.; BERTI, F.; CONSTANTINO, P.; ROMANO, M. R. Carrier priming with CRM197 or diphtheria toxoid has a different impact on the immunogenicity of the respective glycoconjugates: Biophysical and immunochemical interpretation. **Vaccine**, v. 33, p. 314-320, 2015.

PELET, J. M.; PUTNAM, D. An In-Depth Analysis of Polymer-Analogous Conjugation using DMTMM. **Bioconj. Chem.**, v. 22, n. 3, p. 329-337, 2011.

PERCIANI, C. T. **Polissacarídeo sorotipo 6B do *Streptococcus pneumoniae* (PS6B) e proteína de superfície pneumocócica A (PspA): métodos de conjugação e avaliação da resposta imune.** 2011. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

PERCIANI, C.T.; BARAZZONE, G. C.; GOULART, C.; CARVALHO, E.; CABRERA-CRESPO, J.; GONÇALVES, V. M.; LEITE, L. C.; TANIZAKI, M. M. Conjugation of polysaccharide 6B from *Streptococcus pneumoniae* with pneumococcal surface protein A: PspA conformation and its effect on the immune response. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 20, n. 6, p. 858-866, 2013.

PIAO, Z.; AKEDA, Y.; TAKEUCHI, D.; ISHII, K. J.; UBUKATA, K.; BRILES, D. E.; TOMONO, K.; OISHI, K. Protective properties of a fusion pneumococcal surface protein A (PspA) vaccine against pneumococcal challenge by five different PspA clades in mice. **Vaccine**, v. 32, n. 43, p. 5607–5613, 2014.

PLETZ, M. W.; MAUSA, U.; KRUGB, N.; WELTE, T.; LODE, H. Pneumococcal vaccines: mechanism of action, impact on epidemiology and adaption of the species. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, v. 32, n. 3, p. 199–206, 2008.

POEHLING, K. A.; SZILAGYI, P. G.; GRIJALVA, C. G.; MARTIN, S. W.; LAFLEUR, B.; MITCHEL, E.; BARTH, R. D.; NUORTI, J. P.; GRIFFIN, M. R. Reduction of frequent otitis media and pressure-equalizing tube insertions in children after introduction of pneumococcal conjugate vaccine. **Pediatrics**, v. 119, n. 4, p.707-715, 2007.

POOLMAN, J. T. Pneumococcal vaccine development. **Expert. Rev.Vaccines**, v. 3, n. 5, p. 597-604, 2004.

PRADO, V. J. Conceptos microbiológicos de *Streptococcus pneumoniae*. **Rev. Chil. Infectol.**, v.18, Supl 1, p. 6-9, 2001.

PRINCIPI, N.; ESPOSITO, S. Universal protein vaccines against *Neisseria meningitidis* serogroup B, *Streptococcus pneumoniae* and influenza. **Hum. Vaccin.**, v. 7, n. 9, p. 905-91, 2011.

PRYMULA, R.; SCHUERMAN, L. 10-valent pneumococcal nontypeable *Haemophilus influenzae* PD conjugate vaccine: Synflorix. **Expert. Rev. Vaccines**, v. 8, n. 11, p. 1479–1500, 2009.

QI, X. Y.; KEYHANI, N. O.; LEE, Y. C. Spectrophotometric determination of hydrazine, hydrazides and their mixtures with trinitrobenzenesulfonic acid. **Anal. Biochem.**, v. 175. n. 1, p. 139-144, 1988.

RAPOLA, S.; JANTTI, V.; HAIKALA, R.; SYRJANEN, R.; CARLONE, G. M.; SAMPSON, J. S.; BRILES, D. E.; PATON, J. C.; TAKALA, A. K.; KILPI, T. M.; KAYHTY, H. Natural development of antibodies to pneumococcal surface protein A, pneumococcal surface adhesin A, and pneumolysin in relation to pneumococcal carriage and acute otitis media. **J. Infect. Dis.**, v. 182, n. 4, p. 1146-1152, 2000.

RAW, S. A. An improved process for the synthesis of DMT-MM based coupling reagents. **Tetrahed. Let.**, v. 50, n. 8, p. 946–948, 2009.

REDELINGS, M. D.; SORVILLO, F.; SIMON, P.; MASCOLA, L. Declining early childhood mortality from invasive PD: the impact of vaccination. **Arch. Pediatr. Adolesc. Med.**, v. 159, p. 195–196, 2005

REN, B.; MCCRORY, M. A.; PASS, C.; BULLARD, D. C.; BALLANTYNE, C. M.; XU, Y.; BRILES, D. E.; SZALAI, A. J. The virulence function of *Streptococcus pneumoniae* surface protein A involves inhibition of complement activation and impairment of complement receptor-mediated protection. **J. Immunol.**, v. 173, n. 12, p. 7506–7512, 2004.

REN, B.; SZALAI, A. J.; THOMAS, O.; HOLLINGSHEAD, S. K.; BRILES, D. E. Both family 1 and family 2 PspA proteins can inhibit complement deposition and confer virulence to a capsular serotype 3 strain of *Streptococcus pneumoniae*. **Infect. Immun.**, v. 71, n. 1, p. 75–85, 2003.

ROCHE, H.; HAKANSSON, A.; HOLLINGSHEAD, S. K.; BRILES, D. E. Regions of PspA/ EF3296 best able to elicit protection against *Streptococcus pneumoniae* in a murine infection model. **Infect. Immun.**, v. 71, n. 3, p. 1033–1041, 2003.

RODGERS, G. L.; KLUGMAN, K. P. The future of pneumococcal disease prevention. **Vaccine**, v.29, Suppl 3: C43-C48, 2011.

ROMERO-STEINER, S.; PILISHVILI, T.; SAMPSON, J. S.; JOHNSON, S. E.; STINSON, A.; CARLONE, G. M.; ADES, E. W. Inhibition of pneumococcal adherence to human nasopharyngeal epithelial cells by anti-PsaA antibodies. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 10, n. 2, p. 246-251, 2003.

ROSE, C. E.; ROMERO-STEINER, S.; BURTON, R. L.; CARLONE, G. M.; GOLDBLATT, D.; NAHM, M. H.; ASHTON, L.; HASTON, M.; EKSTROM, N.; HAIKALA, R.; KAYHTY, H.; HENCKAERTS, I.; DURANT, N.; POOLMAN, J. T.; FERNSTEN, P.; YU, X.; HU, B. T.; JANSEN, K. U.; BLAKE, M.; SIMONETTI, E. R.; HERMANS, P. W.; PLIKAYTIS, B. D. Multilaboratory comparison of *Streptococcus pneumoniae* opsonophagocytic killing assays and their level of agreement for the determination of functional antibody activity in human reference sera. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 18, n. 1, p. 135–142, 2011.

ROSENSTEIN, N. E.; FISCHER, M.; TAPPERO, J. W. Meningococcal vaccines. **Infect. Dis. Clin. North. Am.**, v. 15, n. 1, p. 155-169, 2001.

SANTAMARIA, R.; GOULART, C.; PERCIANI, C. T.; BARAZZONE, G. C.; CARVALHO, R.; GONCALVES, V. M.; LEITE, L. C.; TANIZAKI, M. M. Humoral immune response of a pneumococcal conjugate vaccine: Capsular polysaccharide serotype 14—Lysine modified PspA. **Vaccine**, v. 29, n. 47, p. 8689-8695, 2011.

SCHLOTTMANN, S. A.; JAIN, N.; CHIRMULE, N.; ESSER, M. T. A novel chemistry for conjugating pneumococcal polysaccharides to Luminex microspheres. **J. Immunol. Methods**, v. 309, n. 1-2, p. 75–85, 2006.

SCHMIDT, S. A.; WILLIAMS, S. J.; WANG, C. A.; SORNARAJ, P.; JAMES, B.; KOBE, B.; DODDS, P. N.; ELLIS, J. G.; ANDERSON, P. A. Purification of the M flax-rust resistance protein expressed in *Pichia pastoris*. **Plant. J.**, v. 50, n. 6, p. 1107–1117, 2007.

SCHNEERSON, R.; BARRERA, O.; SUTTON, A.; ROBBINS, J. B. Preparation, characterization, and immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide protein conjugates. **J. Exp. Med.**, v. 152, n. 2, p. 361–376, 1980.

SCHNEERSON, R.; ROBBINS, J. B.; PARKE, J. C.; BELL, C.; SCHLESSELMAN, J. J.; SUTTON, A.; WANG, Z.; SCHIFFMAN, G.; KARPAS, A.; SHILOACH, J. Quantitative and qualitative analyses of serum antibodies elicited in adults by *Haemophilus influenzae* type b and pneumococcus type 6A capsular polysaccharide-tetanus toxoid conjugates. **Infect. Immun.**, v. 52, n. 2, p. 519-528, 1986.

SHAPER, M.; HOLLINGSHEAD, S. K.; BENJAMIN, W. H. Jr.; BRILES, D. E. PspA protects *Streptococcus pneumoniae* from killing by apolactoferrin, and antibody to PspA enhances killing of pneumococci by apolactoferrin. **Infect. Immun.**, v. 72, n. 9, p. 5031–5040, 2004.

SHINEFIELD, H.; BLACK, S.; RAY, P.; FIREMAN, B.; SCHWALEE, M.; LEWIS, E. Efficacy, immunogenicity and safety of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in low birthweight preterm infants. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 21, n. 3, p. 182-186, 2002.

SILVA, M.; CABRERA-CRESPO, J.; SBROGIO-ALMEIDA, M.E.; MIYAJI, E. N.; HO, P. L.; LEITE, L. C.; LOPES, A. Y. Optimizing expression of *Streptococcus pneumoniae* surface protein A, PspA: serocross-reactivity within families of antisera induced against clade 1 and 3. **Mol. Biotechnol.**, v. 37, p. 146-154, 2007

SOUBAL, J. P.; PEÑA, L.; SANTANA, D.; VALDÉS, Y.; GARCÍA, D.; PEDROSO, J.; CARDOSO, F.; GONZÁLEZ, H.; FERNÁNDEZ, V.; VÉREZ, V. Procedure for the conjugation of the *Streptococcus pneumoniae* serotype 6B capsular

polysaccharide to the tetanus toxoid. **Biotechnol. Appl.**, v. 30, n. 3, p. 208-215, 2013.

STEIN, K. E. Thymus-independent and thymus-dependent responses to polysaccharide antigens. **J. Infect. Dis.**, v.165, Suppl. 1: S49–S52, 1992.

SUN, Y.; PARK, M. K.; DIAMOND, B.; SOLOMON, A.; NAHM, M. H. Repertoire of Human Antibodies Against the Polysaccharide Capsule of *Streptococcus pneumoniae* serotype 6B. **Infect. Immun.**, v. 67, n. 3, p. 1172-1179, 1999.

SZU, S. C. Development of Vi conjugate – a new generation of typhoid vaccine. **Exp. Rev. Vac.**, v. 12, n. 11, p. 1273–1286, 2013.

THAYSEN-ANDERSEN, M.; JØRGENSEN, S. B.; WILHELMSSEN, E. S.; PETERSEN, J. W.; HØJRUP, P. Investigation of the detoxification mechanism of formaldehyde-treated tetanus toxin. **Vaccine**, v. 25, n. 12, p. 2213–2227, 2007.

TU, A. H.; FULGHAM, R. L.; MCCROY, M. A.; BRILES, D. E.; SZALAI, A. J. Pneumococcal surface protein A inhibits complement activation by *Streptococcus pneumoniae*. **Infect. Immun.**, v. 67, n. 9, p. 4720-4724, 1999.

TUOMANEN, E. I. The biology of pneumococcal infection. **Pediatr. Res.**, v. 42, n. 3, p. 253–258, 1997.

TYLLIANAKIS, P. E.; KAKABAKOS, S. E.; EVANGELATOS, G. P.; ITHAKISSIOS, D. S. Direct colorimetric determination of solid-supported functional groups and ligands using bicinchoninic acid. **Anal. Biochem.**, v., 219, n., 2, p. 335-340, 1994.

VALENZUELA, M. T.; O'LOUGHLIN, R.; DE LA HOZ, F.; GOMEZ, E.; CONSTENLA, D.; SINHA, A.; VALENCIA, J. E.; FLANNERY, B.; DE QUADROS, C. A. The burden of pneumococcal disease among Latin American and Caribbean children: review of the evidence. **Rev. Panam. Salud. Pública**, v. 25, n. 3, p. 270-279, 2009.

WADWA, R. P.; FEIGIN, R. D. Pneumococcal vaccine: an update. **Pediatrics**, v. 103, p. 1035-1037, 1999.

WATSON, D. A.; MUSHER, D. M. A brief history of the pneumococcus in biomedical research. **Semin. Respir. Infect.**, v. 14, n. 3, p. 198-208, 1999.

WEIL-OLIVIER, C.; VAN DER LINDEN, M.; SCHUTTER, I.; DAGAN, R.; MANTOVANI, L. Prevention of pneumococcal diseases in the post-seven valent vaccine era: a European perspective. **BMC Infect. Dis.**, v. 12, p. 207–219, 2012.

WEINBERGER D. M.; MALLEY, R.; LIPSITCH, M. Serotype replacement in disease after pneumococcal vaccination. **Lancet**, v. 378, n. 9807, p. 1962-1973, 2011.

WESSELS, M. R.; PAOLETTI, L. C.; GUTTORMSEN, H.; MICHON, F.; D'AMBRA, A. J.; KASPER, D. L. Structural properties of group B streptococcal type III polysaccharide conjugate vaccines that influence immunogenicity and efficacy. **Infect. Immun.**, v. 66, n. 5, p. 2186-2192, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of pneumococcal conjugate vaccines. **Expert Committee on Biological Standardization**. Geneve, 2009. 59 p.

WU, K.; ZHANG, X.; SHI, J.; LI, N.; LI, D.; LUO, M.; CAO, J.; YIN, N.; WANG, H.; XU, W.; HE, Y.; YIN, Y. Immunization with a combination of three pneumococcal proteins confers additive and broad protection against *Streptococcus pneumoniae* infections in mice. **Infect. Immun.**, v. 78, n. 3, p. 1276-1283, 2010.

YOTHER, J.; BRILES, D. E. Structural properties and evolutionary relationships of PspA, a surface protein of *Streptococcus pneumoniae*, as revealed by sequence analysis. **J. Bacteriol.**, v. 174, n. 2, p. 601–609, 1992.

ZHAO, M.; WU, M.; GUO, L.; JIANG, J.; HUANG, W.; LIN, X.; ZHANG, Z.; XIANG, D.; LU, H.; ZHU, S.; YU, Y.; MOLDENHAUER, A.; HAN, W. Expression, purification, and characterization of a novel soluble form of human delta-like-1. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 160, n. 5, p. 1415–1427, 2010.