

ANA PAULA DE ALMEIDA ARANHA LORTHIOIS

**Desenvolvimento de processo para obtenção do método
de conjugação do polissacarídeo capsular de
Haemophilus influenzae tipo b com toxóide tetânico**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

SÃO PAULO

2007

Universidade de São Paulo
Programa de Pós-graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/ I. BUTANTAN/ IPT

ANA PAULA DE ALMEIDA ARANHA LORTHIOIS

**Desenvolvimento de processo para obtenção do método
de conjugação do polissacarídeo capsular de
Haemophilus influenzae tipo b com toxóide tetânico**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Profa. Dra. Martha Massako Tanizaki

SÃO PAULO

2007

As minhas princesas Amaya e Lila
Aos meus pais, Mariá e Márcia
Ao meu marido Stanislav
por sempre acreditarem no meu potencial e
me amarem incondicionalmente

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Isaías Raw pela paixão às ciências e pela luta incessante para melhorar a saúde do povo brasileiro. Obrigada pela oportunidade de me tornar funcionária desta instituição.

A Dra. Martha Massako Tanizaki pelo apoio durante a realização deste trabalho e pela disponibilidade para conversar.

A Dra. Mickie Takagi pelas dicas na condução dos experimentos iniciais e pelo polissacarídeo de *H. influenzae* tipo b.

A Dra. M. Elizabeth de Almeida Sbrogio pelo carinho que precisei todas as vezes que pedi, pela força com as cobaias (desculpas pela alergia...), pela paciência nas correções e pelos conselhos profissionais e familiares.

Agradeço a todos os funcionários do Central que sempre me atenderam com muita atenção: Dona Salete, Fátima, Marisa, Toninho.

Não poderia esquecer das minhas amigas e dos nossos almoços: Adriana, Ana Paula, Fabíola, Paula, Talita, sem vocês este trabalho teria sido muito mais difícil.

A minha amiga Cátia pela força de vontade e coragem para continuar na pesquisa (grande exemplo a ser seguido).

Agradeço a Sandra, Cristina, Paulo, Silvia Albani, Mateus Ribeiro.

Ao funcionário José Augusto Ferraz do Infectório Central pela ajuda e paciência nos experimentos *in vivo* com as cobaias.

Agradeço também as funcionárias da Biblioteca do ICB, em especial a Eva Aparecida da Silva Oliveira e Maria José de Jesus Carvalho.

Ao Dr. Joaquin Cabrera-Crespo pelo imenso conhecimento e pelas conversas intermináveis.

Aos meus pais, José Maria e Maria Lúcia, que jamais me abandonaram e me apoiaram nesta jornada que finda aqui.

As minhas queridas irmãs Maria e Márcia, por quem tenho imenso amor e saudades. Obrigada por levantarem minha moral quando precisava.

Este trabalho foi árduo, com certeza!! Mas tudo foi recompensado com um simples sorriso inocente das minhas adoráveis filhas Amaya e Lila. Amo vocês minhas princesas!

Dentre as pessoas que eu já agradei com certeza ainda falta a mais especial, meu marido Stanislas. Não é a toa que te escolhi para compartilhar de todos os momentos da minha vida.

Hoje termino meu trabalho dedicando-o a você! Muito obrigada por tudo!!

RESUMO

LORTHIOIS, A. P. A. A. **Desenvolvimento de processo para obtenção do método de conjugação do polissacarídeo capsular de *Haemophilus influenzae* tipo b com toxóide tetânico.** 155f. Tese (Doutorado) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Haemophilus influenzae type b (Hib) é uma importante bactéria causadora de pneumonia e meningite em crianças abaixo dos 5 anos de idade. A doença pode ser prevenida através da imunização da população com a vacina conjugada polissacarídeo-proteína, uma vez que a vacina de polissacarídeo não é eficiente. O presente estudo desenvolveu um novo método de conjugação do polissacarídeo capsular de Hib (PRP) com toxóide tetânico (TT). O método hidrazona baseia-se em 3 etapas simples: oxidação e derivatização de PRP com espaçador molecular e conjugação com TT na presença de uma carbodiimida e de um éster amino reativo. O método hidrazona mostrou excelentes resultados de rendimento mesmo após escalonamento. A imunogenicidade e o índice de avidéz do conjugado hidrazona foram avaliados e os resultados encontrados foram comparáveis a vacina comercial Hiberix®. O novo processo de conjugação da vacina permitiu o desenvolvimento de uma poderosa tecnologia constituindo uma excelente opção para o governo brasileiro.

Palavras-chave: vacina conjugada, polissacarídeo, *Haemophilus influenzae* tipo b.

ABSTRACT

LORTHIOIS, A.P.A.A. – **Development of process for capsular polysaccharide *Haemophilus influenzae* type b with tetanus toxoid conjugation method.** 155f. Thesis (Doctoral) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.

Haemophilus influenzae type b (Hib) is an important encapsulated bacteria, which causes pneumonia and meningitis in infants. The prevention against infection is achieved by polysaccharide – protein conjugated vaccine. The conjugated vaccines available are expensive around U\$2,7 per dose. In the present study we developed a new method for conjugate Hib polysaccharide (PRP) and tetanus toxoid (TT). The hydrazone method is based on 3 singles steps: PRP oxidation, PRP derivatization with linker spacer and conjugation with TT in the presence of carbodiimide and an amino reactive ester. The new process showed very good yield of conjugation even when it was scaled-up. The immunogenicity and the avidity index of hydrazone conjugate were evaluated and the results were comparable with the commercial vaccine Hiberix®. The HPLC hydrazone profile was very similar to HPLC Hiberix profile. Finally, the new process of conjugate vaccine allows the development of a powerful vaccine technology constituting in an excellent choice to brazilian government.

Key words: *Haemophilus influenzae* type b, conjugate vaccine, encapsulated bacteria.

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADH – diidrazida do ácido adípico
- Al(OH)₃ – hidróxido de alumínio
- BSA – albumina sérica bovina
- CNBH₃Na – cianoboroiderto de sódio
- CRM₁₉₇ – toxóide diftérico detoxificado por mutação
- DPT – difteria-pertussis-tétano
- EDAC - 1-etil-3-(dimetilaminopropil)carbodiimida
- EDU – *N*-etil-*N'*-(dimetilaminopropil)uréia
- ELISA – *Enzyme linked immunosorbent assay*
- GAVI - *Global Alliance for Vaccines and Immunization*
- HbOC – oligossacarídeo de *Haemophilus influenzae* tipo b
- Hib - *Haemophilus influenzae* tipo b
- HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*
- HPSEC - *High Performance Size Exclusion Chromatography*
- IA – índice de avidéz
- IgG – imunoglobulina de classe G
- LPS - lipopolissacarídeo
- MHC – complexo de histocompatibilidade
- MS – Ministério da Saúde
- NHS - *N*-hidroxisuccinimida
- NTHi – cepa de *Haemophilus influenzae* não tipável
- OMP – proteínas de membrana externa
- OMS – Organização Mundial da Saúde

OMV – vesículas de membrana externa

PBS – Phosphate Buffered Saline (tampão fosfato-salina)

PNI – Programa Nacional de Imunização

PRP – poliribosil-ribitol-fosfato

PRP-ADH – polissacarídeo de Hib derivatizado com ADH

PRP-ADH-TT – vacina conjugada de polissacarídeo de Hib com toxóide tetânico

PRP-CRM₁₉₇ - vacina conjugada de polissacarídeo de *Haemophilus influenzae* tipo b com toxóide diftérico detoxificado por mutação

PRP-D – vacina conjugada de polissacarídeo de *Haemophilus influenzae* tipo b com toxóide diftérico

PRP-T - vacina conjugada de polissacarídeo de *Haemophilus influenzae* tipo b com toxóide tetânico

PRP-OMP - vacina conjugada de polissacarídeo de *Haemophilus influenzae* tipo b com proteína de membrana externa

PRPoxi – polissacarídeo de Hib oxidado

PSC – polissacarídeo de meningococo de grupo C

RMN – ressonância magnética nuclear

Sulfo-NHS – sulfo *N*-hidroxisuccinimida

TD – timo dependente

TI – timo independente

TT – toxóide tetânico

Ve – volume de eluição da amostra

Vo – volume morto ou volume de eluição do *Blue Dextran*

Vt – volume de eluição da riboflavina

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Estrutura do polissacarídeo capsular de *Haemophilus influenzae* tipo *b*..... - 23 -
- Figura 2:** Representação das estruturas de vacinas conjugadas. (A) Estrutura neoconjugado produzida pelo acoplamento de fragmentos de polissacarídeos a uma proteína apropriada (por exemplo: PRP-CRM197). O polissacarídeo pode apresentar espaçador molecular ou não. (B) Estrutura “lattice”: múltiplas ativações aleatórias do polissacarídeo e acoplamento a proteína carregadora permite múltiplas ligações entre as macromoléculas formando uma rede de alto peso molecular (por exemplo: PRP-DT). (C) Estrutura “ladder”: fragmentos do polissacarídeo são acoplados a uma única vesícula de membrana externa na presença de espaçador bigenérico (por exemplo: PRP-OMP). - 34 -
- Figura 3:** Esquema representativo da oxidação de uma subunidade de polissacarídeo de Hib por metaperiodato de sódio (NaIO₄). O sítio preferencial do agente oxidante localiza-se entre duas -OH adjacentes (seta vermelha). São necessárias 2 moléculas de NaIO₄ para quebrar a ligação C-C e assim, clivar a molécula em fragmentos menores com subsequente inserção do grupo aldeído..... - 38 -
- Figura 4:** Derivatização de macromoléculas com ADH. (A) Derivatização ADH/carboxila (1) – Intermediário *O*-acilissouréia – Proteína ativada com EDAC. (2) – Diídrizida do ácido adípico (ADH). (3) – Proteína derivatizada, formação da ligação imida. (B) Derivatização ADH/aldeído (1) – Glicoproteína oxidada com periodato de sódio. (2) – Diídrizida do ácido adípico (ADH). (3) – Glicoproteína derivatizada com ADH, formação da ligação hidrazona. - 43 -
- Figura 5:** Ativação do grupo carboxílico por carbodiimida. (1) EDAC. (2) Proteína, em evidência o grupo carboxila. (3) Intermediário *O*-acilissouréia formado a partir da reação entre EDAC e grupo -COOH da proteína. (4) Regeneração do grupo carboxila devido a presença de H₂O. (5) Sulfo-NHS. (6) Intermediário éster estável. Este intermediário poderá ser usado para conjugação posterior..... - 45 -
- Figura 6:** Fluxograma do Método Hidrazona. O método é constituído por 2 etapas: ativação de PRP (oxidação e derivatização de PRP) e ativação de TT. O conjugado PRP-ADH-TT é obtido após ligação covalente entre PRP-ADH e TT..... - 57 -
- Figura 7:** Esquema de conjugação pelo Método Hidrazona. **1ª Etapa** – Ativação do PRP por oxidação (introdução de um aldeído terminal) seguido de derivatização com uma molécula contendo grupo hidrazida. **2ª Etapa** – Conjugação do PRP-ADH com toxóide tetânico (TT) na presença de *N*-etil-*N'*-(dimetilaminopropil) carbodiimida (EDAC)..... - 70 -
- Figura 8:** Cromatograma representativo do PRP nativo e oxidado. PRP nativo (linha verde) e oxidado (linha laranja) tratado com NaIO₄ foram aplicados em coluna de filtração em gel contendo Sephacryl S-400. As setas indicam o V_o (void volume) e o V_f (volume final de resina) respectivamente..... - 73 -
- Figura 9:** Esquema de reação de derivatização entre PRPoxi e ADH e exemplo de 3 produtos possíveis desta reação. (1) Produto desejável de derivatização no qual existe apenas 1 molécula de ADH ligada ao PRP e a outra ponta de hidrazida estaria livre para ligação com proteína. (2) Possível formação de polímero onde não há mais hidrazida livre, pois outra molécula de PRPoxi se ligou a outra ponta. (3) Possível produto de derivatização com formação de polímero. Em ambas as situações hipotéticas (2) e (3) ocorre aumento na massa molecular de PRP..... - 76 -
- Figura 10:** Perfil cromatográfico representativo de PRP-ADH resultantes de reações de derivatização com 1h, 2h ou 4h (verde) e 8h ou 10h (laranja) de duração, respectivamente. As amostras foram aplicadas em Sephacryl S-400. Condições de reação: PRPoxi (10mg/mL) + ADH (32mg) derivatizado por 1h, 2h ou 4h (verde) ou 8h ou 10h (laranja)..... - 77 -
- Figura 11:** Influência do pH no rendimento de conjugação. Conjugação realizada na seguinte condição: 10mg de PRP-ADH e TT em concentrações finais de 1mg/mL, TT ativado com 1M EDAC, 2 dias de reação. Os experimentos foram realizados em tampão C₂H₃O₂Na 0,1M, NaCl 0,15M para pH 5,0 ou Na₂HPO₄

- 0,1M, NaCl 0,15M para pH 8,0. - 83 -
- Figura 12:** Avaliação do tempo de reação no rendimento de conjugação de PRP-ADH-TT. A condição de trabalho estabelecida foi: 10mg de PRP-ADH e TT em concentrações finais de 1mg/mL, TT ativado com 1M EDAC, tampão Na₂HPO₄ 0,1M, NaCl 0,15M pH 8,0..... - 85 -
- Figura 13:** Avaliação da proporção PRP-ADH:TT no rendimento de conjugação do conjugado PRP-ADH-TT. A condição de trabalho analisada foi: PRP-ADH e TT em concentrações finais de 1mg/mL, TT ativado com 1M EDAC, 2 dias de reação, tampão Na₂HPO₄ 0,1M, NaCl 0,15M pH 8,0. - 88 -
- Figura 14:** Rendimento de conjugação em função da concentração de PRP-ADH e TT na formação do conjugado PRP-ADH-TT. A condição de conjugação analisada foi: 10mg PRP-ADH e 2,5mg TT massa final, TT ativado com 1M EDAC, tampão Na₂HPO₄ 0,1M, NaCl 0,15M pH 8,0, 2 dias de reação..... - 90 -
- Figura 15:** Fluxograma da **ETAPA 1** do Método de conjugação Hidrazona. **Etapa 1** – Ativação de PRP. ... - 96 -
- Figura 16:** Análise do perfil cromatográfico do conjugado em diferentes tempos de reação. Condição de conjugação: 50mg PRP-ADH, 12,5mg TT em concentrações iniciais de 1mg/mL, tampão Na₂HPO₄ 0,1M, NaCl 0,15M, pH8, TT ativado com 1M EDAC e 5mM de Sulfo-NHS por 30 min, 2 dias de reação .. - 105 -
- Figura 17:** Perfil cromatográfico de um conjugado purificado em ultrafiltração tangencial com membrana de corte nominal de 100kDa. (A) conjugado sem Sulfo-NHS. (B) conjugado com Sulfo-NHS. Condição de conjugação: 50mg PRP-ADH, 12,5mg TT em concentrações iniciais de 1mg/mL, tampão Na₂HPO₄ 0,1M, NaCl 0,15M, pH8, TT ativado com 1M EDAC e 5mM de Sulfo-NHS por 30 min, 2 dias de reação. . - 106 -
- Figura 18:** Fluxograma da **ETAPA 2** – Conjugação de PRP-ADH e TT..... - 107 -
- Figura 19:** Título de anticorpos IgG anti-PRP em soros individuais de cobaias previamente imunizadas, por via subcutânea, com três doses da vacina em intervalo de 29 dias e as sangrias realizadas nos dias 30, 60 e 90 dias após a primeira dose (3 experimentos). **PRP** – 10µg de PRP, **PRP+TT** – 10µg de PRP-ADH + 30µg TT coadministrado, **Conj1** – 10µg de PRP-ADH – Conjugado PRP-ADH-TT pelo Método Hidrazona (relação final PRP/TT 0,28), **Hidrazona** – 10µg de PRP-ADH – Conjugado PRP-ADH-TT pelo Método Hidrazona (relação final PRP/TT 3,6), **Amina Red.** – 10µg de PRP – Conjugado PRP-TT pelo Método Aminoação Redutiva (relação final PRP/TT 0,15), **Hiberix** – 10µg de PRP – vacina conjugada PRP-ADH-TT pelo Método CNBr (relação final PRP/TT 0,3). Análise estatística realizada pelo teste de Mann Whitney com nível de significância de p<0,05. - 115 -
- Figura 20:** Determinação do índice de avidéz (IA) dos anticorpos IgG anti-PRP em soros individuais (após 90 dias da primeira dose) de cobaias imunizadas com 3 doses dos seguintes antígenos: **Conjugado 1** – Conjugado PRP-ADH-TT pelo Método Hidrazona (relação final PRP/TT 0,28), **Conjugado Hidrazona** – Conjugado PRP-ADH-TT pelo Método Hidrazona (relação final PRP/TT 3,6), **Conjugado Aminoação redutiva** – Conjugado PRP-TT pelo Método Aminoação Redutiva (relação final PRP/TT 0,15) e **Hiberix** – vacina conjugada PRP-ADH-TT pelo Método CNBr (relação final PRP/TT 0,3). Análise estatística realizada pelo teste de Mann Whitney com nível de significância de p<0,05..... - 117 -
- Figura 21:** Perfil cromatográfico da vacina Hiberix (0,4µg de PRP, 0,6µg de TT) aplicada em coluna de filtração em gel TSK Progel™ G3000 SW acoplada ao HPLC..... - 119 -
- Figura 22:** Perfil cromatográfico do conjugado PRP-ADH-TT não purificado (9,6 µg de PRP-ADH, 45 µg de TT) aplicado coluna de filtração em gel TSK Progel™ G3000 SW acoplada ao HPLC..... - 119 -
- Figura 23:** Perfil cromatográfico do conjugado PRP-ADH-TT purificado (5,7µg de PRP-ADH, 22,3µg de TT) em Sephacryl S-400 e aplicado em coluna de filtração em gel TSK Progel™ G3000 SW acoplada ao HPLC. - 120 -
- Figura 24:** Teste de estabilidade da Vacina Hiberix. Preto – Vacina Hiberix controle (0,4µg PRP e 1,2µg de TT) mantida a 4°C por 10 semanas. Rosa – Vacina Hiberix (0,4µg PRP e 1,2µg de TT) mantida a 37°C por 10 semanas. Azul – Vacina Hiberix (0,4µg PRP e 1,2µg de TT) mantida a 50°C por 10 semanas. - 123 -

Figura 25: Teste de estabilidade do conjugado PRP-ADH-TT. Preto – Conjugado controle (0,4µg PRP e 1,4µg de TT) mantido a 4°C por 10 semanas. Rosa – Conjugado mantido a 37°C (0,4µg PRP e 1,2µg de TT) por 10 semanas. Azul – Conjugado mantido a 50°C (0,4µg PRP e 1,2µg de TT) por 10 semanas. - 123 -

Figura A: Método de conjugação para obtenção da vacina PRP-D. (1) PRP de tamanho reduzido por hidrólise térmica; (2) Brometo de Cianogênio; (3) PRP ativado com Brometo de Cianogênio; (4) Toxóide Diftérico; (5) Diidrazida do ácido adípico (ADH); (6) TD derivatizada; (7) Conjugado final TD-ADH-PRP. - 142 -

Figura B: Método de conjugação para obtenção da vacina HbOC. (1) estrutura do polissacarídeo de *H. influenzae* tipo b (PRP); (2) Metaperiodato de sódio; (3) PRP oxidado; (4) Toxóide diftérico modificado geneticamente CRM197; (5) Conjugado PRP-CRM197. - 144 -

Figura C: Método de conjugação para obtenção da vacina PRP-OMV. (1) PRP de tamanho reduzido; (2) Cloreto de Bromoacetil; (3) PRP bromoacetilado; (4) Vesícula de membrana externa de *N. meningitidis* sorotipo B (OMV); (5) N-acetilhomocisteína tiolactona; (6) OMV derivatizada; (7) Conjugado final PRP e OMV. - 145 -

Figura D: Método de conjugação para obtenção da vacina PRP-TT. (1) PRP Poliribosilribitol fosfato. (2) Brometo de Cianogênio (CNBr). (3) PRP ativado com CNBr. (4) Diidrazida do ácido adípico (ADH). (5) PRP derivatizado com ADH. (6) Proteína Toxóide Tetânico (TT). (7) Conjugado final TT-ADH-PRP.- 146 -

Figura E – Curva de Seletividade (LOG PM X Kd) para determinação da equação da reta após regressão linear.- 148 -

Figura F: Perfil cromatográfico de toxóide tetânico não tratado com EDAC (linha verde) e tratado com EDAC 1M (linha laranja) em Sephacryl S-400. Condição do ensaio: TT não tratado com EDAC 1mg/mL TT, tampão Na₂HPO₄ 0,1M, NaCl 0,15M, pH8, 2 dias de reação; TT tratado com EDAC 1mg/mL TT, EDAC 1M, tampão Na₂HPO₄ 0,1M, NaCl 0,15M, pH8, 2 dias de reação. - 149 -

Figura G: Perfil cromatográfico do conjugado PRP-ADH-TT purificado em Q-Sepharose f.f. **F1Q** – Fração não adsorvida (flow through) + Reequilíbrio. **F2Q** – Step com 25% Tampão B. **F3Q** – Gradiente linear de 25 a 70% de Tampão B. **Tampão A:** Tris HCl 25mM pH7, **Tampão B:** Tris HCl 25mM, NaCl 1M pH7. Condição de corrida: Fluxo (5mL/min), coluna XK16. - 150 -

Figura H: Perfil cromatográfico do conjugado PRP-ADH-TT purificado em Phenyl Sepharose f.f. **F1** – Fração não adsorvida (flow through) + Reequilíbrio (Tampão A). **F2** – Step com 100% de Tampão B. **F3** Step com 100% de Tampão C. **F4** Step com 100% de Tampão D. **Tampão A:** Sulfato de amônio 0,7M, fosfato de sódio 20mM pH7. **Tampão B:** Fosfato de sódio 20mM pH7. **Tampão C:** Isopropanol 15%. **Tampão D:** Isopropanol 30%. Condição de corrida: Fluxo (5mL/min), coluna XK16. - 151 -

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Vacinas conjugadas de <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b	- 49 -
Tabela 2: Ensaio para determinação das condições de oxidação de PRP com NaIO ₄ .	- 72 -
Tabela 3: Efeito do tempo de reação sobre a reação de derivatização de PRP oxidado.	- 75 -
Tabela 4: Efeito da quantidade de ADH na reação de derivatização de PRPoxi.	- 78 -
Tabela 5: Influência do pH no rendimento do conjugado PRP-ADH-TT.	- 83 -
Tabela 6: Influência do tempo de reação no rendimento de conjugação.	- 85 -
Tabela 7: Influência da relação de PRP-ADH/TT no rendimento da conjugação.	- 88 -
Tabela 8: Influência das concentrações de PRP-ADH e TT no rendimento da conjugação.	- 90 -
Tabela 9: Comparação de rendimento de purificação de PRPoxi e PRP-ADH por cromatografia de exclusão molecular e ultrafiltração tangencial.	- 94 -
Tabela 10: Caracterização química e rendimento de conjugação PRP-ADH-TT em escala ampliada usando diferentes quantidades de PRP-ADH e TT.	- 97 -
Tabela 11: Avaliação da interferência de EDAC no rendimento de conjugação de PRP-ADH e TT em experimento com adição de diferentes quantidades de carbodiimida.	- 99 -
Tabela 12: Avaliação da interferência de EDU no rendimento de conjugação de PRP-ADH e TT.	- 100 -
Tabela 13: Avaliação da presença de Sulfo-NHS e EDAC no rendimento de conjugação de PRP-ADH e TT.	- 102 -
Tabela 14: Reavaliação da concentração de PRP-ADH e TT no rendimento de conjugação.	- 103 -
Tabela 15: Reavaliação da influência do tempo no rendimento de conjugação.	- 104 -
Tabela 16: Parâmetros físico-químicos dos antígenos vacinais administrados em cobaias.	- 113 -
Tabela A: Calibração da coluna Sephacryl S-400 com os seguintes dextrans (Blue Dextran, 229kDa, 90kDa, 40kDa, 10kDa e Riboflavina).	- 147 -

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18 -
1.1 Histórico	18 -
1.2 O microrganismo Haemophilus influenzae tipo b	19 -
1.3 Patogênese	20 -
1.4 Fatores de virulência.....	21 -
1.4.1 Cápsula polissacarídica.....	22 -
1.5 Epidemiologia.....	23 -
1.6 Vacinas contra Hib.....	27 -
1.6.1 Vacinas de polissacarídeos	27 -
1.6.2 Vacinas conjugadas polissacarídeo-proteína.....	29 -
1.7 Principais fatores que definem a eficácia e estabilidade das vacinas conjugadas..	31 -
1.7.1 Métodos de conjugação	31 -
1.7.2 Tamanho da cadeia de polissacarídeo	35 -
1.7.3 Natureza da proteína carregadora	39 -
1.7.4 Proporção polissacarídeo/proteína	41 -
1.7.5 Presença da molécula espaçadora.....	41 -
1.8 Descrição do processo de conjugação química das vacinas conjugadas contra Hib-	46
-	-
1.8.1 PRP-D – ProHIBiT® (ANEXO C).....	46 -
1.8.2 HbOC – HibTiter® (ANEXO D)	47 -
1.8.3 PRP-OMP – PedvaxHIB® (ANEXO E)	48 -
1.8.4 PRP-T – Hiberix® (ANEXO F)	48 -

1.9 Estratégia alternativa para introdução da vacina de Hib em países em desenvolvimento	- 50 -
1.10 Cenário atual da vacina de Hib no Brasil.....	- 51 -
2 OBJETIVOS	- 52 -
3 JUSTIFICATIVA	- 53 -
4 MATERIAIS E MÉTODOS	- 54 -
4.1 Método Hidrazona de conjugação	- 55 -
4.1.1 Ativação do polissacarídeo capsular.....	- 55 -
4.1.1.1 Oxidação de PRP com metaperiodato de sódio.....	- 55 -
4.1.1.2 Derivatização de PRPoxi.....	- 56 -
4.1.2 Toxóide Tetânico	- 56 -
4.1.2.1 Reação de ativação da proteína Toxóide Tetânica.....	- 56 -
4.2 Reação de conjugação de PRP-ADH com TT	- 57 -
4.3 Caracterização física e química do conjugado PRP-ADH-TT	- 58 -
4.3.1 Determinação da concentração de PRP.....	- 58 -
4.3.2 Determinação de proteína - Método de Bradford.....	- 58 -
4.3.3 Determinação de ADH	- 59 -
4.4 Purificação do conjugado.....	- 59 -
4.4.1 Cromatografia por exclusão molecular	- 59 -
4.4.2 Cromatografia de troca iônica	- 60 -
4.4.3 Cromatografia por interação hidrofóbica.....	- 61 -
4.4.4 Ultrafiltração Tangencial.....	- 61 -
4.5 Análise imunológica da resposta imune induzida pelo conjugado PRP-ADH-TT.-	- 62 -
4.5.1 Antígenos vacinais e esquema de imunização em camundongos	- 62 -

Vacina Hiberix	62 -
4.5.2 Antígenos vacinais e esquema de imunização em cobaias	63 -
4.5.3 Determinação dos anticorpos IgG totais anti-PRP e anti-TT.....	64 -
4.5.4 Determinação do índice de avidéz do anticorpo anti-PRP-ADH.....	65 -
4.6 Análise Estatística	65 -
4.7 Teste de estabilidade acelerada.....	66 -
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	67 -
5.1 Desenvolvimento de um novo método de conjugação – Método Hidrazona	69 -
5.1.1 Ativação de polissacarídeo capsular de Hib	70 -
5.1.1.1 Oxidação de PRP Hib.....	71 -
5.1.1.2 Derivatização do PRPoxi.....	74 -
5.1.2 Etapa de conjugação química	80 -
5.1.2.1 Influência do pH.....	81 -
5.1.2.2 Influência do tempo de reação	84 -
5.1.2.3 Influência da proporção PRP-ADH e TT	86 -
5.1.2.4 Influência da concentração de PRP-ADH e TT	89 -
5.2 Estudo para escalonamento do Método Hidrazona	93 -
5.2.1 Ativação de PRP – ETAPA 1	93 -
5.2.2 Conjugação – ETAPA 2	97 -
5.2.3 Purificação do conjugado.....	108 -
5.3 Testes de imunogenicidade	111 -
5.4 Análise do conjugado PRP-ADH-TT por HPLC	118 -
5.5 Teste de estabilidade acelerada do conjugado PRP-ADH-TT.....	121 -
6 CONCLUSÕES.....	124 -
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	126 -

ANEXO A	- 140 -
ANEXO B	- 141 -
ANEXO C	- 142 -
ANEXO D	- 143 -
ANEXO E	- 145 -
ANEXO F	- 146 -
ANEXO G	- 147 -
ANEXO H	- 149 -
ANEXO I	- 150 -
ANEXO J	- 151 -
ANEXO K	- 152 -

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

A bactéria *Haemophilus influenzae* tipo b é um bacilo, Gram-negativa, possui cápsula polissacarídica e é estimada como a maior causadora de infecção bacteriana em crianças menores de 5 anos e idosos levando ao quadro clínico diagnosticado como otite média aguda, bacteremia, meningite, pneumonia e artrite séptica (PELTOLA, 2000; WENGER *et al.*, 1997; JORDENS E SLACK, 1995).

Foi descrita pela primeira vez, em 1892, por Richard Pfeiffer, sendo que na ocasião ocorria a maior pandemia de influenza. O pesquisador encontrou a bactéria associada à saliva de pacientes doentes e propôs uma associação causal entre esta espécie e os sintomas clínicos conhecidos da gripe (PITTMAN, 1931).

Em 1920, a bactéria então conhecida como bacilo de Pfeiffer, teve sua denominação redefinida quando Winslow e colaboradores 1920 estudando os fatores de crescimento da bactéria observaram que uma das exigências para o cultivo do microrganismo era a presença dos fatores sanguíneos X e V. Sendo assim, a bactéria passou a ser denominada tal como é conhecida atualmente *Haemophilus influenzae* devido a esta necessidade de fatores sanguíneos no meio de cultura.

No ano de 1930, Margaret Pittman mostrou que *Haemophilus influenzae* poderia ser isolada na forma encapsulada e não encapsulada. Além disso, dentro das linhagens da forma encapsulada identificou e denominou os seis sorotipos antígenicamente distintos (*a-f*). Pittman observou que toda linhagem isolada a partir de sangue ou fluido cerebrospinal de pacientes jovens com meningite pertencia ao sorotipo tipo *b*, ao passo que as linhagens não encapsuladas eram, geralmente, encontradas nas secreções do trato respiratório superior de adultos. Além das contribuições já descritas, a pesquisadora também demonstrou que o anticorpo contra a cápsula do tipo *b* conferia proteção tipo específica contra a infecção letal causada pela bactéria. Atualmente ainda 90% das infecções são causadas pelo tipo *b*.

A primeira evidência da relação entre a idade do paciente e a doença causada por

Haemophilus influenzae tipo **b** (Hib) foi apontada por Fothergill e Wright (1933) que demonstraram a ausência de anticorpos bactericidas no sangue de crianças com pouca idade quando comparados ao de crianças mais velhas ou adultos.

O advento de agentes antibacterianos, tais como os antibióticos, interromperam o interesse no desenvolvimento de uma vacina contra Hib por décadas. Contudo, a morbidade e a mortalidade da doença não puderam ser completamente eliminadas com antibióticos principalmente por que surgiram linhagens resistentes a estes agentes antibacterianos. Somente no final dos anos 60 foi que os cientistas voltaram o foco das atenções para a importância de uma vacina contra Hib.

Schneerson (1971) verificou que a presença do anticorpo obtido contra a cápsula tipo b conferia proteção contra a doença causada por Hib sugerindo que esses anticorpos obtidos naturalmente, proporcionavam proteção iniciando-se assim tentativas de induzir imunidade protetora utilizando polissacarídeo capsular como antígeno e, mais tarde, com vacinas conjugadas de polissacarídeo com proteínas diversas.

1.2 O microrganismo *Haemophilus influenzae* tipo b

Inicialmente a espécie *Haemophilus influenzae* foi subdividida em quatro biotipos, classificados de I a IV, através da caracterização por testes bioquímicos baseados nas propriedades fenotípicas (KILIAN, 1976). Atualmente estão definidos 8 biotipos (I-VIII) observando-se igualmente uma correlação entre a cápsula do tipo **b** e o biotipo I, que ocorre com maior predominância em relação aos demais (VAN ALPHEN, 1994).

A cápsula da bactéria é constituída de polissacarídeo de alta massa molecular cuja estrutura define o seu sorotipo. De acordo com as diferentes estruturas da cápsula, a bactéria é classificada em sorotipos que vão de **a** a **f**; o sorotipo tipo **b** é a única de interesse médico (WENGER *et al.*, 1990; PELTOLA, 1984). A cápsula tipo **b** é composta por unidades repetitivas de poliribosil-ribitol-fosfato (PRP) (KNISKERN e MARBURG, 1994; COCHI *et al.*, 1985; CRISEL *et al.*, 1975) sendo considerado como o maior fator de virulência do microrganismo.

1.3 Patogênese

A bactéria Hib é um patógeno restrito de humanos e é comumente encontrado associado à flora comensal normal das vias respiratórias superiores. O microorganismo penetra no hospedeiro pelas vias aéreas e inicia a colonização da nasofaringe podendo esta colonização ser transiente ou prolongada, com duração de meses sem a detecção dos sintomas (portadores assintomáticos). O microorganismo também pode invadir o organismo do hospedeiro através da disseminação sistêmica.

Antes do desenvolvimento da vacina, Hib podia ser isolado em cerca de 0,5 a 3% das crianças saudáveis, enquanto que nos adultos não era praticamente detectado. Até a idade de 5 anos acredita-se que a maioria das crianças já entrou em contato com o patógeno. A transmissão do microorganismo de um portador para outros indivíduos ocorre através de gotículas de saliva ou pelo contato direto.

Em alguns indivíduos o microorganismo pode causar infecção invasiva sendo que esta susceptibilidade parece depender do tamanho do inóculo (SCHWARTZ, *et al.*, 1989). As infecções causadas por Hib geralmente resultam da invasão a partir do trato respiratório para a corrente sanguínea, onde o microorganismo se multiplica.

Estudos em animais mostraram que o estágio inicial da infecção envolve a adesão do microorganismo ao epitélio do trato respiratório e a penetração através da mucosa, iniciando a bacteremia (MOXON, 1992) que pode levar a uma variedade de manifestações invasivas das quais a mais grave é a meningite bacteriana.

Ao contrário de doenças como sarampo, catapora, ou poliomielite, Hib não causa um quadro clínico único e específico, característico da doença e que possa permitir um diagnóstico rápido e preciso. Por esta razão, a doença é silenciosa, o que retarda o início do tratamento. A confirmação da presença deste agente infeccioso no organismo humano requer a coleta de sangue ou de fluido cerebrospinal para isolamento e identificação do microorganismo em laboratório. Paralelamente deve-se dar início ao tratamento com antibióticos, ainda antes da conclusão do diagnóstico (WATT *et al.*, 2003).

A maioria das formas fatais de Hib inclui as doenças meningite ou pneumonia que podem igualmente ser causadas por outros agentes infecciosos (*Neisseria meningitidis* ou

Streptococcus pneumoniae) levando aos mesmos sintomas e quadro clínico. Em proporções menores, Hib também pode ser responsável por outras complicações como a epiglote e a artrite séptica atingindo 7% dos pacientes em cada caso. Epiglote é a infecção da epiglote (tecido cartilaginoso que protege as cordas vocais durante a deglutição) podendo levar a obstrução da passagem do ar e a artrite séptica é a infecção das articulações. Pericardite, abscessos, osteomielite e celulite também fazem parte da lista de doenças que Hib pode causar, ainda que mais raramente (BISGARD *et al.*, 1998).

A meningite é a infecção das membranas que recobrem o cérebro e é a manifestação mais comum da doença invasiva causada por Hib, e somavam 50% a 65% dos casos no período anterior ao desenvolvimento da vacina em países desenvolvidos. As principais manifestações são: febre, diminuição do estado mental, enrijecimento da nuca. As seqüelas neurológicas ocorrem em cerca de 15 a 30% dos sobreviventes e apesar do tratamento a taxa de mortalidade é de 2 a 5% (BISGARD *et al.*, 1998).

Entretanto, Hib não é a única linhagem de *H. influenzae* causadora de patologias e apesar do sucesso da vacina contra Hib no controle da infecção causada por este sorotipo específico, a vacina não teve impacto na diminuição da taxa de incidência de infecções respiratórias causadas por outras cepas de *Haemophilus influenzae* como as cepas de *H. influenzae* não tipável (NTHi) (CRIPPS *et al.*, 2002).

As principais infecções causadas pela bactéria NTHi correspondem a infecções de mucosa, como: otite média, sinusite, bronquite, conjuntivite, pneumonia e infecção do trato urinário (FUNKHOUSER *et al.*, 1991). Este organismo não expressa a cápsula polissacarídica e, apesar da forma invasiva não causar grandes danos como Hib é sabido que ocorre. NTHi é uma bactéria comensal de trato respiratório superior e afeta cerca de 40% dos adultos e 80% a 100% das crianças (CRIPPS *et al.*, 2002). Apesar da alta frequência da infecção de mucosa por NTHi, o diagnóstico e o tratamento são mais raros devido a baixa gravidade (TURK, 1982).

1.4 Fatores de virulência

Algumas estruturas presentes na superfície de Hib ou substâncias secretadas pela

bactéria são fatores determinantes na patogenicidade do microrganismo.

Estruturas tais como fimbria e pili, comumente presentes em outras bactérias Gram negativas, facilitam o processo de colonização e proliferação. Outro fator que pode contribuir para a manifestação da bacteremia são os lipolissacarídeos (LPS) considerados a principal endotoxina em bactérias Gram negativas. A sua presença parece estar relacionada com a capacidade de Hib em variar seu fenótipo de acordo com a fase em que se encontra (colônias transparentes colonizam a nasofaringe; variantes de opacidade intermediária apresentam certa deficiência na colonização e variantes opacas apresentam virulência acentuada) (ZANZE e MOXON, 1987).

A secreção de alguns fatores por Hib também contribuem para sua patogenicidade como a hemocina que é uma bacteriocina tóxica para as linhagens não encapsuladas e linhagens encapsuladas que não sejam do sorogrupo **b** (LIPUMA *et al.*, 1990). Outro fator secretado são as proteases IgA1 que inativam as imunoglobulinas IgA subclasse 1. A produção desta enzima extracelular parece estar relacionada com a capacidade da bactéria em infectar e invadir superfícies de mucosa, uma vez que a presença da protease altera o mecanismo de defesa de mucosa do hospedeiro (KILIAN *et al.*, 1989; PLAUT, 1983) pela clivagem desta importante imunoglobulina.

Entretanto, de todas as estruturas ou substâncias acima citadas, a cápsula polissacarídica é sem dúvida o principal fator de virulência desses microrganismos.

1.4.1 Cápsula polissacarídica

A cápsula polissacarídica é um dos fatores críticos na patogênese da infecção. Diferentes linhagens de *H. influenzae* podem expressar um dos seis tipos de cápsula sorologicamente distintos. Os sorotipos **a** e **b** são heteropolímeros lineares compostos de unidades alternadas de glicose (tipo **a**) e ribose (tipo **b**) e ribitol, unidos por uma ligação fosfodiéster na proporção 1:1:1 (**figura 1**). Sorotipos **c** e **f** contêm *N*-acetil glicosamina e *N*-acetil galactosamina, respectivamente, unidos por uma ligação fosfodiéster em suas unidades repetidas; já os sorotipo **d** e **e** possuem *N*-acetil glicosamina e ácido manurônico em sua unidade repetida (ROBBINS, 1984). Dentre estes sorotipos, somente o sorotipo **b** é

responsável pelas infecções invasivas (95%), sendo, portanto de grande importância clínica e imunológica (WENGER *et al.*, 1990; PELTOLA, 1984).

A síntese da cápsula polissacarídica sofre algumas alterações ao longo do ciclo de vida da bactéria de modo a ajustar-se às diferentes fases de infecção: na colonização ocorre síntese da cápsula de modo a evitar a dessecação e garantir a sobrevivência no hospedeiro; no momento em que a bactéria migra para corrente sanguínea observa-se uma redução provisória na formação da cápsula; uma vez na corrente sanguínea a presença da cápsula se faz necessária novamente para garantir a sobrevivência e a proliferação (ST. GEME III e CUTTER, 1996).

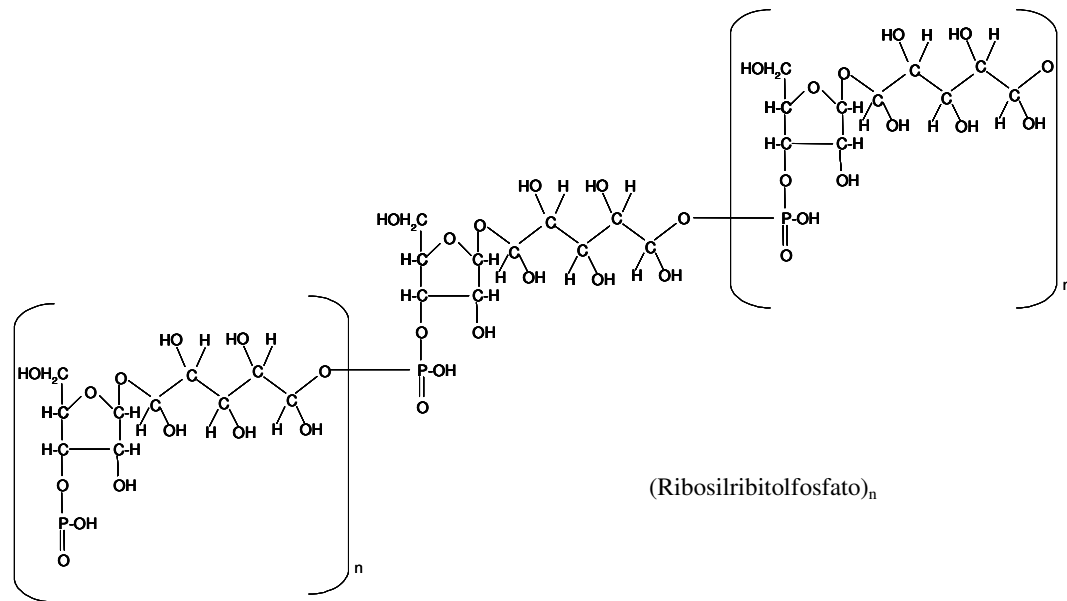


Figura 1: Estrutura do polissacarídeo capsular de *Haemophilus influenzae* tipo *b*.

1.5 Epidemiologia

O principal alvo da doença invasiva é a população infantil com menos de 5 anos de idade (VADHEIM e WARD, 1994). Hib é encontrada predominantemente em crianças entre 2

meses e 5 anos, o que corresponde ao intervalo imunológico entre o desaparecimento dos anticorpos maternos (adquiridos através da placenta) e a aquisição própria de anticorpos protetores (JORDENS e SLACK, 1995).

Antes de 1987 (data que marca a introdução da vacina conjugada nos países desenvolvidos), a doença invasiva causada por Hib era considerada um grande problema mundial atingindo 1 em cada 200 crianças menores de 5 anos de idade em países desenvolvidos, das quais 5-8% faleciam apesar do tratamento com antibióticos, e dentre os sobreviventes, 15-30% apresentavam seqüelas permanentes como perda de audição e retardo mental (WATT *et al.*, 2003; SELL, 1987). Com o desenvolvimento de uma vacina eficaz no combate a doença invasiva, e com a integração desta no esquema de vacinação de vários países, observou-se uma diminuição drástica e rápida nas taxas de incidência de infecção por Hib. As primeiras vacinas conjugadas licenciadas para comercialização mostraram uma eficácia superior a 95% em indivíduos de vários países, contribuindo para a redução significativa da doença causada por esta bactéria (ADA e ISAACS, 2003). Apesar desta redução, os dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) revelaram que Hib é ainda a causa de pelo menos 3 milhões de casos de enfermidade severa, ocasionando 386mil mortes a cada ano, principalmente devido a meningite e a pneumonia (site OMS).

Nos Estados Unidos, Hib era a causa mais comum de meningite em crianças com menos de 5 anos de idade. No início dos anos 80, anualmente estimava-se 40-50 casos para cada 100mil crianças principalmente em menores de 5 anos de idade (VAN ALPHEN, 1994). Com a introdução da vacina conjugada, além do grande impacto na diminuição da doença invasiva, a vacina conjugada contra Hib também reduziu o número de portadores (KELLY *et al.*, 2004; WATT *et al.*, 2003).

Em 1991, na população do Alasca, que continha uma taxa de incidência da doença muito elevada (400-600 casos a cada 100mil crianças) foi implementado em seu programa de imunização a vacina conjugada (PRP-OMP). A incidência da doença invasiva diminuiu drasticamente tanto em crianças nativas como em crianças não nativas após a introdução da vacina. Em 1996, o governo trocou a vacina conjugada pela PRP-CRM₁₉₇ em combinação com a vacina DTP (vacina tríplice contra tétano, difteria e coqueluche) em uma tentativa de diminuir o número de injeções. Após esta troca, a incidência da doença invasiva entre as crianças nativas aumentou aproximadamente 3 vezes em apenas 1 ano. Devido a interação

complexa de fatores ambientais, fatores do hospedeiro e esquema de imunização, foi impossível determinar a razão pela qual houve ressurgência da doença após a mudança no esquema de vacinação (KELLY *et al.* 2004; PELTOLA, 2000).

Antes do desenvolvimento da vacina conjugada, a incidência da doença em crianças não aborígenes era de 33 a 60 casos a cada 100mil crianças. Em contraste, a população aborígine do Norte da Austrália mostrava uma das maiores taxas já encontrada para doença provocada por Hib, mais de 500 casos a cada 100mil crianças (WATT *et al.*, 2003). Em 1993 a vacina conjugada PRP-CRM₁₉₇ foi introduzida na população não aborígine e a vacina PRP-OMP foi utilizada na população de crianças aborígenes. No ano de 2000, com objetivo de simplificar o programa de imunização a vacina PRP-OMP foi finalmente adotada em todas as crianças. De acordo com os dados obtidos desde a introdução da vacina conjugada contra Hib, a taxa de incidência da doença invasiva declinou vertiginosamente até atingir o índice de 2 casos para cada 100mil crianças menores de 5 anos (MCINTYRE, 2003; PELTOLA, 2000).

Em países europeus a incidência da doença invasiva encontrava-se entre 12 a 54 casos a cada 100mil crianças menores de 5 anos (dados encontrados na Espanha e Suécia, respectivamente). Em geral, países do Norte europeu apresentavam maior incidência em relação aos países do Sul ou do Leste (HEALTH e VERNON, 2002; VAN ALPHEN, 1994).

Os países europeus têm adotado diferentes vacinas conjugadas, estratégias de introdução e esquemas de imunização. Apesar das diferentes frentes determinadas para combater a doença causada por Hib, todos relataram que a incidência da doença invasiva diminuiu em mais de 90% desde introdução da vacina conjugada. A incidência atual nos referidos países que fazem parte do esforço em conjunto para erradicar a doença é de 1 caso a cada 100mil crianças menores de 5 anos (PELTOLA, 1997).

Dos países africanos, Gâmbia é considerado um caso modelo de sucesso de implantação da vacina contra Hib na África. Dados epidemiológicos registravam alta incidência da doença, com 200 casos para cada 100mil crianças, além disso, a meningite causada por Hib era considerada de alto risco de fatalidade com freqüentes seqüelas graves entre as crianças sobreviventes (WATT *et al.*, 2003; PELTOLA, 2000). O país passou a adotar a vacina conjugada PRP-T em 1997 e desde a introdução da vacina a incidência da doença diminuiu para 21 casos em cada 100mil crianças. Da mesma maneira que os índices de doença, o índice de portadores do microrganismo também diminuiu de 7,7% para 3,8% em

crianças não vacinadas (KELLY *et al.*, 2004).

Estudos indicaram que na Ásia, Hib é o principal microrganismo causador de meningite em crianças com uma menor taxa de incidência da doença do que em outras regiões (20 crianças a cada 100mil). Estes estudos também apontaram uma taxa substancialmente menor de culturas positivas para meningite bacteriana quando comparado a outras regiões (PELTOLA, 2000).

Dos países latinos americanos, Chile foi o primeiro país a adotar a vacina conjugada (PELTOLA, 2000). Com a introdução da vacina PRP-T o número de casos da doença que atingia cerca de 40 crianças a cada 100mil, diminuiu em 90%. Na Costa Rica, o uso da vacina conjugada, primeiramente no setor privado e atualmente integrado ao calendário básico de imunização permitiu redução de 57% na taxa de incidência que anteriormente era de 45 crianças a cada 100mil.

No Brasil entre 1983 e 1996 foram observados quase 16000 casos de meningite por Hib, representando aproximadamente 5% do total de meningites notificadas, dos quais 47,8% em menores de 1 ano e 89,4% em menores de 5 anos. Nos anos de 1990 a 1995, a taxa de incidência de meningite por Hib no Brasil oscilou entre 14,4 a 23,4 por 100mil habitantes menores de 1 ano e 2,9 a 4,8 em crianças de 1 a 4 anos. A taxa de letalidade nesses grupos era de 19,9% e 17,1% respectivamente. Já para crianças menores de 1 ano este índice alcançava 17,7% crianças para cada 100mil habitantes (ALMEIDA *et al.*, 2005; PELTOLA, 2000). Segundo a Fundação Nacional da Saúde Brasileira (FUNASA), após a introdução da vacina conjugada de Hib no Brasil, a incidência de meningite causada por Hib decresceu 83% em 2 anos, de 1368 casos em 1999 para 234 casos em 2001 no Brasil.

Existem poucas publicações sobre cepas de Hib brasileiras, e um dos últimos estudos que examinou cepas isoladas na região Nordeste do Brasil, mostrou um aumento nos isolados tipo **a** após a vacinação contra tipo **b** (ALMEIDA *et al.*, 2005).

Devido a natureza silenciosa da doença a OMS acredita que a porcentagem de crianças atingidas por Hib, em países em desenvolvimento, seja superior ao divulgado, uma vez que muitos profissionais da medicina associam a presença de Hib somente com a meningite, enquanto que de fato, a pneumonia causada por Hib é 5 vezes maior nestes países. Em 2004, a Global Alliance for Vaccines and Immunization (GAVI), divulgou um relatório indicando as causas da elevada incidência de infecções mesmo após a introdução da vacina conjugada e

considerou a falta de conhecimento sobre a doença como um dos principais fatores para a estatística atual (JONES, 2005; WATT *et al.*, 2003).

Estudos recentes mostram um aumento em isolados não *b* de *Haemophilus influenzae*, o que constitui uma potencial preocupação para os órgãos públicos de saúde, uma vez que não estão disponíveis vacinas para sorotipos *a*, *c*, *d*, *e* e *f* (GOLDBLATT, 2000). Outros estudos mostram que há ressurgência de cepas Hib entre os pacientes vacinados nos diferentes países, apesar das diferentes estratégias de vacinação usadas nos respectivos programas de imunização (JONES, 2005; GOLDBLATT, 2000).

A biotipagem de isolados *Haemophilus influenzae* pode ser usada em pesquisas com fins epidemiológicos. Biotipos I, sorotipo *b* encontram-se frequentemente associados a meningite severa em crianças. Após a introdução da vacina conjugada no Brasil (1999), observou-se uma maior variabilidade dos biotipos entre os isolados de *Haemophilus influenzae*, incluindo biotipos III, IV e VIII. O aumento na variabilidade de biotipos e as várias manifestações clínicas causada por cepas não *b* e NTHi sugerem uma aparente relação entre o biotipo e o local de infecção sendo necessário a realização de estudos epidemiológicos adicionais para sua confirmação (ALMEIDA *et al.*, 2005).

Um grande esforço tem sido feito no sentido de desenvolver uma vacina contra NTHi, mas os componentes antigênicos não são tão fáceis de serem determinados comparativamente com Hib. O seu sucesso vai depender da identificação de um antígeno ou de um grupo de antígenos que sejam conservados dentro da espécie e que também sejam capazes de induzir uma resposta imune protetora (CRIPPS *et al.*, 2002).

1.6 Vacinas contra Hib

1.6.1 Vacinas de polissacarídeos

No que toca ao desenvolvimento de vacinas contra bactérias encapsuladas, como *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* e *Neisseria meningitidis*, o antígeno de maior eficiência para a sua formulação de vacinas é o próprio polissacarídeo componente da

cápsula e principal fator de virulência. Vacinas com esta formulação são designadas vacinas de polissacarídeos. No caso específico de Hib, a vacina de polissacarídeo é então composta por polímeros de PRP que corresponde a subunidade constitutiva da cápsula.

A primeira tentativa de utilização do polissacarídeo capsular como imunógeno foi realizada nos anos 40 por McLeod e colaboradores¹ (*apud* JONES, 2005), entretanto, o uso promissor dos antibióticos no controle de doenças infecciosas adiou o desenvolvimento desta vacina para o final dos anos 60, quando surgiram os primeiros relatos de indivíduos resistentes ao tratamento com antibióticos (COCHI *et al.*, 1985).

Os polissacarídeos capsulares são moléculas grandes que consistem em epítomos repetitivos que não são processados pelas células apresentadoras de antígenos, mas que interagem diretamente com as células B, induzindo síntese de anticorpo na ausência de linfócitos T (GOLDBLATT, 2000). Os polissacarídeos são antígenos conhecidos como T-independentes tipo 2 (TI) e têm como principais características (JONES, 2005; ADA e ISAACS, 2003; STEIN, 1992):

- A não indução de memória imunológica pela falta de envolvimento de células T na síntese de anticorpos;
- Ausência de maturação da afinidade do anticorpo e a diferenciação em outros isotipos (as classes dos anticorpos induzidos são praticamente duas: IgM e IgG2) e
- Não são bons ativadores do sistema complemento

Além das características acima citadas, as vacinas de polissacarídeo não induzem a produção de anticorpos em crianças com menos de 24 meses – considerado grupo de alto risco – pois o sistema imunológico se encontra em processo de maturação (ADA e ISAACS, 2003; JENNINGS e PON, 1997). Para além disso, o reforço com a vacina de polissacarídeo não conduz a um aumento nos níveis de anticorpos (JONES, 2005).

O mecanismo pelo qual o polissacarídeo gera uma resposta imunológica foi descrito

¹ McLEOD, C.M.; HODGES, R.C.; HEIDELBERGER, M.; BERNHARDT, W.G. Prevention of pneumococcal pneumonia by immunization with specific capsular polysaccharides. **J.Exp.Med.**, v.82, p.445-465, 1945.

por Snapper e colaboradores² (*apud* JONES, 2005), de forma resumida, o polissacarídeo interage com moléculas de imunoglobulina da superfície de células B que são responsáveis pela secreção de anticorpos, na presença de um segundo sinal. Quando este segundo sinal é recebido, a célula B diferencia-se em células plasmáticas e passa a secretar anticorpos.

As respostas TI são em muitos casos restritas variando conforme a idade do indivíduo imunizado (ADA e ISAACS, 2003). Em crianças de 2-6 anos o polissacarídeo purificado como vacina conduziu a uma forte resposta de anticorpos contra Hib; em crianças com idade compreendida 18 e 24 meses gerou uma resposta intermediária e em crianças abaixo dos 18 meses a resposta observada foi muito fraca, com todas as características de uma resposta TI-2 já citadas (ADA e ISAACS, 2003, KAYHTY *et al.*, 1994).

Apesar de suas limitações, a vacina de polissacarídeo está disponível no mercado desde 1985 e apresenta boa eficácia num público alvo restrito, composto por crianças acima de 5 anos e adultos, para além de que tem um custo relativamente baixo (FLECK, 2003; PLANS, 2002).

As limitações imunológicas das vacinas baseadas em polissacarídeo podem ser revertidas através de sua conjugação com proteínas carregadoras que geram respostas timo-dependentes (TD).

1.6.2 Vacinas conjugadas polissacarídeo-proteína

As vacinas conjugadas de polissacarídeo-proteína induzem memória imunológica, proteção de longa duração e anticorpos IgG de alta afinidade. Além disso, estas vacinas são altamente eficazes em indivíduos de todas as faixas etárias, incluindo-se o grupo de maior risco – crianças menores de 2 anos de idade (JONES, 2005; ADA e ISAACS, 2003; PELTOLA, 2000; JORDENS e SLACK, 1995).

Os primeiros trabalhos sobre conjugação química datam do início do século XX quando Landsteiner³ (*apud* ADA e ISAACS, 2003) verificou que a cadeia de polissacarídeo

² SNAPPER C.M.; MOND, J.J. A model for induction of T cell-independent humoral immunity in response to polysaccharide antigens. *J. Immunol.*, v.157, p.2229-2233, 1996.

³ LANDSTEINER, K. The specificity of serological reactions. Cambridge: Harvard University Press, 1945.

não era suficiente para gerar uma resposta imunogênica satisfatória, sendo necessário recorrer ao mesmo hapteno (molécula pequena que não é capaz de gerar uma resposta imunológica por si só), mas ligado a uma proteína carregadora.

A capacidade de aumentar a imunogenicidade de antígenos polissacarídicos foi notada pela primeira vez por Avery e Goebel (1929). Em seu trabalho, os autores descreveram que a baixa imunogenicidade do polissacarídeo purificado de *S. pneumoniae* tipo 3, poderia ser melhorada através da sua conjugação química com uma proteína carregadora (AVERY e GOEBEL, 1929⁴, *apud* GOLDBLATT, 1998). Esta observação foi a base para a fundação do desenvolvimento moderno de vacinas conjugadas.

Nos últimos 20 anos, cientistas têm concentrado esforços para ligar um antígeno polissacarídico ineficiente a um antígeno protéico que permita desenvolver uma resposta imunológica TD em crianças menores de 5 anos de idade.

A primeira vacina conjugada contra Hib foi licenciada em 1987, fruto do trabalho de Gordon (1986). Na patente em questão foi utilizada a estratégia da Aminoação Redutiva para efetuar a ligação do polissacarídeo de Hib com uma proteína carregadora. Mais especificamente, o polissacarídeo clivado ativado por brometo de cianogênio (CNBr) foi conjugado a proteína carregadora derivatizada com espaçador molecular de 6 carbonos (proteína do toxóide diftérico TD). A vacina conjugada de PRP e TD é mais conhecida como PRP-D, e é fabricada pela indústria farmacêutica Sanofi Pasteur (KNISKERN e MARBURG, 1994).

Atualmente, existem no mercado 4 vacinas conjugadas disponíveis para a população: PRP-D, PRP-T, PRP-OMP, HbOC. Destas, 3 foram licenciadas nos Estados Unidos para crianças com mais de 2 anos e duas delas para crianças com menos de 1 ano. Todas as vacinas utilizam o mesmo polissacarídeo de Hib, mas diferem nos seguintes aspectos:

- Tipo de carregador protéico;
- Tamanho da cadeia polissacarídica;
- Método de conjugação química adotado.

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

O mecanismo pelo qual os glicoconjugados estimulam o sistema imune envolve uma interação inicial do conjugado à superfície de imunoglobulinas de células B com especificidade apropriada para haptenos de origem sacarídica. O glicoconjugado é internalizado e a proteína carregadora é degradada por enzimas proteolíticas. Alguns peptídeos-chaves são transportados e apresentados pelo complexo de histocompatibilidade de classe II (MHCII). O complexo MHCII-peptídeo é reconhecido pelas células T que então gera sinais apropriados através de interações diretas com proteínas de superfície celular e através de citocinas, para induzir a maturação de células B e sua diferenciação em células plasmáticas cuja principal função é a secreção de anticorpos. (HOUGS *et al.*, 1999; KAYHTY *et al.*, 1994; STEIN, 1992).

1.7 Principais fatores que definem a eficácia e estabilidade das vacinas conjugadas

O polissacarídeo é um polímero que apresenta em cada subunidade constitutiva de sua estrutura química pelo menos um grupo funcional (hidroxila ou carboxila). Na molécula de proteína, grupos carboxílicos e amínicos livres são observados para conjugação como o polissacarídeo.

Desta forma vários parâmetros devem ser controlados para garantir a reprodutibilidade do processo a fim de obter conjugados com características físico-químicas bem definidas.

A imunogenicidade de uma vacina conjugada depende de sua estrutura química final, a qual é altamente influenciada por fatores como: método de conjugação, tamanho da cadeia de polissacarídeo, natureza da proteína carregadora, proporção polissacarídeo/proteína e presença de molécula espaçadora.

1.7.1 Métodos de conjugação

Na escolha do método de conjugação a estrutura química dos componentes da vacina, a disponibilidade dos grupos funcionais presentes nos polissacarídeos (hidroxilas ou carboxilas) e nas proteínas (aminogrupos das lisinas e ácidos carboxílicos dos aminoácidos

ácido aspártico e glutâmico) deve ser levada em consideração, pois interfere diretamente na estrutura final do conjugado que se pretende obter.

Diversos métodos de conjugação estão descritos na literatura sendo que a maioria desses métodos inclui a inserção da molécula espaçadora entre o polissacarídeo e a proteína. As principais metodologias clássicas de conjugação são: método do Brometo de Cianogênio, método da Carbodiimida e método da Aminoação Redutiva.

O método do Brometo de Cianogênio compreende a ativação randômica das hidroxilas do polissacarídeo que podem reagir diretamente com aminogrupos (das proteínas, por exemplo) formando o conjugado ou reagir com espaçadores moleculares como as hidrazidas (KNISKERN e MARBURG, 1994). A desvantagem deste método é o emprego do brometo de cianogênio, pois devido a sua alta toxicidade, gastos adicionais em equipamentos de segurança, treinamento de funcionários e tratamento dos resíduos devem ser incluídos no planejamento dos custos final da vacina.

No método da Carbodiimida os grupos carboxílicos do polissacarídeo são ativados com carbodiimida. Em seguida, o polissacarídeo pode ser derivatizado com uma molécula espaçadora e acoplado então a proteína também previamente ativada com carbodiimida para formação do conjugado (FUKASAWA *et al.*, 1999 e 2006; BARTOLONI *et al.*, 1995). A derivatização também pode ser efetuada na proteína e em seguida acoplada ao polissacarídeo ativado com EDAC. O método da Aminoação Redutiva (**ANEXO A**) prevê a ligação dos radicais aldeídos (gerados pela oxidação das hidroxilas) ao aminogrupos da proteína formando o conjugado (KNISKERN e MARBURG, 1994). Esta metodologia, muitas vezes, implica na adição de agentes bactericidas para prevenção de crescimento de bactérias que possam contaminar a solução, pois o tempo da reação para formação do conjugado costuma ser muito extenso (acima de 5 dias).

A vasta literatura em relação aos métodos de conjugação aplicados na área de desenvolvimento de vacinas inclui variações das metodologias clássicas já mencionadas (LAFFERRIÈRE *et al.*, 1997; FATTOM *et al.*, 1995). Porém, alguns autores, buscam métodos alternativos. O governo cubano licenciou recentemente uma vacina conjugada contra Hib produzida a partir de oligossacarídeos sintéticos ligados a TT (VEREZ-BENCOMO, 2004).

Novos métodos de conjugação têm sido publicados e parecem apresentar maiores rendimentos (em torno de 60-70%) do que os clássicos descritos acima (em torno de 30%)

como: Lees e colaboradores (1996), Silveira e colaboradores (2007) e o apresentado nesta tese.

Independente do método de conjugação escolhido e aplicado, em todos os casos observam-se altos níveis de anticorpos TD sendo induzidos. Contudo a magnitude da resposta imunológica variou conforme a metodologia aplicada.

Cada metodologia de conjugação conduz a formação de uma estrutura química final bem definida. Na literatura (JONES, 2005; KNISKERN e MARBURG, 1994; ANDERSON *et al.*, 1986) estão descritos 3 grandes modelos de estrutura de conjugados (**Figura 2**).

No modelo “matriz” ou “lattice”, múltiplos sítios reativos existem no carboidrato e proteína o que permite a possibilidade de extensivas ligações inter e intra polissacarídeo-proteína (JONES, 2005). As estruturas “lattice” também podem ser formadas com oligossacarídeos contendo múltiplos aldeídos, como por exemplo, resultado da oxidação de polissacarídeo de Hib (KNISKERN E MARBURG, 1994; ANDERSON *et al.*, 1986). No outro extremo estão os “neoglicoconjugados” nos quais se encontram somente 1 sítio reativo no carboidrato e não havendo possibilidade de ligação cruzada com a proteína.

Dada a dificuldade em ligar grande número de oligossacarídeos a proteínas, os neoglicoconjugados tendem a ter uma maior relação polissacarídeo/proteína que os conjugados “lattice” (PAWLOWSKI *et al.*, 1999; KNISKERN e MARBURG, 1994).

Uma terceira estrutura, variante da estrutura “lattice”, encontrada na vacina conjugada de PRP-OMP, é conhecida por apresentar cadeias de polissacarídeo de diferentes tamanhos derivatizados com espaçadores bigenéricos (o grau de derivatização do polissacarídeo é variável) acoplados a uma única proteína de OMP (MARBURG *et al.*, 1986). Este tipo de estrutura apresenta pouca variação no tamanho molecular final da proteína e difere da estrutura “lattice”, associada a vacina PRP-D, na medida em que cada molécula de polissacarídeo está ligada a somente uma molécula de proteína. O termo mais apropriado para denominar esta estrutura é “ladder” (KNISKERN e MARBURG, 1994).

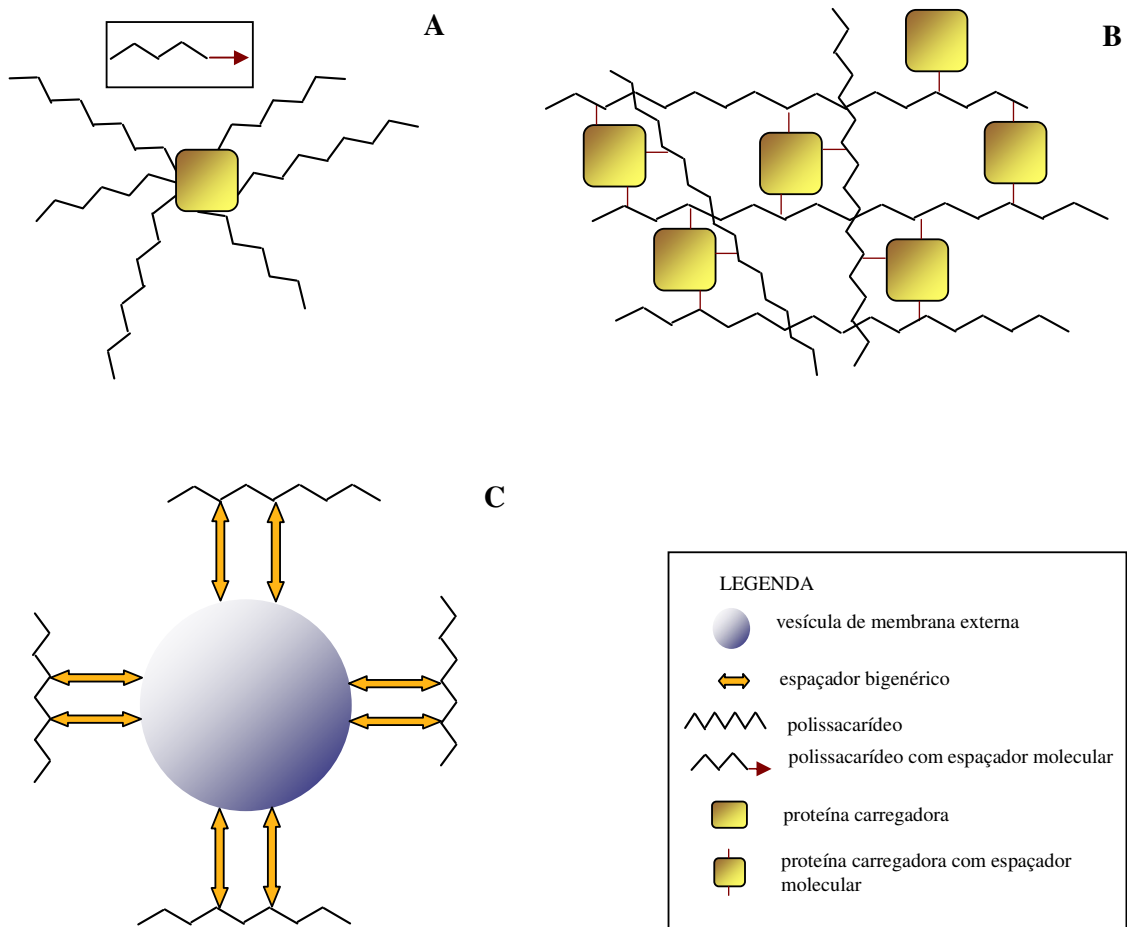


Figura 2: Representação das estruturas de vacinas conjugadas. **(A)** Estrutura neoconjugado produzida pelo acoplamento de fragmentos de polissacarídeos a uma proteína apropriada (por exemplo: PRP-CRM₁₉₇). O polissacarídeo pode apresentar espaçador molecular ou não. **(B)** Estrutura “lattice”: múltiplas ativações aleatórias do polissacarídeo e acoplamento a proteína carregadora permite múltiplas ligações entre as macromoléculas formando uma rede de alto peso molecular (por exemplo: PRP-DT). **(C)** Estrutura “ladder”: fragmentos do polissacarídeo são acoplados a uma única vesícula de membrana externa na presença de espaçador bigenérico (por exemplo: PRP-OMP). Adaptada de Jones (2005); Kniskern e Marburg (1994).

1.7.2 Tamanho da cadeia de polissacarídeo

O conjugado deve apresentar um tamanho de cadeia com um número mínimo de unidades repetitivas não modificadas e em seqüência, a fim de não afetar a sua imunogenicidade. Durante o processo de conjugação do polissacarídeo, cada etapa deve ser controlada para que a estrutura não seja modificada a ponto de descaracterizar os epítomos que induzem os anticorpos contra a cápsula da bactéria.

Duas considerações opostas relacionam diretamente o tamanho da cadeia em vacinas conjugadas com a indução da resposta imune (PAOLETTI *et al.*, 1992):

(a) algumas evidências experimentais sugerem que os fragmentos de sacarídeos de cadeia pequena são melhores para induzir respostas de anticorpos TD, na medida em que podem promover uma relação física mais favorável para interação célula-célula;

(b) o tamanho do hapteno deve ser suficientemente grande para expressar o epítomo completo no antígeno nativo.

Os polissacarídeos necessitam de ser ativados antes do acoplamento com a proteína. Esta ativação resulta na quebra da cadeia ou na inserção de um grupo reativo. Em alguns casos, a proteína também necessita de ser ativada.

Os carboidratos possuem na sua estrutura vários grupos funcionais, principalmente cetonas, aldeídos e hidroxilas, e para além de que podem conter grupos aminas, carboxilato, sulfato, ou fosfato como constituintes adicionais. Modificações e reações de conjugação podem então ser desenhadas tendo como alvo estes grupos funcionais.

O polissacarídeo de Hib contém somente grupos hidroxilas que podem ser susceptíveis de serem modificados e usados para gerar ligações covalentes. Na literatura, é comum a ativação de cadeias polissacarídicas através da oxidação de carboidratos contendo hidroxilas em átomos de carbono adjacentes com periodato de sódio (agente oxidante leve), que cliva a ligação carbono-carbono (C-C) e oxida a hidroxila em grupos aldeídicos reativos (HERMANSON, 1996).

Outro método de clivagem da molécula de polissacarídeo consiste na hidrólise em meio ácido ou básico (POPA e SPIRIDON, 1998). No polissacarídeo de Hib a ligação fosfodiéster entre a molécula de ribose e de ribitol é lábil em condições ácidas ou básicas e em temperaturas superiores a 37°C (SCHNEERSON *et al.*, 1980). Apesar de este método ser eficiente na clivagem da molécula de polissacarídeo, apenas a hidrólise, seja ela ácida ou básica, não é suficiente para inserir um grupamento reativo na molécula. Por esta razão, a oxidação de cadeias de carboidratos por periodato de sódio é mais utilizada, pois além de inserir um grupo reativo, permite ainda diminuir o tamanho final da molécula de alguns polissacarídeos.

A reação de oxidação envolve a ação do íon periodato sobre uma molécula com uma ou mais hidroxilas vicinais, resulta na quebra da ligação C-C e na formação subsequente de 2 grupos aldeídos (SUSSICH E CESARO, 2000; AALMO E PAINTER, 1981). Esta reação ocorre independentemente do pH. No entanto, a taxa de oxidação pode variar consoante a concentração do agente oxidante e da substância redutora utilizada (VOLD e CHRISTENSEN, 2005; WOLFE e HAGE, 1995).

No que toca a temperatura ótima de reação, a literatura traz algumas incongruências. Certos autores (VOLD e CHRISTENSEN, 2005; HERMANSON, 1996; AALMO e PAINTER, 1981) relatam a reação de oxidação como independente da temperatura, enquanto outros mencionam uma melhora na taxa de oxidação quando a reação ocorre a 4°C (SUSSICH e CESARO, 2000; WOLFE e HAGE, 1995).

O mecanismo da reação de oxidação com periodato pode ser descrito de acordo com Sussich e Cesaro (2000) (**ANEXO B**):

(a) Uma das ligações iodo-oxigênio do periodato de sódio ataca uma das 2 hidroxilas. Esta reação é pH-independente e pode ser catalisada tanto por ácidos como por bases. Nesta etapa ocorre a formação do éster planar cíclico cujo rendimento parece depender da acidez do oxigênio dos grupos -OH e suas posições relativas. Quando o diol faz parte de uma estrutura cíclica, sua conformação livre é restrita e a configuração relativa dos grupos -OH tem importância considerável no rendimento de reação.

(b) Nesta segunda etapa, a ligação covalente C-C é quebrada ocorrendo a formação dos grupos aldeídos. No caso de Hib a oxidação leva a clivagem da cadeia em fragmentos

menores e inserção de grupos aldeídos nas pontas (**Figura 3**).

A estrutura de Hib, como já mencionado, é linear, composta por uma molécula de ribose, uma de ribitol e um grupo fosfato (**Figura 1**). O sítio de clivagem mais exposto à oxidação com periodato de sódio é a molécula de ribitol. De fato, análises por ressonância magnética nuclear (RMN) comprovam que o principal ponto de clivagem por oxidação com periodato de sódio localiza-se na molécula de ribitol (RAVENSCROFT *et al.*, 1999). No entanto, existe ainda a possibilidade de ocorrer clivagem na molécula de ribose.

Pelo que foi acima exposto, é necessário haver uma avaliação criteriosa com relação a escolha do tamanho da cadeia de polissacarídeo para desenvolver uma boa resposta imune. Se por um lado, a cadeia deve ser pequena suficiente para induzir respostas de anticorpos TD, promovendo uma relação mais favorável entre as células produtoras de anticorpos, por outro lado, o tamanho do hapteno deve ser suficientemente grande para expressar o epítipo completo no antígeno nativo. Somente uma análise da atividade funcional dos anticorpos anti-polissacarídeo pode indicar qual o tamanho ideal.

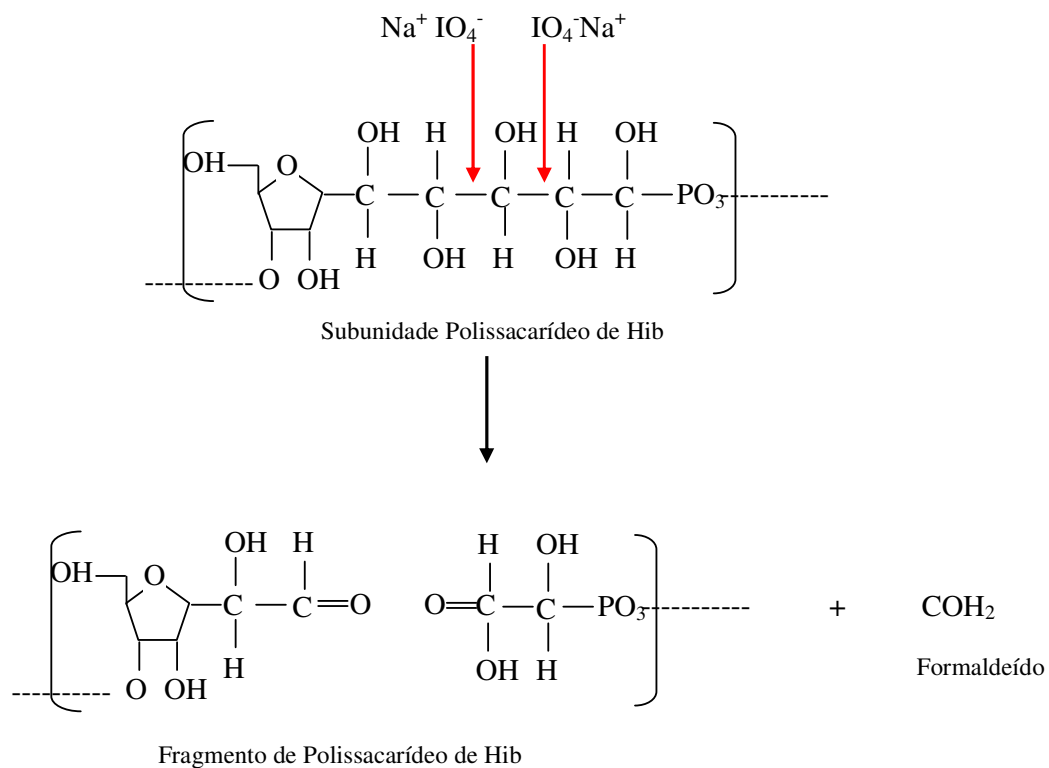


Figura 3: Esquema representativo da oxidação de uma subunidade de polissacarídeo de Hib por metaperiodato de sódio (NaIO_4). O sítio preferencial do agente oxidante localiza-se entre duas -OH adjacentes (seta vermelha). São necessárias 2 moléculas de NaIO_4 para quebrar a ligação C-C e assim, clivar a molécula em fragmentos menores com subsequente inserção do grupo aldeído.

1.7.3 Natureza da proteína carregadora

Carregadores protéicos adequados para conjugação são aqueles que são seguros para administração em mamíferos e imunologicamente efetivos como carregadores. A segurança referida inclui ausência de toxicidade primária, bem como riscos mínimos de complicações alérgicas.

O tamanho da proteína carregadora também pode afetar a imunogenicidade do conjugado de diversas maneiras. Proteínas de alto peso molecular são mais imunogênicas e são usadas rotineiramente como carregadores de peptídeos e haptenos para promover a indução de anticorpos. Uma proteína grande, ou um carregador com múltiplas proteínas, pode potencialmente prover mais epítomos que uma proteína pequena.

Três grupos de proteínas são mais conhecidos e utilizados como carregadores protéicos em vacinas conjugadas. O grupo mais antigo e amplamente aplicado na literatura e indústria farmacêutica corresponde aos toxóides bacterianos, incluindo toxóide tetânico (carregador da vacina PRP-T) e o diftérico (carregador da vacina PRP-TD) (PEETERS *et al.*, 1992; BEUVERY *et al.*, 1983; JENNINGS e LUGOWSKI, 1981). Estas proteínas encontram-se já licenciadas para uso em humanos.

Os toxóides diftérico (TD) e tetânico (TT) preenchem os requisitos necessários para serem bons carregadores, isto é, quando adequadamente preparados, não são tóxicos e a incidência de reações alérgicas está bem documentada.

Outra proteína também muito difundida e que faz parte do grupo dos toxóides é a CRM₁₉₇, que além de ser carregador da vacina HbOC, é também carregadora da vacina 7-valente antipneumocócica produzida pela Wyeth. Esta proteína, uma variante da toxina diftérica geneticamente modificada, tem como principal vantagem não requerer o passo de detoxificação química, simplificando a caracterização e o controle do processo de produção da proteína com menor variabilidade na produção final.

Apesar dos toxóides diftérico e tetânico serem utilizados com sucesso como carregadores, há evidências de que a imunidade pré-existente a eles possa ter um efeito adverso na resposta imunológica – efeito supressor. A desvantagem de se utilizar TT ou TD como carregador tem sido demonstrado por Lieberman e colaboradores (1995) e Donnelly e

Liu (1994). Estes cientistas observaram que a resposta de anticorpo ao hapteno ligado à proteína carregadora pode ser inibida quando os indivíduos estão previamente imunizados com a mesma proteína. Este efeito supressor pode resultar na redução da eficiência da vacina conjugada de polissacarídeo tanto para imunização primária quanto para as aplicações de reforço. Além disso, o processo de detoxificação química destas toxinas bacterianas produz variações nos diferentes lotes. Portanto, as propriedades físico-químicas dos toxóides resultantes podem apresentar inúmeras variações em cada lote, comprometendo a reprodutibilidade do processo de conjugação (PEETERS *et al.*, 1996).

A OMP, usada na vacina PRP-OMP, difere das demais proteínas TD, CRM₁₉₇ e TT na medida em que corresponde a um lipossoma com cerca de 100-200nm de diâmetro (DONNELLY e LIU, 1994), constituída por fosfolípedes, LPS e proteínas, resultantes de evaginações da membrana externa dos meningococos de sorogrupo B. Estas vesículas são extraídas e purificadas de bactérias, empregando-se detergentes que removem a maioria das moléculas de LPS (ZOLLIGER, 1997). Estas propriedades conferem à OMP o efeito adicional na sua atividade de carregador T-dependente.

Com base nas considerações acima, algumas vacinas experimentais tem sido desenvolvidas utilizando carregadores protéicos com base na resposta imune contra a qual poderão complementar de forma sinérgica o papel dos anticorpos anti-polissacarídeo. Um exemplo deste tipo de vacina conjugada é a baseada em antígenos protéicos do próprio microorganismo, ligados covalentemente ao polissacarídeo, como proteínas de *Streptococcus* (pneumolisina – toxina, PspA – proteína de superfície) (CSORDAS, 2005; PAOLETTI *et al.*, 1999), a OMV do sorogurpo B da *Neisseria meningitidis* conjugado ao polissacarídeo do sorogrupo C para uma vacina anti-meningocócica bivalente B/C (FUKASAWA, 2006). Este tipo de vacina ainda não se encontra disponível comercialmente.

O último grupo, também em fase de estudos, tenta minimizar o problema do efeito supressor ao conjugar proteínas como a porina recombinante de *Neisseria meningitidis* sorogrupo B (FUSCO *et al.*, 1998), e fimbria de *Bordetella pertussis* (CROWLEY-LUKE *et al.*, 2001).

1.7.4 Proporção polissacarídeo/proteína

Este item tem um importante papel na habilidade da vacina conjugada em induzir resposta imune. A vacina conjugada deve promover a indução concomitante dos anticorpos anti-proteína e principalmente anti-polissacarídeo.

Grande parte das proteínas carregadoras usadas nas vacinas conjugadas são componentes de outras vacinas obrigatórias, como a DTP. Uma baixa relação polissacarídeo/proteína implica em uma imunização com quantidades mais do que necessária de proteína, podendo ocasionar uma hiper estimulação do sistema imune (ADA e ISAACS, 2003).

Um alto valor da razão polissacarídeo/proteína pode indicar que uma grande quantidade de sacarídeos esteja ligada às proteínas, escondendo epítomos essenciais do carregador do sistema imune e, dificultando, assim, o reconhecimento do conjugado como um antígeno TD (PEETERS *et al.*, 1996). Tais vacinas têm a imunogenicidade reduzida. Este fino balanço da relação polissacarídeo/proteína deve ser determinado através de experimentos em estudos pré-clínicos.

Qualquer que seja o caminho adotado este deve resultar em uma proporção polissacarídeo/proteína suficiente para gerar bom rendimento da conjugação e na reversão da resposta imune contra polissacarídeo de TI para TD.

1.7.5 Presença da molécula espaçadora

Muitos autores optam por introduzir entre a proteína e o polissacarídeo uma molécula espaçadora para uma melhor apresentação do antígeno ao sistema imune. A presença do espaçador molecular diminui o impedimento estérico e aumenta a eficiência do processo da conjugação (PEDERSEN *et al.*, 2006; SEPPALA e MAKELA, 1989; KING *et al.*, 1986).

A diidrazida do ácido adípico (ADH) é talvez a molécula espaçadora mais conhecida e utilizada para este fim. Composta de 6 de carbono e dois grupos hidrazidas (NH₂-NH-), o ADH é uma molécula simétrica (HERMANSON, 1996).

A adição dos grupos hidrazidas em macromoléculas contendo resíduos de aldeído, carboxila ou fosfato tem o efeito de aumentar o pI em proteínas. Devido ao aumento do pI, pode ocorrer um efeito dramático na molécula danificando a conformação e a atividade graças a presença da carga positiva (HERMANSON, 1996; MEANS e FEENEY, 1990). No caso das moléculas contendo aldeídos ou fosfatos, o bloqueio destes resíduos com compostos hidrazidas elimina a carga negativa original do grupo e adiciona uma carga positiva.

A ligação do ADH em macromoléculas pode ocorrer das seguintes maneiras:

- (1) Ligação ADH e -COOH: através da ativação do grupo carboxila por carbodiimida (EDAC) ou através da formação de um intermediário éster ativo usando NHS ou Sulfo-NHS após ativação da carboxila por EDAC. Neste caso ocorrerá formação de ligação imida estável entre o ADH e a proteína (WILCHEK e BAYER, 1987).
- (2) Ligação ADH e aldeído: algumas moléculas podem ser alvo de oxidação por NaIO_4 para criação do terminal aldeído. Neste caso ocorrerá formação da ligação Hidrazona entre o ADH e a proteína ou polissacarídeo (MEANS e FEENEY, 1990, o presente trabalho).
- (3) Ligação ADH e fosfato: a derivatização das moléculas contendo fosfato, como no caso de moléculas de RNA ou DNA, ocorre em duas etapas, na primeira o EDAC ativa o grupo fosfato formando um intermediário fosfodiéster instável, porém muito reativo. Na segunda etapa o intermediário reage com moléculas de imidazol formando uma ligação fosforoimidazol estável (ZANOCCO⁵ *et al.*, 1993 *apud* HERMANSON, 1996); o imidazol é liberado e ocorre a formação da ligação fosforamida.

A ligação hidrazona formada entre hidrazida e um aldeído é uma forma de Base de Schiff muito mais estável que a Base de Schiff formada pela interação de um aldeído e uma amina. Devido a instabilidade da ligação hidrazona, recomenda-se o emprego de agentes redutores que conferem estabilidade à ligação como o cianoboroidreto de sódio (NaCNBH_3) ou boroidreto de sódio (NaBH_4) que possui potencial redutor maior elevando consideravelmente o rendimento da reação (HERMANSON, 1996). A **figura 4** apresenta a ligação de ADH/ácido carboxílico na presença de EDAC e ADH/aldeído através de oxidação prévia (com NaIO_4).

⁵ ZANOCCO, J.; KROHN, R.; SYKALUK, L.; OLSON, B. unpublished observations. Pierce Chemical, 1993.

As carbodiimidas são agentes condensadores usados para mediar a formação da ligação amida ou fosforamida entre um grupo -COOH e uma amina (-NH₂) ou grupo fosfato (-PO₄) e grupo -NH₂ (respectivamente). São chamados “zero-length” porque a formação da ligação não implica em mudanças na conformação química da estrutura. O EDC ou EDAC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida hidrocloreto) é talvez o reagente carbodiimida mais popular usado para conjugação de moléculas de uso em biomedicina (HERMANSON, 1996).

A ativação da proteína com EDAC tem como principal objetivo a ativação do grupo carboxila. A carbodiimida liga-se a -COOH formando um intermediário *O*-acilisouréia muito reativo (eletrofílico) que pode sofrer ataque de uma espécie nucleofílica contendo grupo amina formando o conjugado.

Alguns efeitos colaterais podem ocorrer quando se usa EDAC na presença de proteínas. Além de reagir com carboxilatos, o EDAC também pode formar um complexo estável com os grupos sulfidrilas expostos. Resíduos do aminoácido tirosina podem reagir com EDAC, principalmente através da forma fenolato ionizável da cadeia lateral. Finalmente, o EDAC pode promover a polimerização não desejável graças a abundância usual de aminas e carboxilatos nas moléculas protéicas (HERMANSON, 1996).

O EDAC, apesar de muito eficiente na ativação de carboxilas protéicas, apresenta grande labilidade na presença de meios ácidos (LEI *et al.*, 2002; WROBEL *et al.*, 2002) e de átomos de oxigênio por longos períodos, como encontrado na água (H₂O) (HERMANSON, 1996). Estes últimos podem agir como nucleófilo atacante e levar a hidrólise do EDAC antes da ativação da proteína (HERMANSON, 1996).

O problema da hidrólise pode ser contornado adicionando à reação um éster denominado *N*-hidroxisuccinimida (NHS) ou Sulfo *N*-hidroxisuccinimida (Sulfo-NHS). Estes compostos podem elevar a eficiência da reação de condensação, pois tornam o intermediário *O*-acilisouréia mais estável (SEHGAL e VIJAY, 1994; GRABAREK e GERGELY, 1990; STAROS *et al.*, 1986). A **figura 5** apresenta as reações de formação do intermediário *O*-acilisouréia, a hidrólise do intermediário causada pela água e a reação do intermediário e o agente estabilizador Sulfo-NHS.

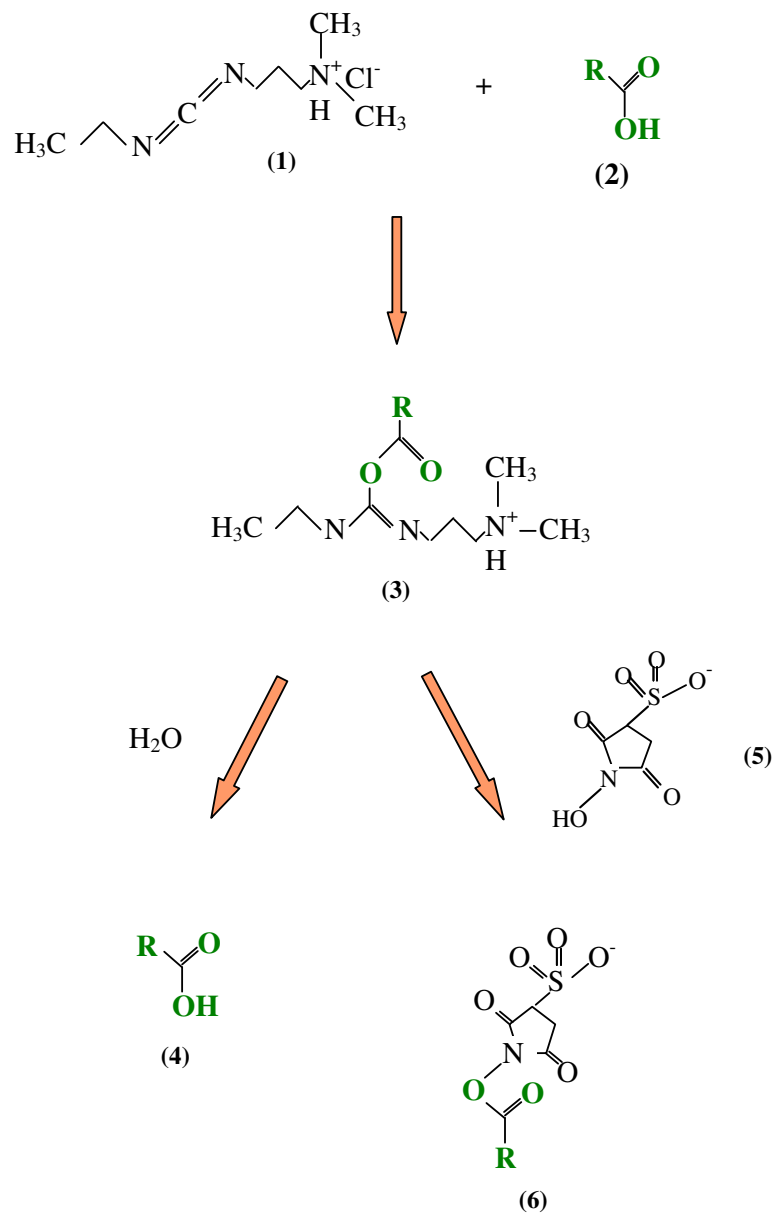


Figura 5: Ativação do grupo carboxílico por carbodiimida. (1) EDAC. (2) Proteína, em evidência o grupo carboxila. (3) Intermediário *O*-acilisouréia formado a partir da reação entre EDAC e grupo -COOH da proteína. (4) Regeneração do grupo carboxila devido a presença de H₂O. (5) Sulfo-NHS. (6) Intermediário éster estável. Este intermediário poderá ser usado para conjugação posterior.

1.8 Descrição do processo de conjugação química das vacinas conjugadas contra Hib

1.8.1 PRP-D – ProHIBiT® (ANEXO C)

A vacina conjugada de PRP e a proteína toxóide (PRP-D) diftérico foi inicialmente desenvolvida por Gordon (1986).

Neste processo o polissacarídeo de Hib tem sua massa molecular (>600kDa) reduzida através de hidrólise térmica (100°C). O produto gerado (massa molecular varia de 2×10^5 a 2×10^6) sofre ativação aleatória com CNBr.

A proteína carregadora (TD), obtida após fermentação da bactéria *Corynebacterium diphtheriae* é detoxificada com formaldeído que inutiliza os grupos de lisinas. Desta forma, a proteína deve ser derivatizada com ADH, na presença de EDAC.

A ligação do polissacarídeo à proteína é realizada pelo método de Aminoação Redutiva com formação da Base de Schiff. Aminoação Redutiva é um método no qual o grupo aldeído ou cetona de um componente reage com o grupo amina ou hidrazida do outro componente da reação de conjugação (HERMANSON, 1996).

A purificação final do conjugado é realizada por cromatografia de exclusão molecular. A estrutura do conjugado, em forma de rede, reflete a natureza polifuncional dos componentes da vacina. O resultado é um conjugado de relação polissacarídeo/proteína igual a 0,7 (FRASCH, 1994).

Em 1987 esta vacina tornou-se o primeiro produto conjugado aprovado e licenciado para uso em crianças maiores de 18 meses de idade. A vacina é distribuída na forma líquida contendo 25ug de PRP conjugado a 18ug de TD, sendo produzida pela Sanofi Pasteur (FRASCH, 1994).

1.8.2 HbOC – HibTiter® (ANEXO D)

Esta metodologia de conjugação desenvolvida por Anderson e colaboradores (1986, 1985, e 1981) envolve a redução da massa molecular inicial da cadeia de PRP por oxidação por metaperiodato de sódio.

Após duas etapas de ultrafiltração tangencial com membranas de corte nominal de 100kDa e 30KDa a molécula de polissacarídeo oxidada exibe, além de resíduos de aldeídos, massa molecular compreendida entre 10 a 30kDa (cerca de 25 subunidades repetitivas).

A proteína carregadora escolhida é uma forma mutante da TD mais conhecida como CRM₁₉₇, cuja massa molecular é 58,4kDa. A escolha por esta proteína recaiu sobre o fato desta não apresentar risco de reversão para sua forma tóxica e para além disto, os resíduos de lisinas encontram-se livres.

O método de conjugação adotado foi a Aminoação Redutiva, através do qual o aldeído do oligossacarídeo deve se ligar às aminas das lisinas. A Base de Schiff formada deve ser reduzida para conferir maior estabilidade ao composto formado, resultando em uma amina alquilada. Os aldeídos que não reagiram são reduzidos com boroidreto de sódio a função álcool.

Novamente a ultrafiltração tangencial é utilizada com membrana de corte nominal de 30kDa retendo a fração conjugada na fração retida.

A vacina, produzida pela Wyeth, é distribuída na forma líquida, cada dose contém 10ug de oligossacarídeo de Hib ligados a 25ug de CRM₁₉₇. A relação oligossacarídeo/proteína encontrada no conjugado é de 2,5. Esta vacina foi licenciada em 1988 e é usada somente para crianças acima de 18 meses de idade (FRASCH, 1994). A partir de 1990 a vacina também foi liberada para crianças de até 6 meses de idade (PLOTKINS, 1994).

A vacina conjugada HbOC é uma versão da vacina PRP-D mais imunogênica. Estudos imunológicos mostraram que a clivagem de PRP por NaIO₄ torna a vacina mais imunogênica (ANDERSON *et al.*, 1989).

1.8.3 PRP-OMP – PedvaxHIB® (ANEXO E)

Outro produto glicoconjugado licenciado é a vacina de PRP-OMP no qual o PRP encontra-se covalentemente acoplado a proteínas da vesícula de membrana externa (OMP) de *Neisseria meningitidis* sorogrupo B. A metodologia desenvolvida por Marburg e colaboradores (1986) é mais trabalhosa e possui mais etapas.

Em linhas gerais, o polissacarídeo passa por uma etapa de hidrólise na presença de ácido oxálico para redução da massa molecular (massa molecular final do polissacarídeo 80kDa). Após hidrólise, a metodologia prevê diversas etapas de ativação dos grupamentos hidroxílicos dos fragmentos do PRP na presença de solventes orgânicos. E por fim, o PRP é derivatizado com cloreto de bromoacetil.

As OMPs são partículas de aproximadamente 100-200nm de diâmetro compostas principalmente de agregados de proteínas e LPS. A massa molecular da OMP é estimada em 3×10^7 a 5×10^7 Da (DONNELLY e LIU, 1994). Para seu emprego nesta vacina, os LPS foram depletados conferindo maior segurança.

A OMP é derivatizada na presença de tiolactona *N*-acetilhomocisteína gerando um intermediário com grupamento tiol, que favorece o estabelecimento de uma ligação tioéster entre o PRP e a OMP.

Em sua formulação final, a vacina PRP-OMP, produzida pela MerckSharp & Dohme, é liofilizada e reconstituída em hidróxido de alumínio. Cada dose contém 15ug de Hib covalentemente ligado a 250ug de OMP. A relação final entre polissacarídeo e OMP é igual a 17. A vacina foi licenciada em 1989 para imunizar somente crianças maiores de 15 meses (FRASCH, 1994).

1.8.4 PRP-T – Hiberix® (ANEXO F)

Esta vacina conjugada de PRP com TT é preparada de acordo com Schneerson e colaboradores (1980). O método de conjugação escolhido basicamente é composto por etapas simples: (1) ativação do polissacarídeo seguido de (2) derivatização e (3) conjugação do PRP

com a proteína na presença de uma carbodiimida.

Assim como a vacina PRP-D, as hidroxilas do polissacarídeo são aleatoriamente ativadas com CNBr seguidamente de derivatização com ADH. O polissacarídeo ativado exibe um grau de derivatização de 4 moléculas de ADH para cada 100 subunidades repetitivas.

O TT foi obtido ao final da fermentação da bactéria *Clostridium tetanii* que após tratamento com formaldeído apresenta massa molecular de aproximadamente 150kDa.

A etapa de conjugação se processa na presença de EDAC. A conjugação propriamente dita se dá após a ligação da carboxila ativada com o grupo hidrazida do espaçador molecular ligado ao PRP. A purificação do conjugado e a remoção dos componentes livres e excesso de reagentes é feita em coluna de exclusão molecular contendo resina Sepharose CL-4B.

A vacina PRP-T é produzida pela indústria GlaxoSmithKline e foi a última vacina conjugada contra Hib lançada em 1993. A vacina é comercializada na forma liofilizada e quando reconstituída com salina (NaCl 0,9%) contém 10ug de polissacarídeo conjugado a 24ug de proteína. A relação polissacarídeo/proteína no conjugado é de 0,5 e devido a natureza de ambos os componentes a estrutura final esperada é o tipo rede (“lattice”) (FRASCH, 1994).

A **tabela 1** apresenta as principais características das vacinas disponíveis comercialmente.

Tabela 1: Vacinas conjugadas de *Haemophilus influenzae* tipo *b*

VACINA	Companhia	Componentes	Ativação de PRP	Método de Conjugação	Formulação final	Idade da 1 ^o dose (meses)*
PRP	Sanofi Pasteur, Wyeth	Polissacarídeo de Hib	nenhuma	nenhum	Polissacarídeo de Hib	24 meses (1985)
PRP-D (ProHIBit)	Sanofi Pasteur	PRP e Toxóide Diftérico	BrCN	Aminação Redutiva	25µg PRP e 18µg TD	18 meses (1987)
HbOC (HibTiter)	Wyeth	Oligossacarídeo e CRM ₁₉₇	NaIO ₄	Aminação Redutiva	10µg oligo PRP e 25µg CRM ₁₉₇	18 (1988) 2 (1990)
PRP-OMP (PedvaxHIB)	MerckSharp&Dhome	PRP e OMP	Ácido Oxálico, BrCH ₂ COCl		15µg PRP e 250µg OMP	15 (1989) 2 (1990)
PRP-T (Hiberix)	GlaxoSmith Kline	PRP e Toxóide Tetânico	CNBr e ADH	Carbodiimida	10µg PRP e 30µg TT	2 meses (1993)

KNISKERN e MARBURG, 1994; FRASCH, 1994; PLOTKIN, 1994.

*Idade ideal para imunização em meses. Entre parênteses a data da liberação para uso em humanos.

A resposta imunológica gerada por estas vacinas de diferentes estruturas é geralmente similar. Por serem conjugadas, todas elas promovem indução de anticorpos TD. A vacina PRP-OMP parece promover uma forte resposta de anticorpo contra Hib após a primeira dose e um efeito de reforço menos pronunciado nas imunizações subseqüentes. Como conseqüência, os anticorpos anti-PRP gerados por esta vacina tendem a ter avides menor, ou melhor, os anticorpos gerados apresentam menos afinidade pelo antígeno em relação as outras vacinas (SCHLESINGER e GRANOFF, 1992).

1.9 Estratégia alternativa para introdução da vacina de Hib em países em desenvolvimento

Em países em desenvolvimento onde há poucos recursos e muita competição entre as prioridades na área de saúde para serem atendidas, o preço das vacinas conjugadas, entre eles a Hib é o maior obstáculo para a introdução da mesma. Uma alternativa para economizar nos custos da vacina seria a exploração das possibilidades do uso fracionado das doses na imunização (WATT *et al.*, 2003; HUEBNER *et al.*, 2002). A imunogenicidade de 1/10 da dose da vacina PRP-T administrada com DTP foi testada na África do Sul e demonstrou resultados semelhantes aos encontrados em vacinas usando a dose normal com 10ug de PRP (HUEBNER *et al.*, 2002).

Outra alternativa, já em prática, é a aplicação da vacina conjugada de Hib conjuntamente com a DPT (difteria-pertussis-tétano) constituindo uma vacina quádrupla DPT-Hib (MALLET *et al.*, 2004; CARLSSON *et al.*, 2000). A combinação de vacinas apresenta diferentes vantagens, incluindo simplificação no programa de imunização e diminuição no número de injeções, espaço para estocagem do produto e lixo contaminado. No entanto, interferências entre os diferentes componentes das vacinas combinadas têm sido observadas, particularmente em vacinas contendo proteína-polissacarídeo e antígenos de pertussis acelular (WATT *et al.*, 2003; JORDENS e SLACK, 1995). Outro tipo de interferência é o efeito supressor induzido pelo carregador protéico. A possibilidade de múltiplas vacinas conjugadas usarem a mesma proteína carregadora poderia resultar na diminuição da imunogenicidade (HUEBNER *et al.*, 2002).

1.10 Cenário atual da vacina de Hib no Brasil

Atualmente em muitos países, inclusive no Brasil, a vacina contra Hib faz parte do programa de vacinação infantil sendo que o calendário estabelecido para a grande maioria dos países, prevê um esquema de imunização com 3 doses (JORDENS e SLACK, 1995).

O esquema nacional de imunização é constituído de 3 doses da vacina a cada 2 meses de intervalo (em crianças abaixo de 1 ano). Este esquema não inclui um reforço após 12 meses. Crianças de 12 a 23 meses recebem apenas 1 dose (site MS).

No Brasil, o Ministério da Saúde (MS) incluiu a vacina contra Hib no Calendário Nacional de Imunização, junto com a vacinação do DPT. O DPT é fornecido pelo Instituto Butantan e a vacina Hib, através de um acordo com a GlaxoSmithKline – Biomanguinhos (FIOCRUZ) é fornecida em bulk (antígeno concentrado) e embalado pela Biomanguinhos. Neste acordo a transferência de tecnologia deve ocorrer em médio prazo. Hoje, a vacina custa U\$2,7 a dose para o MS.

Dados do IBGE mostram que por ano nasce um pouco menos de 4 milhões de crianças (site do IBGE), sendo, desta forma, necessária a produção de 12 milhões de dose/ano, já incluídas as 3 doses obrigatórias o que atenderia a demanda nacional.

O Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan iniciou há menos de 10 anos, pesquisas para cultivo de *H. influenzae* tipo **b** (TAKAGI, 2003) e de purificação do polissacarídeo, visando o desenvolvimento da vacina conjugada de menor custo. Atualmente o Centro de Biotecnologia está em fase de escalonamento do processo inicialmente descrito por Takagi (2003) no qual o rendimento do processo do cultivo em batelada de *H. influenzae* era de $(85\text{mg/L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1})$. Estudos para eliminação da etapa de precipitação com etanol na fase de purificação estão sendo feitos. Este trabalho é a continuidade dos estudos desenvolvidos por Takagi para a produção da vacina que deve ser agregada ao DPT já produzida pelo Instituto.

2 OBJETIVOS

1- Obtenção de uma vacina conjugada de polissacarídeo capsular de *Haemophilus influenzae* tipo **b** (Hib) e Toxóide Tetânico (TT) como carregador protéico.

2- Estudar as variáveis envolvidas no processo de conjugação de forma a otimizá-las quanto à eficácia como antígeno vacinal e rendimento do processo.

3- Caracterização física, química e imunológica dos conjugados obtidos.

4- Estudar a ampliação de escala do processo de conjugação desenvolvido, visando a produção da vacina no Instituto Butantan.

3 JUSTIFICATIVA

A bactéria *Haemophilus influenzae* tipo **b** é um microrganismo importante causador de meningite bacteriana e outros casos severos de infecções respiratórias como pneumonia e bacteremia, principalmente em crianças menores de 5 anos de idade.

Desde 1999, o Ministério da Saúde (MS) incluiu a vacina conjugada no calendário básico de vacinação infantil de forma rotineira. Este ano marcou também o início da produção da vacina Hib através de um acordo firmado entre a Fundação Fiocruz e a empresa belga fabricante da vacina conjugada (Hiberix® PRP-TT) GlaxoSmithKline Biologicals (GSK). Neste acordo, haveria transferência de tecnologia de fabricação para a BioManguinhos de forma gradativa cuja etapa inicial seria a produção da vacina a partir de “bulk” (antígeno concentrado) importado da Bélgica. Em 2001, o Instituto Butantan passou a fornecer a vacina tripla bacteriana DTP (Difteria-Tétano-Pertussis) que em conjunto com a vacina Hib constitui uma vacina quádrupla. Ainda hoje o custo total da vacina Hib para o MS é por volta de U\$8,2 por criança imunizada, já inclusa as 3 doses para completa proteção.

Devido a parceria já realizada, a Fundação FioCruz é responsável pela produção da vacina Hib fornecida para os postos de saúde nacional. No entanto, os países latino americanos encontram-se ainda muito deficientes na produção de imunobiológicos constituindo, portanto, um grande mercado a ser abastecido. O Instituto Butantan na qualidade de centro de excelência de produção de imunobiológicos reconhecido mundialmente, adiantou-se às necessidades desses países e visa a produção e distribuição de uma vacina quádrupla composta pelas vacinas DTP, Hepatite recombinante (desenvolvida com tecnologia nacional) e Hib.

Desta forma, é muito importante estudar os processos de conjugação já existentes, cujo rendimento normalmente é muito baixo, para desenvolver então um novo processo químico de conjugação inovador que permita um rendimento maior mantendo a mesma eficácia imunológica das vacinas já disponíveis.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção de polissacarídeo de Hib

O polissacarídeo de Hib usado ao longo de todo o projeto foi gentilmente cedido pelo Laboratório de Bioprocessos do Instituto Butantan. O estudo para produção e purificação de polissacarídeo capsular de Hib foi determinado por Takagi (2003) no qual a melhor condição de cultivo da bactéria *Haemophilus influenzae* tipo b foi em batelada alimentada com meio suplementar composto de glicose com extrato de levedura. Nesta condição o rendimento final de polissacarídeo foi de 2,4g/L.

A etapa de purificação foi baseada em estudos anteriores realizados com cultivo de bactérias encapsuladas *Neisseria meningitidis* e *Streptococcus pneumoniae*. Algumas modificações foram necessárias para adaptação do protocolo de purificação. Brevemente, após o cultivo, o sobrenadante da cultura é concentrado e clarificado por membrana em espiral de corte nominal de 100kDa, fracionado com etanol para eliminação de DNA e substâncias coloridas presentes no meio e precipitado para separação de PRP. Em seguida, nucleases e proteases são adicionadas para digestão de ácidos nucleicos e proteínas contaminantes. A remoção destes contaminantes é realizada por ultrafiltração tangencial e nesta etapa adiciona-se detergente para eliminação de lipopolissacarídeos (LPS).

O polissacarídeo purificado passa então por análises para caracterização físico-químicas que demonstram que o PRP purificado atendeu às exigências requeridas pela OMS. O PRP final apresenta massa molecular de 400kDa.

Processo de conjugação

Dos métodos de conjugação química disponíveis, citados no capítulo Introdução, todos apresentam dois pontos em comum: são eficientes em promover uma resposta TD contra o polissacarídeo, contudo o rendimento de reação é muito baixo encarecendo a produção de uma vacina conjugada.

O trabalho apresentado pretende desenvolver tecnologia inovadora visando obter uma vacina conjugada com alto rendimento de reação mantendo as mesmas características imunológicas encontradas nas vacinas disponíveis no mercado. Para tanto alguns ensaios com o Método de Aminoação Redutiva foram realizados e serviu para verificação da inviabilidade deste método bem como para comparação com o método desenvolvido (Método Hidrazona).

4.1 Método Hidrazona de conjugação

O conjugado PRP-ADH-TT foi obtido empregando-se PRP ativado e TT ativado ligados entre si pela presença do espaçador molecular (ADH).

4.1.1 Ativação do polissacarídeo capsular

4.1.1.1 Oxidação de PRP com metaperiodato de sódio

A oxidação de PRP seguiu o protocolo proposto por Hermanson (1996). O material de partida, 10mg/mL de PRP nativo, foi oxidado com 10mM de metaperiodato de sódio (NaIO_4 -Sigma) por 30 minutos no escuro. A reação foi interrompida com a adição de 100 μL de glicerol (USB) por mL de reação. O excesso de reagente (NaIO_4 e glicerol) foi removido por resina Sephadex G-25 (GE Healthcare). A massa molecular obtida foi determinada por cromatografia de filtração em gel usando coluna Sephacryl S-400 (GE Healthcare). PRP oxidado foi denominado PRPoxi.

4.1.1.2 Derivatização de PRPoxi

A derivatização de PRPoxi também foi de acordo com Hermanson (1996). Acrescentou-se ao PRPoxi um excesso de 50 vezes de diidrazida do ácido adípico (ADH-Sigma) em relação a aldeído (mol/mol). Após 4 horas de reação em temperatura ambiente (25°C) e sob agitação lenta, 10µL de uma solução de borohidreto de sódio (NaBH₄-Sigma) 5M em hidróxido de sódio (NaOH-Nuclear) 0,2% por mL de reação foram adicionados a amostra para estabilização do complexo. O pH da reação foi monitorado e mantido em 7 com adição de uma solução de ácido clorídrico (HCl-Nuclear) 1M.

O excesso de reagente (ADH, NaBH₄) foi removido por coluna de filtração em gel contendo resina Sephadex G-25. O monitoramento de polimerização foi realizado em resina Sephacryl S-400. O PRP derivatizado foi denominado PRP-ADH.

4.1.2 Toxóide Tetânico

A proteína estudada para ser carregadora do polissacarídeo de Hib na vacina conjugada foi o toxóide tetânico (TT). A proteína foi gentilmente cedida pela Laboratório de Vacinas Anaeróbias do Instituto Butantan.

4.1.2.1 Reação de ativação da proteína Toxóide Tetânica

À proteína TT (1mg/mL) foi adicionada 1M de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDAC-Sigma) e 5mM de Sulfo *N*-hidroxisuccinimida (Sulfo-NHS), a reação seguiu em temperatura ambiente (25°C) por 15 minutos. O pH da reação foi monitorado e mantido em 8 com adição de uma solução de ácido clorídrico (HCl-Nuclear) 1M. Além disso, o monitoramento de polimerização foi realizado em resina Sephacryl S-400.

4.2 Reação de conjugação de PRP-ADH com TT

O PRP-ADH (1mg/mL dissolvido em tampão fosfato de sódio (Na_2HPO_4 -Sigma) 0,1M, cloreto de sódio (NaCl-Nuclear) 0,15M pH8 foi adicionado ao toxóide tetânico previamente ativado com EDAC (1mg/mL dissolvido no mesmo tampão) ativado. A reação foi mantida por 24h sob agitação lenta a 4-8°C. O pH da reação foi monitorado e mantido em 8 com adição de uma solução de ácido clorídrico (HCl-Nuclear) 1M.

A **figura 6** apresenta o fluxograma do Método Hidrazona desenvolvido.

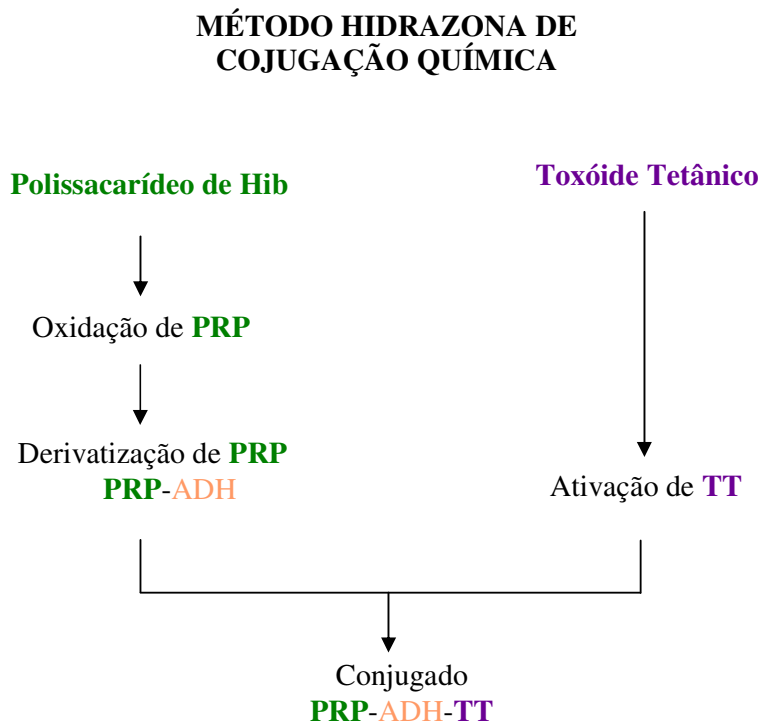


Figura 6: Fluxograma do Método Hidrazona. O método é constituído por 2 etapas: ativação de PRP (oxidação e derivatização de PRP) e ativação de TT. O conjugado PRP-ADH-TT é obtido após ligação covalente entre PRP-ADH e TT.

4.3 Caracterização física e química do conjugado PRP-ADH-TT

4.3.1 Determinação da concentração de PRP

A determinação da concentração de PRP foi feita de acordo com Ashwell (1957). Alíquotas de 750 µL de amostras de PRP, fazendo-se diluições quando necessário, foram distribuídas em tubos de ensaio. Em seguida 1,5 mL de cloreto férrico (FeCl₃-Sigma) a 0,05% (preparado em HCl concentrado-Nuclear) e 100 µL de solução de orcinol (Sigma) 0,6% (preparado em Etanol 95% GL-Nuclear) foram adicionados à amostra. A mistura foi homogeneizada e aquecida em banho a 100°C por 25 minutos.

A concentração da ribose foi determinada medindo-se a absorbância da amostra no comprimento de onda de 668nm e comparada com uma curva padrão feita com ribose (1,5µg a 18µg). De acordo com a fórmula estrutural do PRP, a concentração de ribose determinada por este método foi multiplicada por um fator de 2,5 para obter a concentração de PRP da amostra.

4.3.2 Determinação de proteína - Método de Bradford

Devido a interferência de EDAC no método de Lowry (KUMAR *et al.*, 2005) o doseamento de proteína foi realizado através do método de Bradford (1976).

Este ensaio foi realizado em placas de Elisa com poços de fundo chato. Em cada poço foi adicionado 150µL de amostra a ser dosada e em seguida adicionou-se 150µL de reagente de Bradford (Pierce). A placa foi incubada por 10 min a temperatura ambiente (25°C) e a leitura realizada em leitor de Elisa no comprimento de onda de 595nm. A curva padrão foi determinada empregando-se albumina sérica bovina (BSA-Pierce) em concentrações compreendidas entre 25 a 150µg/mL.

4.3.3 Determinação de ADH

A concentração de ADH presente no PRP-ADH foi determinada pelo método do ácido 2,4,6-trinitrobenzenesulfônico (TNBS-Pierce) descrita por Qi e colaboradores (1988) com algumas modificações.

Neste ensaio, 0,5 mL das amostras aliqüotadas em tubos de ensaio foram incubadas com 0,5 mL de uma solução saturada de borato de sódio (PharmaciaBiotech) pH 8 por 5 minutos à temperatura ambiente (25°C). Em seguida, foram adicionados 0,5 mL de uma solução de TNBS a 0,2% (v/v), deixando-se incubar por 30 minutos à temperatura ambiente no escuro.

A absorbância foi lida a 540nm e a curva padrão foi determinada empregando-se ADH (Sigma) em concentrações variando entre 5µg a 60µg. A concentração das amostras foi calculada através da curva padrão, considerando-se o fator de diluição.

Esta metodologia permite dosar somente os grupos hidrazidas (NH₂NH-) livres presentes na amostra. Após derivatização, somente um dos grupos hidrazidas liga-se ao polissacarídeo deixando o outro grupo livre que será dosado. No entanto, a curva padrão é realizada com ADH no qual ambos os grupos hidrazidas estão livres e, portanto apresentam maior concentração de hidrazida que o PRPderi. Sendo assim, para o cálculo correto do grau de derivatização do PRP, considerou-se um fator de correção (X2) ao final.

4.4 Purificação do conjugado

4.4.1 Cromatografia por exclusão molecular

O primeiro método testado para separar o conjugado dos reagentes não conjugados foi a cromatografia por exclusão molecular Sephacryl S-400 (1,6cmX100cm) cuja faixa de separação para dextrans é 1×10^4 a 2×10^6 Da e para proteínas é 2×10^4 a 8×10^6 Da. O fluxo de trabalho foi de 0,6mL/min e como fase móvel foi utilizado o tampão Na₂HPO₄ 0,1M, NaCl

0,15M pH 8. As frações (3mL) foram coletadas em tubos e dosadas para detecção de PRP e TT.

A constante de distribuição (Kd) das amostras foi determinada de acordo com a equação abaixo:

$$Kd = \frac{(Ve - Vo)}{(Vf - Vo) - Ve}$$

onde:

Vo= volume de morto e eluição do Blue Dextran;

Ve= volume de eluição da amostra;

Vf= volume final e eluição da Riboflavina

A resina Sephacryl S-400 foi calibrada (**ANEXO G**) com os padrões de dextran (229kDa, 90kDa, 40kDa e 10kDa).

O rendimento de conjugação foi calculado a partir da sobreposição dos picos obtidos de PRP e TT.

4.4.2 Cromatografia de troca iônica

Para cromatografia de adsorção a coluna XK2,6 com resina de troca iônica Q-Sepharose f.f. (GEHealthCare) (2,6cmX15cm) foi montada para testar a separação do conjugado PRP-ADH-TT dos componentes não conjugados. O fluxo de trabalho foi de 5mL/min. A resina foi equilibrada com 5 volumes de coluna (VC) com tampão A, após a entrada da amostra a coluna foi reequilibrada com 5 VC do mesmo tampão, sendo o “flow through” e o reequilíbrio coletados na mesma fração. Seguiram-se etapas de eluição com 5VC com 25% tampão B, uma etapa com gradiente linear de 25% a 70% de tampão B e uma última etapa de eluição com 100% de tampão B. Todas as corridas estiveram sob controle do sistema automatizado ÄKTAexplorer® (Amersham Pharmacia Biotech) com o software Unicorn v.3.12. Todas as frações coletadas foram dosadas para detecção de PRP e TT.

Os tampões de corrida foram:

- ❖ Tampão A: Tris HCl (USB) 25mM pH7,
- ❖ Tampão B: Tris HCl (USB) 25mM, NaCl (Nuclear) 1M pH 7.

4.4.3 Cromatografia por interação hidrofóbica

Para cromatografia de adsorção a coluna XK2,6 com resina de interação hidrofóbica Phenyl Sepharose (GEHealthCare) (2,6cmX15cm) foi montada para testar a separação do conjugado dos componentes não conjugados. O fluxo de trabalho foi de 5mL/min.

A resina foi equilibrada com 5 volumes de coluna (VC) com tampão A, após a entrada da amostra a coluna foi reequilibrada com 5 VC do mesmo tampão, sendo o “flow through” e o reequilíbrio coletados na mesma fração. A eluição foi feita através de um gradiente linear decrescente de sulfato de amônio seguido de uma etapa de lavagem (5VC) com tampão B. Seguiram-se 2 etapas de eluição (5VC cada) com isopropanol 15% e 30%.

Todas as corridas estiveram sob controle do sistema automatizado ÄKTAexplorer® (Amersham Pharmacia Biotech) com o software Unicorn v.3.12.

Os tampões de corrida foram:

- ❖ Tampão A - sulfato de amônio (0,7M, fosfato de sódio (Sigma) 20mM, pH 7
- ❖ Tampão B - fosfato de sódio (Sigma) 20mM, pH7,
- ❖ Solução de isopropanol (Nuclear) 15%,
- ❖ Solução de isopropanol (Nuclear) 30%.

4.4.4 Ultrafiltração Tangencial

Foi empregado o sistema Labscale® (Millipore) com membrana tipo cartucho de corte nominal de 5 kDa para purificação de PRPoxi ou PRP-ADH e membrana de 100kDa para

purificação do conjugado. Os cartuchos utilizados são do tipo Pelicon XL com área de 50cm² que foram equilibrados o mesmo tampão que a solução a ser concentrada. A amostra foi concentrada em uma velocidade de filtrado de 0,013mL/min/cm² sob pressão de entrada e saída variando entre 20 a 30 psi. Após a concentração a amostra foi lavada 6X com o mesmo tampão de equilíbrio.

4.5 Análise imunológica da resposta imune induzida pelo conjugado PRP-ADH-TT

4.5.1 Antígenos vacinais e esquema de imunização em camundongos

Cada dose da vacina de PRP-ADH-TT foi diluída para que contivesse 1µg de PRP-ADH ligado covalentemente a 3 µg de TT (o equivalente a 1/10 da dose administrada em crianças) e 10µg de hidróxido de alumínio (AlOH₃) em volume final de 0,5mL. A vacina Hiberix® foi usada como controle positivo. Grupos de 10 camundongos receberam, por via intraperitoneal, 3 doses das preparações com intervalo de 15 dias entre as doses:

- ❖ Grupo 1- salina (NaCl 0,9%)
- ❖ Grupo 2 – PRP-ADH
- ❖ Grupo 3 – PRP-ADH-TT
- ❖ Grupo 4 – Hiberix

A sangria dos animais foi realizada por via retro-orbital 15 dias após cada imunização. Os soros foram reunidos, por grupo, em “pool” e estocados a –20°C.

Vacina Hiberix

A vacina Hiberix, usada como controle positivo, é fabricada pela GlaxoSmithKline (GSK). Nesta vacina, o polissacarídeo de Hib é preparado a partir do Hib, cepa 20.752 e, após ativação com brometo de cianogênio e derivatização com um separador molecular (ADH), é

combinada ao toxóide tetânico através de condensação com carbodiimida. Após purificação, o conjugado é liofilizado em presença de lactose como estabilizador.

A vacina Hiberix atende aos requisitos da Organização Mundial de Saúde (OMS) para fabricação de substâncias biológicas e de vacinas conjugadas Hib. A vacina Hiberix é apresentada em um frasco ampola monodose e diluente (NaCl 0,9%) em um frasco ampola (0,5mL). Cada dose de vacina reconstituída (0,5mL) contém 10µg de polissacarídeo capsular purificado (PRP) covalentemente ligado a aproximadamente 30µg de toxóide tetânico (TT). Após reconstituição com o diluente estéril, a vacina deve ser administrada via intramuscular.

Esta vacina foi escolhida como controle positivo, uma vez que apresenta os mesmos componentes na formulação final (PRP, ADH e TT). No entanto, o método de conjugação química adotado pela companhia fabricante é o método do Brometo de Cianogênio.

4.5.2 Antígenos vacinais e esquema de imunização em cobaias

Cada dose da vacina de PRP-ADH-TT foi diluída para que contivesse 10µg de PRP-ADH conjugado covalentemente ao TT e 25µg de hidróxido de alumínio (Al(OH)₃) em volume final de 0,5mL.

Grupos de 5 cobaias receberam, por via subcutânea, 3 doses das preparações em intervalo de 28 dias entre as doses:

- ❖ Grupo 1- salina (0,9% NaCl)
- ❖ Grupo 2- PRPoxi
- ❖ Grupo 3- PRPoxi + TT (coadministrado)
- ❖ Grupo 4- Hiberix®
- ❖ Grupo 5- Conjugado PRP-ADH-TT (conjugado 1)
- ❖ Grupo 6 – Conjugado PRP-ADH-TT (conjugado 2)

A sangria dos animais foi realizada por punção cardíaca 28 dias após cada imunização. Os soros foram reunidos, por grupo, em “pool” e estocados a -20°C.

4.5.3 Determinação dos anticorpos IgG totais anti-PRP e anti-TT.

Os anticorpos IgG anti-PRP e anti-TT foram determinados por ELISA segundo método descrito por Vella (1994).

Para determinação de anticorpos anti-PRP, o “coating” das placas ELISA (Nunc Immunoplate Maxisorp) foi feito com 100µl por cavidade de uma solução de 100 µg/mL de PRP nativo em tampão bicarbonato de sódio (Merck) 0,05M pH 9,5 e incubadas a 4°C por 48h.

Para determinação de anticorpos anti-TT, o “coating” das placas foi feito com 100µl por cavidade de uma solução de 5,0µg/mL de toxóide tetânico em tampão bicarbonato de sódio (Merck) 0,05M pH 9,5 e incubadas por 16-18 horas a 4-8°C.

No dia seguinte as placas foram lavadas 3 vezes com tampão fosfato-salina (PBS) pH 7,2 contendo Tween 20 (Synth) a 0,05% (v/v) e bloqueadas com 100µl por cavidade de uma solução de PBS + 1% albumina sérica bovina (Sigma) (p/v) por 1hora a 37°C. Uma nova lavagem com PBS + 0,05% Tween 20 pH 7,2 (PBST) foi realizada.

Em seguida procedeu-se a diluição seriada (razão 2) do soro de interesse. Os soros foram diluídos em PBS e incubados por 2 horas a 37°C com 100µl por cavidade (em duplicata). A seguir, as placas foram lavadas 3 vezes com PBST e incubadas com 100µl por cavidade de uma solução contendo anti-IgG de cobaia (Sigma) (no caso de soro de cobaia) ou anti IgG de camundongo (Sigma) (para soros de camundongo) conjugado à peroxidase (Sigma) diluído (1:10.000) em PBST. Na etapa final, as placas foram lavadas 3 vezes com PBST e incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente com 100µl por cavidade de uma solução de 400 µg/mL de orto-fenilenediamina (Sigma) e 0,5 µl/mL de peróxido de hidrogênio a 30% em tampão de citrato de sódio 0,1M, fosfato de sódio monobásico 0,2M pH 5,0. A atividade enzimática foi bloqueada com ácido sulfúrico 8N (50µl por cavidade) e a absorbância lida a 492nm em um leitor de ELISA (Titertek Multiskan MCC/340, Labsystems).

4.5.4 Determinação do índice de avidéz do anticorpo anti-PRP-ADH

O índice de avidéz (IA) do anticorpo anti-PRP-ADH foi determinado por ELISA. O procedimento foi o mesmo empregado para a determinação de anticorpos IgG anti-PRP-ADH descrito no item anterior. A única modificação consistiu na etapa de incubação das placas com os soros dos animais imunizados. Nessa etapa, os soros (em duplicata) foram diluídos em tampão PBS ou em PBS contendo tiocinato de potássio (KSCN) a 1,5M. Os soros em teste foram incubados na ausência e na presença de KSCN. O índice de avidéz foi calculado de acordo com Perciani e colaboradores (2007).

O seguinte critério foi estabelecido para a avaliação da avidéz dos anticorpos anti-PRP, de acordo com Chakerian e colaboradores (2001):

Índice de avidéz	Interpretação
acima de 0,50	anticorpos com alta avidéz
entre 0,3 – 0,49	anticorpos com avidéz intermediária
abaixo de 0,29	anticorpos de baixa avidéz

4.6 Análise Estatística

Todos os títulos de anticorpos IgG determinados por ELISA e os índices de avidéz foram analisados estatisticamente pelo teste Mann Whitney, utilizando-se um nível de significância $p < 0,05$.

4.7 Teste de estabilidade acelerada

As vacinas PRP-ADH-TT e Hiberix, ambas liofilizadas, foram submetidas a 5 diferentes temperaturas (-20°C, 4°C, 25°C, 37°C, 50°C) de estocagem por 10 semanas. A cada semana uma amostra de cada grupo foi ressuspensa em tampão fosfato de sódio 0,1M, NaCl 0,15M, azida 0,02% pH7 e analisada por HPLC (CUERVO *et al.*, 2007; BOLGIANO *et al.*, 2001).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estabelecimento de um protocolo para conjugação de polissacarídeo capsular de *H. influenzae* tipo b com toxóide tetânico.

Para o estabelecimento do protocolo de conjugação do PRP com TT, foi necessário verificar a viabilidade de um dos três principais métodos descritos para conjugação de PRP com proteína: i) método do Brometo de Cianogênio, ii) o método da Carbodiimida, iii) o método da Aminoação Redutiva. O método do Brometo de Cianogênio seria passível de ser utilizado. Contudo, devido às dificuldades de manipulação do CNBr decorrentes da sua toxicidade e instabilidade (é facilmente oxidável), foi rejeitado. O método da Carbodiimida que se baseia na ativação de carboxilas de macromoléculas por carbodiimida foi igualmente rejeitado, pois não há carboxila na estrutura do PRP. O método da Aminoação Redutiva emprega a ligação de um grupo aldeído do polissacarídeo a um grupo amina da lisina da proteína, na presença de um agente redutor, o cianoboroidreto de sódio (CNBH₃Na). Este foi o primeiro método que testamos neste trabalho.

A toxina tetânica, após o término do processo fermentativo, passa por uma etapa de detoxificação com a adição de formaldeído sendo o produto final deste processo conhecido como toxóide tetânico (TT). Com este tratamento, os resíduos de lisinas que poderiam ser utilizados para reação de conjugação pelo método de Aminoação Redutiva ficam inviabilizados. A produção convencional de TT no Instituto Butantan tem a reação de detoxificação interrompida pela adição de excesso de glicina. A reação entre o formol e a glicina é mais desfavorecida do que a reação do formol com a lisina. Como consequência, a extensão de modificações das lisinas da toxina é maior do que o mínimo necessário para a inativação.

Para que pudessemos testar o método da Aminoação Redutiva o setor de produção de Vacinas Anaeróbias do Instituto Butantan produziu um lote especial de TT no qual a reação de detoxificação foi interrompida por adição de lisina e não glicina com objetivo de preservar mais resíduos de lisinas. Todos os testes necessários para garantir a segurança do produto foram realizados para que não houvesse risco de reversão do toxóide para sua forma tóxica. A

análise do conteúdo de aminoácidos do lote especial e do lote convencional realizado pelo Dr. Ivo Lebrun do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan mostrou que o lote especial de TT apresentava cerca de 30% de resíduos de lisinas livres em relação ao lote convencional (resultado não mostrado).

Dado a existência de inúmeros dados bibliográficos que descrevem exhaustivamente diversos estudos sobre este método (LAFERRIÈRE *et al.*, 1997; HERMANSON, 1996; KNISKERN e MARBURG, 1994; SCHNEERSON *et al.*, 1980), não foi necessário procedermos à otimização do mesmo. Assim sendo, optamos pela seguinte condição de reação:

- 5mg PRP oxidado (1mg/mL)
- 5mg TT (1mg/mL)
- 10mg NaBH₃CN
- tampão Na₂HPO₄ 100mM, NaCl 150mM, pH8
- 25 dias de reação à 8°C.

Após 25 dias de reação a purificação do conjugado foi feita em coluna de gel filtração (Sephacryl S-400) e resultou em um rendimento de 13,5%±0,94 de PRP ligado a proteína (média de 3 experimentos).

O baixo rendimento obtido sugere que o TT testado como carregador do polissacarídeo, apesar de apresentar 30% mais lisinas disponíveis em comparação ao TT do lote convencional, provavelmente apresenta estas lisinas em uma posição inadequada dificultando a reação de conjugação. Por esta razão, o método de Aminoação Redutiva não é normalmente utilizado com proteínas como toxóides (tetânico ou diftérico) e corrobora com os resultados por nós encontrados. Sendo assim, foi necessário procurarmos por outro método mais eficiente.

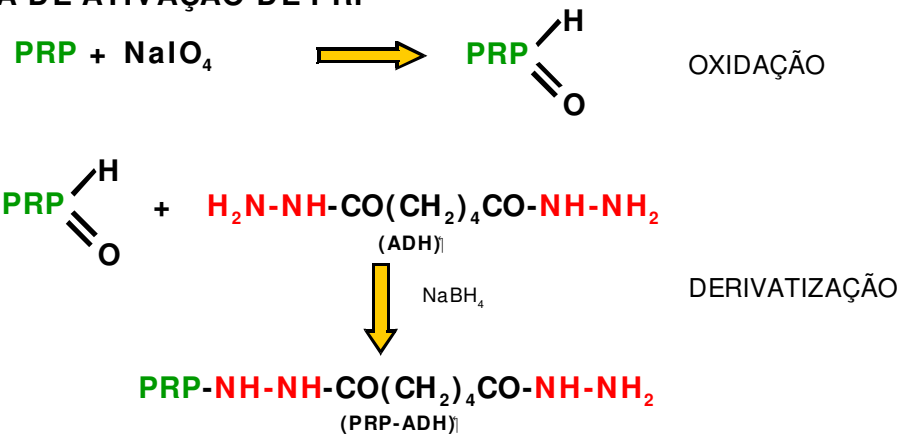
5.1 Desenvolvimento de um novo método de conjugação – Método Hidrazona

A formação da ligação hidrazona tem sido usada em estudos bioquímicos para preparar conjugados de glicoproteínas ligadas a outras proteínas ou peptídeos (WOLFE e HAGE, 1995; KING *et al.*, 1986). Nestes estudos as glicoproteínas são oxidadas química ou enzimaticamente para geração de grupos aldeídos e então acopladas a compostos de baixo peso molecular contendo grupos hidrazidas. Esta metodologia também é amplamente aplicada para obtenção de enzimas conjugadas para uso em imunoenaios (ELISA) (BASU *et al.*, 2003; HERMANSON, 1996). O nosso laboratório foi o primeiro a utilizar este método para a obtenção de vacina conjugada.

Esses compostos contendo grupos hidrazidas ($\text{NH}_2\text{-NH-}$) reagem facilmente com grupos funcionais como aldeído ou cetona em moléculas alvo. A reação da hidrazida com ambos os grupos leva a formação da ligação hidrazona – um tipo de Base de Schiff (HERMANSON, 1996). A dupla ligação pode reagir com agentes redutores tais como cianoboroidreto de sódio (NaBH_3CN) ou borohidreto de sódio (NaBH_4) e formar uma ligação covalente estável.

O desenvolvimento de uma nova metodologia de conjugação de polissacarídeo e proteína consistiu na adaptação do protocolo descrito por Hermanson (1996): 1. Etapa de ativação do PRP e ligação PRP-ADH, 2. Reação entre o PRP ativado e a proteína (**Figura 7**).

1- ETAPA DE ATIVAÇÃO DE PRP



2- ETAPA DE CONJUGAÇÃO

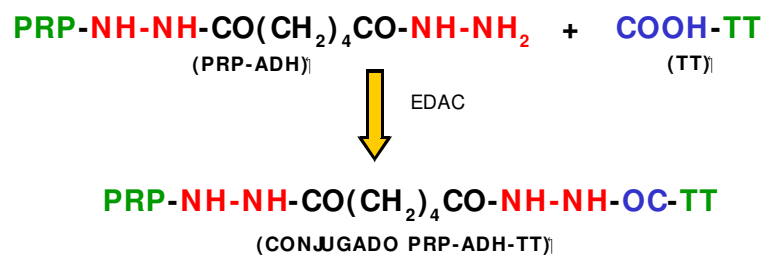


Figura 7: Esquema de conjugação pelo Método Hidrazona. **1ª Etapa** – Ativação do PRP por oxidação (introdução de um aldeído terminal) seguido de derivatização com uma molécula contendo grupo hidrazida. **2ª Etapa** – Conjugação do PRP-ADH com toxóide tetânico (TT) na presença de *N*-etil-*N'*- (dimetilaminopropil) carbodiimida (EDAC).

5.1.1 Ativação de polissacarídeo capsular de Hib

A ativação de PRP é composta de duas sub-etapas sendo a primeira a inserção do radical aldeído na molécula. A ativação do PRP é completa após a etapa de derivatização, que consiste na introdução de um espaçador molecular.

5.1.1.1 Oxidação de PRP Hib

A primeira metodologia testada para clivagem de PRP foi a hidrólise com ácido acético, através da qual é possível quebrar a cadeia do PRP entre o átomo de oxigênio e o átomo de fósforo do grupo fosfato deixando a extremidade do grupo fosfato livre (POPA e SPIRIDON, 1998).

Após análise de diversos parâmetros envolvidos nesta reação, observamos que uma reação de 3h a 80°C em presença de 1M de ácido acético correspondia às melhores condições para gerar cadeias de PRP com cerca de 6,7 kDa de massa molecular final (dados não apresentados) e uma ponta livre (grupo fosfato) que poderia ser usada para conjugação posterior.

Grupos fosfatos, como aqueles presentes em moléculas de DNA ou RNA, podem ser especificamente modificados com compostos hidrazínicos e conjugados a carregadores protéicos (HERMANSON, 1996). Contudo, a conjugação através da hidroxila do grupo fosfato pode gerar um ácido fosfórico tri-substituído que é uma molécula instável (KNISKERN e MARBURG, 1994). Desta forma, a clivagem da molécula por hidrólise ácida foi descartada.

A oxidação com NaIO₄ tem por consequência a clivagem da cadeia do PRP entre duas hidroxilas vicinais dependendo da concentração de oxidante empregada (HERMANSON, 1996). Desta forma ocorre a introdução de 2 resíduos de aldeídos terminais (**Figura 3**). De acordo com a estequiometria da reação, são necessários 2 moles de NaIO₄ para oxidar 1 mol de PRP gerando 2 moles de aldeído (POPA e SPIRIDON, 1998). Com o objetivo de otimizar o protocolo de oxidação por metaperiodato de sódio, foram testadas diferentes condições de oxidação variando a concentração de PRP e tempo. Somente a concentração de NaIO₄ foi mantida fixa em 10mM (**Tabela 2**).

A **tabela 2** apresenta um perfil comparativo das condições de oxidação testadas. Todas as condições de oxidação passaram por uma etapa de filtração em gel para determinação da massa molecular obtida.

Tabela 2: Ensaio para determinação das condições de oxidação de PRP com NaIO₄.

PRP Hib (mg/mL)	NaIO ₄ (mM)	Tempo reacional (min)	PRPoxi (kDa)* Massa molecular
1	10	5	1,4
1	10	30	0,8
1	10	60	1,2
5	10	5	3,2
5	10	30	4,4
5	10	60	3,7
10	10	5	14,7
10	10	30	14,6
10	10	60	15,4

*massa molecular determinada por Sephacryl S-400 (ANEXO 7 para calibração da resina).

A reação de oxidação ocorre rapidamente, originando o produto final em cerca de 5 min. A extensão da reação de oxidação é consequência da proporção estequiométrica da PRP e NaIO₄. Utilizando 10mg de PRP e 10 mM de NaIO₄ obtivemos cadeias do PRP com massa molecular por volta de 14 a 15kDa (**Figura 8**), tamanho desejável para seu uso em vacinas conjugadas (KNISKERN e MARBURG, 1994; ANDERSON *et al.*, 1989). O produto da oxidação foi denominado PRPoxi.

Após a fermentação do PRP, a cadeia polissacarídica apresenta um tamanho médio de cerca de 400kDa (**Figura 8**), sendo que cada subunidade de sua composição apresenta massa molecular de cerca de 373Da. A oxidação de PRP permitiu a obtenção de fragmentos de polissacarídeo de massa molecular por volta de 14kDa o que significa que cada cadeia possui 37,5 subunidades de PRP. Os resultados encontrados sugerem que a reação de oxidação provavelmente ocorre na molécula do ribitol, pois com a quebra desta molécula observamos fragmentos menores de PRP.

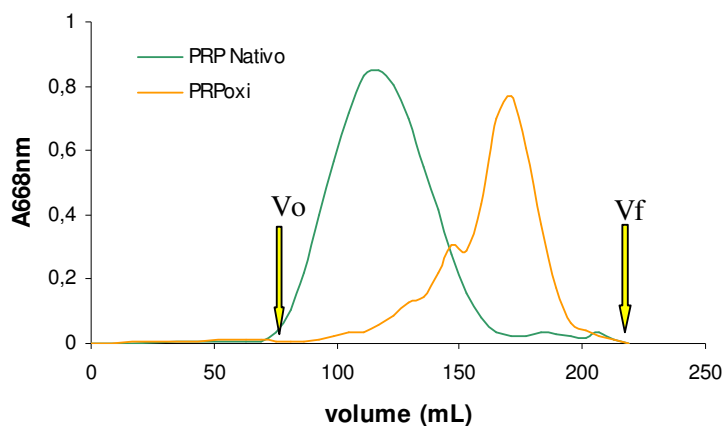


Figura 8: Cromatograma representativo do PRP nativo e oxidado. PRP nativo (linha verde) e oxidado (linha laranja) tratado com NaIO_4 foram aplicados em coluna de filtração em gel contendo Sephacryl S-400. As setas indicam o V_0 (void volume) e o V_f (volume final de resina) respectivamente.

Neste trabalho não foi nosso objetivo estudar o efeito do tamanho da cadeia na resposta imune gerada apesar de sabermos que este item é um dos fatores que podem influenciar diretamente na resposta imunológica (LAFERRIÈRE *et al.*, 1997, KNISKERN e MARBURG, 1994, ANDERSON *et al.*, 1989, 1986).

As condições de oxidação foram otimizadas de modo a obter fragmentos de massa molecular final de 14kDa; tamanho esse, segundo a literatura, que apresenta resposta imunológica após ser conjugado a proteína. O NaIO_4 é o oxidante empregado de preferência para a introdução de grupos aldeídos em polissacarídeos e a concentração utilizada depende também da estrutura do polissacarídeo. Em polímeros de açúcares contendo resíduos de ácido siálico, a adição de periodato de sódio em uma concentração de 1mM leva a clivagem somente de hidroxilas adjacentes nos carbonos 7, 8 e 9 (WILCHEK e BAYER, 1987). Já em concentrações de 10mM de NaIO_4 resultam em oxidação de hidroxilas adjacentes em ligações C-C além daquelas localizadas nos resíduos de ácido siálico (ANDERSON e EBY, 1990; JENNINGS e LUGOWSKI, 1981). Altas concentrações de periodato resultam na abertura de anéis de açúcares e na geração de muitos resíduos de aldeídos (HERMANSON, 1996).

Jennings e colaboradores (1981) oxidaram polissacarídeo capsular de *N. meningitidis* sorogrupo A, B e C adicionando 100mM de periodato de sódio para cada 10mg de polissacarídeo durante 15 minutos. Neste caso, devido a estrutura do polissacarídeo em

questão, os autores não observaram diminuição significativa na massa molecular final do polissacarídeo oxidado.

Wolfe e Hage (1995) avaliaram a influência das variáveis: concentração de periodato, tempo de reação, pH e temperatura na taxa de oxidação de anticorpos. Segundo o artigo a taxa de oxidação aumenta conforme a temperatura aumenta, sendo 25°C a temperatura que proporcionou maior rendimento de oxidação. Outra variável importante foi a concentração de periodato que neste caso, foi recomendado o uso de concentração entre 5mM a 10mM, pois, em concentrações superiores observaram formação de precipitado e a molécula alvo tornou-se superoxidada perdendo suas características como anticorpo.

Uma oxidação mais severa, pelo aumento da concentração de NaIO₄, por exemplo, acarretaria, sem dúvida, em uma maior disponibilidade de sítios de aldeídos, ou seja, a molécula de PRP estaria mais modificada em relação a molécula original. Neste caso, o sítio com maior probabilidade de ser oxidado são as hidroxilas do anel de ribose. O grande problema desta modificação seria o não reconhecimento da molécula de PRP pelo sistema imune. Provavelmente, os anticorpos gerados seriam de baixa especificidade.

5.1.1.2 Derivatização do PRPoxi.

Carboidratos contendo aldeídos nativos ou gerados através da oxidação com NaIO₄ podem ser ligados a moléculas contendo grupo hidrazida ou amina. As hidrazidas reagem espontaneamente com aldeídos para formar ligações hidrazonas.

O espaçador molecular por separar as duas moléculas tem como função melhorar a apresentação do antígeno para o sistema imune, já que o impedimento estérico seria menor devido à sua presença (PEDERSEN *et al.*, 2006; SEPPALA e MAKELA, 1989; KING *et al.*, 1986). A molécula testada como espaçador foi a diidrazida do ácido adípico (ADH).

A escolha sobre o uso da molécula de ADH foi baseada em sua característica química, é uma molécula homobifuncional com 6 átomos de carbonos e 2 grupos hidrazidas (NH₂-NH) em ambas as extremidades da molécula. É um componente bastante hidrofílico e não tóxico (HERMANSON, 1996).

A reação de derivatização com formação da ligação hidrazona é descrita como sendo uma reação rápida (BYSTRICKY *et al.*, 1999; HERMANSON, 1996; KING *et al.*, 1986). Devido ao caráter homobifuncional da molécula de ADH não havendo diferença em qual dos grupos hidrazidas vai se ligar primeiramente ao aldeído do PRPoxi, existe a possibilidade de formação de polímeros PRP-ADH-PRP e neste caso teríamos menos ADH disponíveis para ligação com a proteína, não sendo este o composto desejado.

A **tabela 3** apresenta os dados obtidos após derivatização em diferentes tempos de reação, mantendo-se constante a concentração de PRPoxi (10mg/mL) e massa de ADH (32mg).

Tabela 3: Efeito do tempo de reação sobre a reação de derivatização de PRP oxidado.

PRPoxi (mg/mL)	Tempo de reação (h)	ADH (mg) ^a	nADH/nPRP ^b (mol/mol)
10	1	32	2,4±0,1
10	2	32	2,7±0,3
10	3	32	3,5±0,4
10	4	32	4,2±0,2
10	8	32	3,0±0,1
10	10	32	2,3±0,1

Média de 3 experimentos realizados.

a – Quantidade de ADH (mg) adicionada à reação. De acordo com Hermanson (1996), quando a concentração de aldeído é desconhecida, a adição de 32 mg de ADH por mL de reação é suficiente para estabelecimento da ligação hidrazona e conseqüentemente derivatização de PRP.

b – Relação ADH/PRP (mol) após reação de derivatização. Quantidade de ADH determinada pelo Método TNBS e quantidade de PRP determinada pelo Método Orcinol.

Apesar de não conhecermos a concentração exata de grupos aldeídos gerados na oxidação de PRP, a derivatização de PRPoxi pode nos fornecer uma estimativa indireta da concentração de aldeído, já que é possível dosar a concentração de ADH ligada ao aldeído (QI *et al.*, 1988).

A **tabela 3** apresenta os dados de uma série de experimentos realizados nos quais a variável foi o tempo de reação de derivatização; a concentração de PRPoxi e a quantidade de ADH foram mantidas constante. Hermanson (1996) indica que para uma concentração desconhecida de aldeído, 32 mg de ADH por mL de reação seriam suficiente para a formação

da ligação hidrazona.

Quando mantemos a quantidade de ADH constante e variamos apenas o tempo de reação observamos que a quantidade de PRP ligado ao ADH, evidenciado pela relação $nADH/nPRP$, variou com o tempo de reação, atingindo um máximo com 4 horas de reação ($4,2 \pm 0,2$). Tempos de reação superiores a 4h originaram diminuição na relação ADH/PRP, como observado nos experimentos com 8h e 10h de reação ($3,0 \pm 0,2$ e $2,3 \pm 0,007$ respectivamente). O produto da derivatização foi denominado PRP-ADH.

O ADH é uma molécula simétrica que apresenta 2 grupos hidrazidas passíveis de se ligarem ao aldeído do PRP. Devido a este fato, podem ocorrer múltiplas combinações entre o PRP e o ADH, levando a formação de polímeros (**Figura 9**). O doseamento de ADH (método TNBS) só é possível quando há hidrazida livre. Portanto, a diminuição na relação $nADH/nPRP$ em tempos de derivatização superiores a 8h pode ser indicativo de que houve polimerização. A confirmação da existência de polímeros PRP-ADH pode ser evidenciada quando há aumento da massa molecular do PRP derivatizado em relação ao PRPoxi.

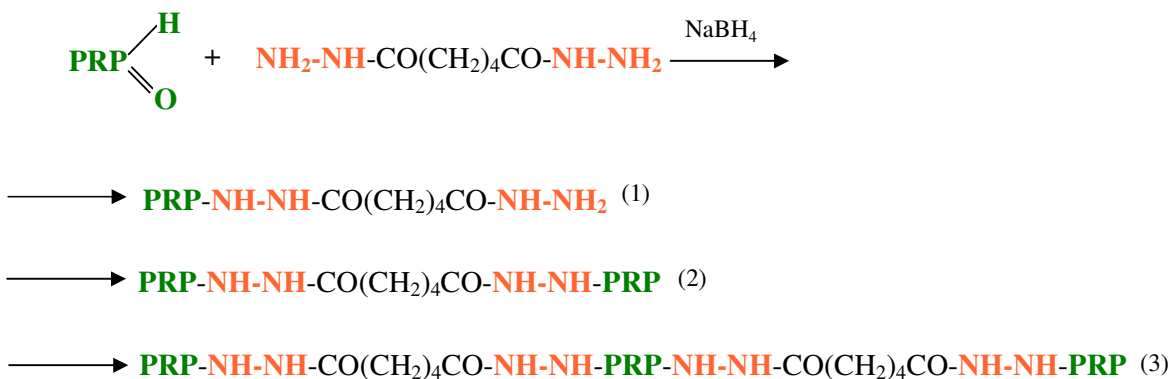


Figura 9: Esquema de reação de derivatização entre PRPoxi e ADH e exemplo de 3 produtos possíveis desta reação. (1) Produto desejável de derivatização no qual existe apenas 1 molécula de ADH ligada ao PRP e a outra ponta de hidrazida estaria livre para ligação com proteína. (2) Possível formação de polímero onde não há mais hidrazida livre, pois outra molécula de PRPoxi se ligou a outra ponta. (3) Possível produto de derivatização com formação de polímero. Em ambas as situações hipotéticas (2) e (3) ocorre aumento na massa molecular de PRP.

A **figura 10** apresenta o perfil cromatográfico das amostras derivatizadas. Nesta figura é possível observar mudanças na massa molecular final do PRP-ADH derivatizado por 8h e 10h, enquanto que o PRP-ADH derivatizado por 4h ou menos, manteve a massa molecular final igual à massa molecular do PRPoxi (14kDa) (**Figura 8** para controle). Este resultado indica que houve formação de polímeros no caso das amostras derivatizadas por 8h e 10h enquanto que nas amostras derivatizadas por 4h ou menos não houve mudança na massa molecular final do PRP. Este resultado corrobora com os resultados encontrados pelo doseamento de ADH apresentados na **tabela 3**.

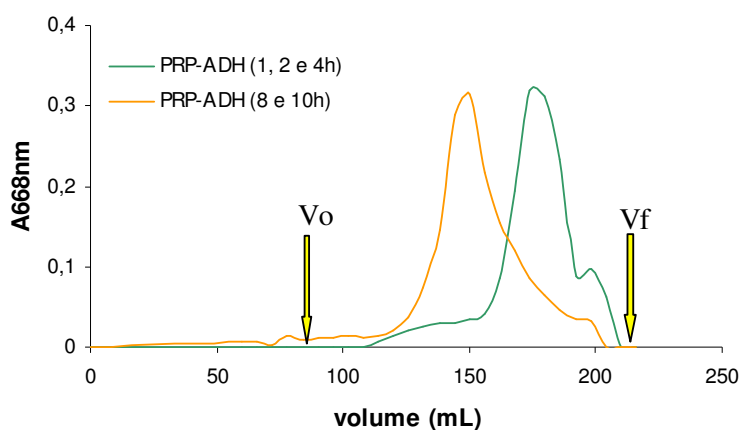


Figura 10: Perfil cromatográfico representativo de PRP-ADH resultantes de reações de derivatização com 1h, 2h ou 4h (verde) e 8h ou 10h (laranja) de duração, respectivamente. As amostras foram aplicadas em Sephacryl S-400. Condições de reação: PRPoxi (10mg/mL) + ADH (32mg) derivatizado por 1h, 2h ou 4h (verde) ou 8h ou 10h (laranja).

Nas amostras derivatizadas por 1h ($2,4 \pm 0,2$) ou 2h ($2,7 \pm 0,3$) (**Tabela 3**), apesar de não observarmos alterações na massa molecular de PRP, a relação final ADH/PRP foi inferior a encontrada nas amostras derivatizadas por 4h ($4,2 \pm 0,2$) o que poderia significar que o tempo de reação não foi suficiente para a substituição de todos os aldeídos pelo ADH.

Esse experimento sugere que no PRP são gerados 4 resíduos de aldeídos e que estes são substituídos pelo ADH após 4h de reação (tempo no qual foi encontrado o valor máximo de ADH/PRP $4,2 \pm 0,2$).

Com base nos resultados apresentados, experimentamos subseqüentemente o efeito da

concentração de ADH sobre o rendimento da ligação PRP-ADH, mantendo um tempo de reação constante de 4h. A **tabela 4** apresenta os valores encontrados após derivatização de PRP na qual a concentração de PRP (10mg/mL) e o tempo de reação (4h) foram mantidos constantes. A variável, neste caso, foi a concentração de ADH adicionada à reação.

Tabela 4: Efeito da quantidade de ADH na reação de derivatização de PRPoxi.

PRPoxi (mg/mL)	Tempo de reação (h)	ADH ^a (mg)	nADH/nPRP ^b (mol/mol)
10	4	10	2,6±0,3
10	4	20	3,4±0,1
10	4	30	4,5±0,1
10	4	60	3,4±0,5
10	4	80	2,2±0,2
10	4	100	2,0±0,3

Média de 3 experimentos realizados.

a – Quantidade de ADH adicionada à reação de derivatização (mg).

b – Relação ADH/PRP (mol) após reação de derivatização. Quantidade de ADH determinada pelo Método TNBS e quantidade de PRP determinada pelo Método Orcinol.

Um paralelo pode ser feito entre as **tabelas 3 e 4** onde se observa um aumento linear gradativo na relação ADH/PRP com um valor máximo atingido por volta de 4 moléculas de ADH por molécula de PRP e em seguida ocorre decréscimo nesta relação.

Na **tabela 4**, observou-se que mantendo a concentração de PRP (10mg/mL) e tempo de reação constante em 4h, a melhor condição de reação que gerou valor máximo observado de 4,5±0,1 foi aquela na qual se adicionou 30mg de ADH. Desta forma, após a derivatização o PRP encontra-se, em média, com 4 moléculas de ADH ligadas a cadeia de PRP. Este resultado foi semelhante ao encontrado anteriormente onde as condições de reação foram: 4h de tempo de reação, 10mg/mL PRPoxi, 32mg de ADH.

Já em concentrações superiores de ADH (60, 80 e 100mg de ADH adicionado) a relação ADH/PRP decresceu (3,4±0,5, 2,2±0,1, 2,0±0,3, respectivamente), sugerindo polimerização de PRP. Da mesma forma que anteriormente, todas as condições testadas, foram monitoradas por Sephacryl S-400 para verificação da massa molecular final de PRP após derivatização.

O resultado encontrado (não apresentado) foi muito semelhante ao resultado encontrado na **figura 10**, ou seja, para quantidades de ADH inferiores a 30mg não houve alteração na massa molecular do PRP, enquanto que em quantidades acima de 30mg observou-se aumento na massa molecular de PRP.

Em resumo, ao término da etapa de derivatização a melhor condição de ensaio foi 10mg/mL PRP, 30mg ADH, 4 h de reação temos uma cadeia de PRP com massa molecular de 14kDa e 4 moléculas de ADH ligadas ao polissacarídeo. Desta forma, além da clivagem da molécula no ribitol, provavelmente ocorre oxidação no anel da ribose e no total são gerados 4 aldeídos por cadeia de polissacarídeo.

O grau de substituição do polissacarídeo pode influenciar tanto no rendimento de conjugação quanto na imunogenicidade dos polissacarídeos conjugados. Polissacarídeos com alto grau de substituição apresentariam grandes quantidades de moléculas do espaçador ADH prontos para reagirem com as proteínas na etapa de conjugação, resultando em rendimentos maiores. Por outro lado, para atingir uma alta substituição, o polissacarídeo deve apresentar maior número de resíduos de aldeído, o que significa estar mais oxidado e provavelmente mais fragmentado. Uma alta taxa de oxidação poderia levar a descaracterização da molécula de polissacarídeo como antígeno, fazendo com que o sistema imune reconheça pouco ou não reconheça a molécula de polissacarídeo. Assim, a reação de substituição do PRP deve ser devidamente controlada de modo a obedecer a melhor relação rendimento/imunogenicidade.

Os principais fatores que poderiam afetar o grau de substituição de PRP avaliados nesta etapa foram: concentração de ADH e tempo reacional. A influência da concentração de PRP no grau de substituição não foi avaliada, de acordo com Hermanson (1996) a eficiência da reação de derivatização de polissacarídeos oxidados por periodato é semelhante para concentrações compreendidas entre 1mg/mL e 10mg/mL. Além disso, em concentrações superiores a 10mg/mL a solução de PRP torna-se muito viscosa dificultando a manipulação e podendo resultar em PRP com baixo grau de substituição devido a provável formação de polímeros.

De acordo com os nossos resultados, obtivemos relação ADH/PRP em torno de $4,2 \pm 0,21$ após 4h de reação. Esta relação foi considerada a melhor, pois após 4h houve formação de polímeros. Neste projeto visamos sempre obter os melhores valores dos

resultados em cada etapa para que o máximo de rendimento de conjugação seja obtido.

Nas vacinas comerciais disponíveis PRP-D, HbOC, PRP-OMV e PRP-T (Hiberix) somente a PRP-D e a PRP-T apresentam ADH como espaçador molecular. O PRP da vacina PRP-T é ativado com CNBr e em seguida derivatizado com ADH. O grau de substituição atingido é de 4 moléculas de ADH a cada 100 subunidades de PRP (KNISKERN e MARBURG, 1994). Já na vacina PRP-D a introdução deste espaçador é na molécula protéica e não no polissacarídeo como no nosso caso. A HbOC optou por utilizar um espaçador heterobifuncional com 2 grupos distintos que se liga a proteína e ao polissacarídeo de forma diferente. A PRP-OMP é a única vacina que não tem espaçador molecular, o PRP está ligado diretamente à OMP.

Nesta etapa de ativação, o PRP-ADH foi preparado para a fase de acoplamento com a proteína. Para tanto, estudamos detalhadamente as variáveis das etapas de oxidação e derivatização para estabelecimento da melhor condição de ativação do PRP. Desta forma, o PRP encontra-se completamente ativado, pronto para ser conjugado com a molécula protéica e apresenta as seguintes características físico-químicas:

- ❖ Massa Molecular: 14kDa
- ❖ N^o subunidades de PRP: 37,5
- ❖ nADH/nPRP: 4,3

5.1.2 Etapa de conjugação química

De acordo com Fukasawa e colaboradores (2006), os principais parâmetros que podem influenciar diretamente na reação de conjugação são: grau de substituição de PRP, concentração de PRP-ADH e TT, tempo de reação, proporção PRP-ADH e TT e concentração de EDAC. Assim, propusemo-nos a analisar cada um destes fatores em função do rendimento de conjugação no sentido de otimizar o protocolo de conjugação.

No que se refere ao grau de substituição de PRP-ADH, assumimos, com base nos

experimentos previamente descritos (item **5.1.1.2**), que praticamente todo o aldeído gerado foi substituído, ou seja, não exercendo maior influência sobre o rendimento final de conjugação havendo, portanto, 4 sítios de ligação para proteína no PRP.

A ativação da proteína com EDAC tem como principal objetivo a ativação do grupo carboxila. A carbodiimida liga-se a -COOH para formar um intermediário *O*-acilisouréia muito reativo que se liga ao PRP-ADH, via amino grupo, formando o conjugado.

Optamos por manter a concentração fixa em 1M EDAC, pois segundo Shafer e colaboradores (2000), Hermanson (1996) e Lees e colaboradores (1996), o uso de concentrações superiores a 1M na ativação de proteína como toxóide tetânico também pode levar a sua auto polimerização (TT-TT) via ligação amina-carboxila ou carboxila-carboxila. A formação destes polímeros resultaria na redução do rendimento da conjugação, pois a quantidade de proteínas livres disponíveis para reagir com o PRP-ADH seria menor. O controle para verificação de possível polimerização de TT foi realizado em coluna de gel filtração e o perfil está apresentado no **ANEXO H**.

5.1.2.1 Influência do pH

Na conjugação, a hidrazida livre do composto PRP-ADH irá se ligar ao grupo carboxila ativado da proteína. Esta ligação pode ocorrer entre os pHs 4,5 e 7,5 (HERMANSON, 1996), sendo que em pH mais alcalino o rendimento de conjugação pode ser melhorado. Desta forma, nossa escolha recaiu sobre os valores de pH 5,0 e pH 8,0.

Os tampões escolhidos para este estudo foram o tampão fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) 0,1M, cloreto de sódio (NaCl) 0,15M para pH 8,0 e acetato de sódio ($\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na}$) 0,1M, cloreto de sódio (NaCl) 0,15M para pH 5,0.

A **figura 11** mostra a influência do pH nos seguintes parâmetros: rendimento de conjugação, relação PRP-ADH/TT (mg) e nPRP-ADH/nTT. Neste experimento as outras variáveis foram estabelecidas como:

- 10mg de PRP-ADH e TT em concentrações finais de 1mg/mL

- TT ativado previamente com 1M EDAC
- 2 dias de reação

A **tabela 5** mostra os resultados de dois ensaios independentes da reação de conjugação do PRP-ADH com TT em dois pHs (5,0 e 8,0) representando a média do rendimento e desvio padrão.

Como podemos observar na **figura 11** e **tabela 5** em pH 5,0 o rendimento médio da conjugação foi de $7,1 \pm 0,2$ e uma relação PRP-ADH/TT de $0,3 \pm 0,1$. Já em pH 8,0 o rendimento médio de conjugação foi de $13,5 \pm 0,9$ e uma proporção de $1,3 \pm 0,0$ de PRP-ADH/TT. Por proporcionar melhor rendimento de conjugação escolhemos o pH 8,0 para realizar todas as futuras conjugações em tampão Na_2HPO_4 0,1M, NaCl 0,15M pH8,0. A relação em massa de PRP-ADH/TT encontrada em pH 8,0 indica que para cada molécula de TT há, no mínimo, 2 moléculas de PRP-ADH ligadas.

Provavelmente, as diferenças observadas nos pHs estudados podem refletir a instabilidade da carbodiimida (EDAC) em meio aquoso. O EDAC é lábil em meio aquoso reagindo com moléculas de água (HERMANSON, 1996). Além disso, em meio ácido (pH 5,0) ocorre maior degradação do EDAC em seu metabólito derivado de uréia *N*-etil-*N'*-(dimetilaminopropil) uréia (EDU) (LEI *et al.*, 2002; WROBEL *et al.*, 2002). Portanto, a reação de conjugação é mais favorecida em pH alcalino. Entretanto alguns trabalhos relatam pH ácido como favorável. No trabalho de Kossaczka e colaboradores (1997), o rendimento de conjugação entre polissacarídeo capsular de *Salmonella typhi* e proteína derivatizada com ADH foi influenciado pelo pH da reação, sendo este mantido entre 5,5 e 6,0, pois levou ao melhor rendimento de conjugação em relação ao pH mais ácido.

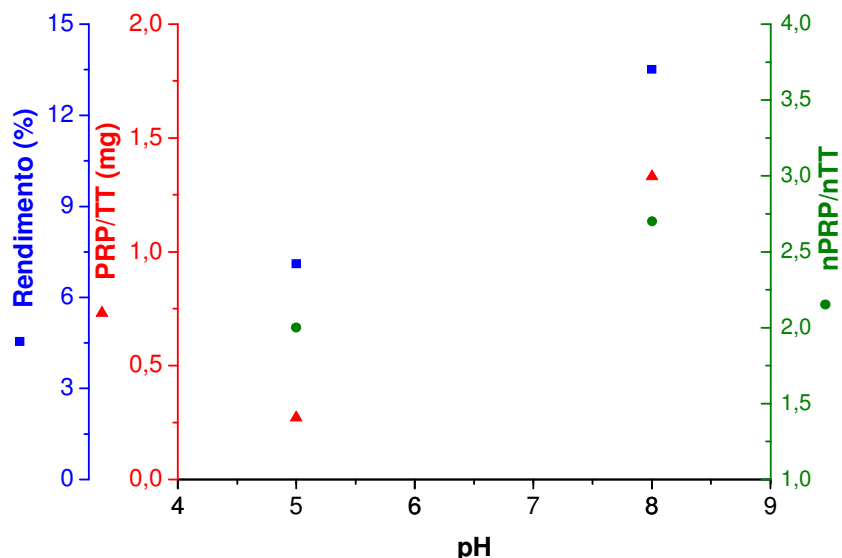


Figura 11: Influência do pH no rendimento de conjugação. Conjugação realizada na seguinte condição: 10mg de PRP-ADH e TT em concentrações finais de 1mg/mL, TT ativado com 1M EDAC, 2 dias de reação. Os experimentos foram realizados em tampão $C_2H_3O_2Na$ 0,1M, NaCl 0,15M para pH 5,0 ou Na_2HPO_4 0,1M, NaCl 0,15M para pH 8,0.

Tabela 5: Influência do pH no rendimento do conjugado PRP-ADH-TT.

pH	Conjugado PRP-ADH-TT ¹				Rendimento ⁵ (%)
	PRP-ADH ² (mg)	TT ³ (mg)	PRP-ADH/TT (mg:mg)	nPRP- ADH/nTT ⁴	
5,0	0,7±0,1	3,8±0,3	0,3±0,1	2,0±0,6	7,1±0,2
8,0	1,3±0,3	5,5±0,2	1,3±0,0	2,7±0,9	13,5±0,9

1 – Conjugado PRP-ADH-TT obtido a partir da reação entre PRP-ADH e TT na seguinte condição: 10mg de PRP-ADH e TT em concentrações finais de 1mg/mL, TT ativado com 1M EDAC, 2 dias de reação, tampão $C_2H_3O_2Na$ 0,1M, NaCl 0,15M para pH 5,0 ou Na_2HPO_4 0,1M, NaCl 0,15M para pH 8,0. Média de 2 experimentos realizados.

2,3 – Quantidade de PRP-ADH e TT encontrada no conjugado PRP-ADH-TT após purificação em gel filtração.

4 – Relação número de mol PRP-ADH e número de mol TT encontrado no conjugado final. Massa molecular de PRP-ADH 13kDa, massa molecular de TT 150kDa.

5 – Rendimento de conjugação relaciona a quantidade de PRP-ADH encontrada no conjugado e a quantidade de PRP-ADH inicial empregada na reação.

Doseamento de PRP pelo método Orcinol e doseamento de proteína pelo método de Lowry.

Em outro trabalho, o rendimento de conjugação entre polissacarídeo capsular de *Neisseria meningitidis* sorogrupo C (PSC) e OMV (vesícula de membrana externa) não foi afetado pelo pH do tampão (5,0 ou 7,0) (FUKASAWA *et al.*, 2006). Hermanson (1996) também não observou alteração no rendimento de conjugação entre um peptídeo formado por glicina-tirosina e albumina bovina mediada por EDAC tanto em pH 4,7 como em pH 7,3. A formação da ligação amida (entre a carboxila da proteína e amina do polissacarídeo) mediada por EDAC pode ocorrer numa gama de pH alargada, situada entre pH 4,5 e 7,5 (HERMANSON, 1996).

5.1.2.2 Influência do tempo de reação

O tempo de reação para formação do conjugado parece depender, entre outros fatores, da massa molecular do polissacarídeo e da proteína. Tendo em conta que são duas moléculas de massa molecular considerável e polidispersa, PRP-ADH com cerca de 14kDa e TT com 150kDa e sabendo-se que no PRP-ADH existem apenas 4 sítios locais disponíveis para se ligar ao TT, os tempos de reação que selecionamos para este estudo situaram-se entre 2 e 15 dias. Outros fatores como concentração dos reagentes e disponibilidade dos sítios de ligação entre os componentes podem interferir no tempo para formação do conjugado.

Foram realizados 2 experimentos variando-se o tempo de reação (2, 5, 10 e 15 dias). O rendimento de conjugação final, sob influência do tempo, está apresentado na **figura 12** e a condição de conjugação estabelecida foi:

- 10 mg de PRP-ADH e TT em concentrações finais de 1mg/mL
- TT ativado previamente com 1MEDAC
- Tampão Na₂HPO₄ 0,1M, NaCl 0,15M pH8,0

A **tabela 6** apresenta os números obtidos nos experimentos realizados nos quais o rendimento de conjugação foi avaliado em relação ao tempo de reação para formação do conjugado PRP-ADH-TT.

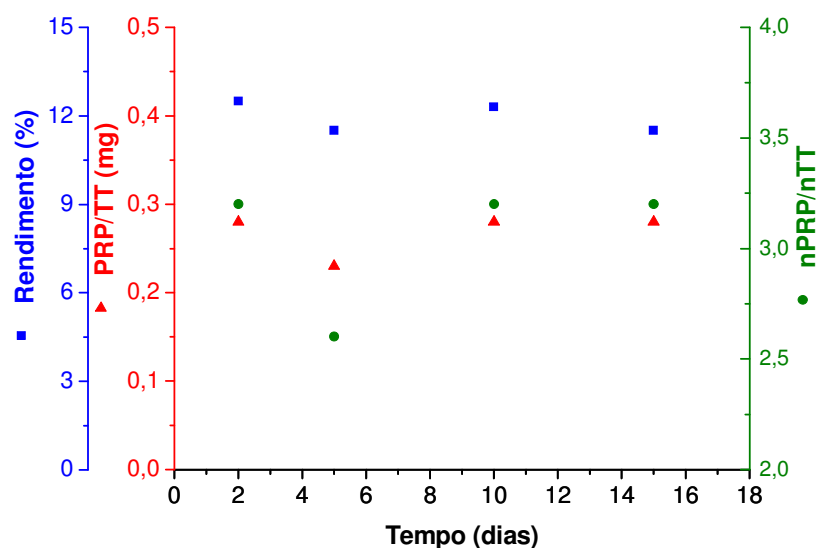


Figura 12: Avaliação do tempo de reação no rendimento de conjugação de PRP-ADH-TT. A condição de trabalho estabelecida foi: 10mg de PRP-ADH e TT em concentrações finais de 1mg/mL, TT ativado com 1M EDAC, tampão Na_2HPO_4 0,1M, NaCl 0,15M pH 8,0.

Tabela 6: Influência do tempo de reação no rendimento de conjugação.

Tempo (dias)	Conjugado PRP-ADH-TT ¹				Rendimento ⁵ (%)
	PRP-ADH ² (mg)	TT ³ (mg)	PRP-ADH/TT (mg:mg)	nPRP-ADH/nTT ⁴	
2	1,2±0,0	4,3±0,0	0,28±0,0	3,2±0,7	12,5±0,2
5	1,2±0,3	5,2±0,6	0,23±0,0	2,6±0,3	11,5±3,5
10	1,2±0,1	4,3±0,4	0,28±0,1	3,2±0,8	12,3±0,1
15	1,2±0,2	4,2±0,5	0,28±0,0	3,2±0,8	11,5±2,4

1 – Conjugado PRP-ADH-TT obtido a partir da reação entre PRP-ADH e TT. Condição de conjugação: 10mg de PRP-ADH e TT em concentrações finais de 1mg/mL, TT ativado com 1M EDAC, tampão Na_2HPO_4 0,1M, NaCl 0,15M pH 8,0. Doseamento de PRP pelo método Orcinol e doseamento de proteína pelo método de Lowry. Média de 2 experimentos realizados.

2,3 – Quantidade de PRP-ADH e TT encontradas no conjugado PRP-ADH-TT, após purificação em gel filtração.

4 – Relação número de mol PRP-ADH e número de mol TT encontrado no conjugado final. Massa molecular de PRP-ADH 13kDa, massa molecular de TT 150kDa.

5 – Rendimento de conjugação relaciona a quantidade de PRP-ADH encontrada no conjugado e a quantidade de PRP-ADH inicial empregada na reação.

Pela **figura 12** e **tabela 6** percebemos que o rendimento de conjugação (média de rendimento de conjugação dos experimentos apresentados na tabela 11,7%±1,7) não aumenta após 2 dias. A relação em massa de PRP-ADH/TT manteve-se constante (0,2±0,1, média de todos os conjugados) e a proporção em moles de PRP-ADH e TT também não apresentou muita alteração (3,0±0,6) dentre os experimentos realizados. Com base nestes resultados o tempo de conjugação escolhido foi 2 dias.

O fato de o rendimento ter se mantido baixo (11,7% média de todos os rendimentos encontrados na **tabela 6**) e não se alterou ao longo do tempo, sugere que outros fatores que não o tempo limitam a reação de conjugação.

Em estudos de conjugação usando PRP, o tempo de reação variou dependendo do tipo de proteína e principalmente do método de conjugação escolhidos. Schneerson e colaboradores (1980) definiram que 24h seria o tempo ideal de conjugação entre PRP com TT para obtenção do melhor rendimento no qual o PRP foi ativado com CNBr e a proteína foi derivatizada com ADH. Já Marburg e colaboradores (1986) conjugando PRP a OMVs estipularam um tempo de conjugação de 17 a 19h. Nos protocolos de conjugação envolvendo PSC e OMVs pelo método da Carbodiimida, o tempo estabelecido para conjugação foi de 18h (FUKASAWA *et al.*, 2006), pois em tempos superiores não foi observado alteração no rendimento.

5.1.2.3 Influência da proporção PRP-ADH e TT

A relação (mg:mg) de PRP-ADH e TT foi outro parâmetro investigado e revelou resultados interessantes e significativos. A condição de conjugação está detalhada logo abaixo:

- PRP-ADH e TT em concentrações finais de 1mg/mL
- TT ativado previamente com 1M EDAC
- Na₂HPO₄ 0,1M, NaCl 0,15M, pH8

- 2 dias de reação

Foram empregadas as seguintes proporções nas reações de conjugação entre PRP-ADH e TT:

- 1,0 (1:1) – 10mg de PRP-ADH e 10mg de TT
- 2,0 (2:1) – 10 mg de PRP-ADH e 5,0mg de TT
- 4,0 (4:1) – 10 mg de PRP-ADH e 2,5mg de TT
- 10,0 (10:1) – 10mg de PRP-ADH e 1,0mg de TT

A **figura 13** apresenta graficamente os resultados do rendimento de conjugação. A influência da relação PRP-ADH:TT no rendimento final de conjugação está detalhada na **tabela 7** sob a forma de média, bem como o desvio padrão.

Os resultados mostram que a relação ótima PRP-ADH:TT para obtenção de um melhor rendimento é de 4:1. Nesta relação observamos que mais moléculas de PRP-ADH estão ligadas a TT.

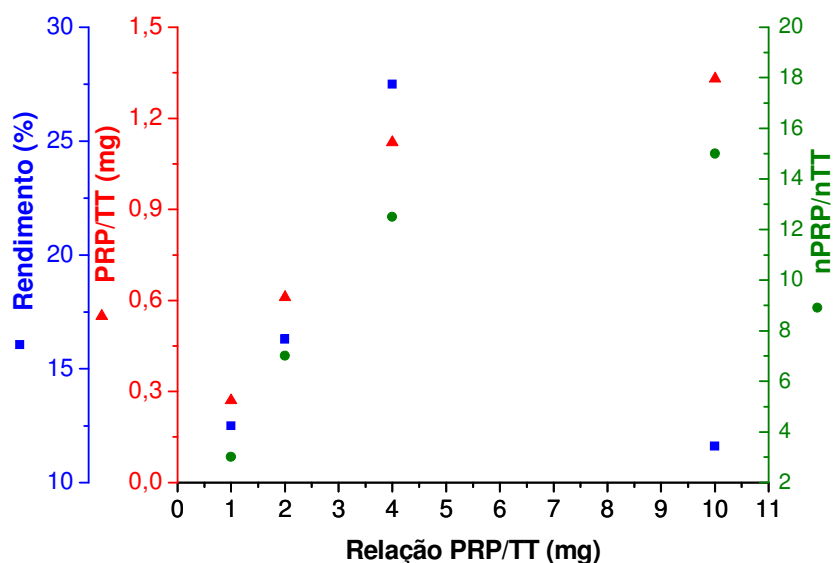


Figura 13: Avaliação da proporção PRP-ADH:TT no rendimento de conjugação do conjugado PRP-ADH-TT. A condição de trabalho analisada foi: PRP-ADH e TT em concentrações finais de 1mg/mL, TT ativado com 1M EDAC, 2 dias de reação, tampão Na₂HPO₄ 0,1M, NaCl 0,15M pH 8,0.

Tabela 7: Influência da relação de PRP-ADH/TT no rendimento da conjugação.

Conjugado PRP-ADH-TT ¹					
PRP-ADH:TT (mg:mg)	PRP-ADH ² (mg)	TT ³ (mg)	PRP-ADH/TT (mg:mg)	nPRP- ADH/nTT ⁴	Rendimento ⁵ %
1	1,2±0,0	4,3±0,0	0,27±0,1	3,0±0,7	12,5±0,2
2	1,6±0,1	2,6±0,4	0,61±0,1	7,0±0,2	16,3±1,0
4	2,7±0,2	2,4±0,1	1,12±0,0	12,5±0,4	27,5±2,5
10	1,2±0,1	0,9±0,0	1,33±0,1	15±0,9	11,6±1,0

1 – Conjugado PRP-ADH-TT obtido a partir da reação entre PRP-ADH e TT na seguinte condição: PRP-ADH e TT em concentrações finais de 1mg/mL, TT ativado com 1M EDAC, tampão Na₂HPO₄ 0,1M, NaCl 0,15M pH 8,0, 2 dias de reação. Doseamento de PRP pelo método Orcinol e doseamento de proteína pelo método de Lowry. Média de 2 experimentos realizados.

2,3 – Quantidade de PRP-ADH e TT encontradas no conjugado PRP-ADH-TT, após purificação em gel filtração.

4 – Relação número de mol PRP-ADH e número de mol TT encontrado no conjugado final. Massa molecular de PRP-ADH 13kDa, massa molecular de TT 150kDa.

5 – Rendimento de conjugação relaciona a quantidade de PRP-ADH encontrada no conjugado e a quantidade de PRP-ADH inicial empregada na reação.

Peeters e colaboradores (1996) discutiram sobre este balanço entre os componentes polissacarídicos e protéicos em vacinas conjugadas e sugerem que quanto mais polissacarídeos ligados a proteína maior a probabilidade de esta alta razão levar ao mascaramento de epítomos essenciais do carregador frente ao sistema imune e, dificultando seu reconhecimento como um antígeno TD. Somente um estudo sobre a avaliação imunológica dos diferentes conjugados obtidos pode nos mostrar a influência da proporção de PRP-ADH e TT no conjugado final. Este estudo foi realizado e será abordado mais tarde.

A relação final em massa de polissacarídeo/proteína encontrada nas 4 vacinas conjugadas contra Hib comercializadas é: PRP-D (0,7), HbOC (2,5), PRP-OMP (17), PRP-T (Hiberix) (0,5) (FRASCH, 1994). Comparando a proporção polissacarídeo/proteína (1,12) obtida nas nossas condições com a vacina Hiberix notamos que o nosso conjugado apresenta o dobro de PRP em relação a Hiberix.

5.1.2.4 Influência da concentração de PRP-ADH e TT

O último parâmetro avaliado foi a influência das concentrações de PRP-ADH e TT no rendimento final da reação de conjugação. Para isso mantivemos constante a relação de 4:1 de PRP-ADH e TT (mg/mg) e variamos as concentrações iniciais dos componentes. As condições de pH, tempo de reação e ativação de TT prévia também foram mantidas constantes.

De acordo com a **figura 14** e a **tabela 8** observamos aumento considerável no rendimento de conjugação ($80,5\% \pm 3,5$) com o aumento da diluição dos componentes PRP-ADH e TT. Quando a concentração inicial de PRP-ADH e TT foi de 1mg/mL houve um grande decréscimo no rendimento ($25\% \pm 1,0$) e finalmente decresceu ainda mais com os componentes mais concentrados 5mg/mL ($2,4\% \pm 0,9$).

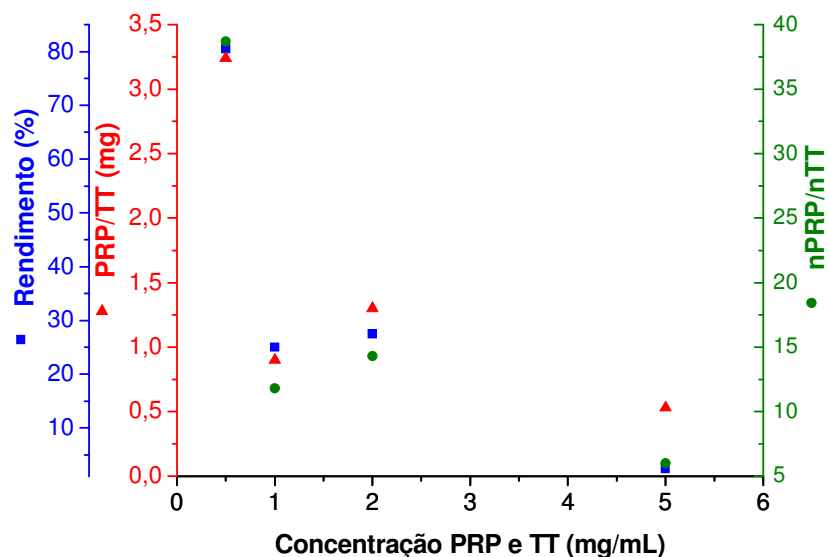


Figura 14: Rendimento de conjugação em função da concentração de PRP-ADH e TT na formação do conjugado PRP-ADH-TT. A condição de conjugação analisada foi: 10mg PRP-ADH e 2,5mg TT massa final, TT ativado com 1M EDAC, tampão Na₂HPO₄ 0,1M, NaCl 0,15M pH 8,0, 2 dias de reação.

Tabela 8: Influência das concentrações de PRP-ADH e TT no rendimento da conjugação.

PRP-ADH TT ² (mg/mL)	Conjugado PRP-ADH-TT ¹				
	PRP-ADH ³ (mg)	TT ⁴ (mg)	PRP-ADH/TT (mg:mg)	nPRP- ADH/nTT ⁵	Rendimento ⁶ %
0,5	8,1±0,3	2,5±0	3,24±0,2	38,7±0,2	80,5±3,5
1	2,5±0,1	2,4±0,0	0,9±0,0	11,8±0,4	25±1,0
2	2,7±0,2	2,1±0,1	1,3±0,0	14,3±0,7	27,5±2,0
5	0,2±0,0	0,4±0,1	0,53±0,1	6±0,9	2,4±0,1

1 – Conjugado PRP-ADH-TT obtido a partir da reação entre PRP-ADH e TT. A condição de conjugação analisada foi: 10mg PRP-ADH e 2,5mg TT massa final, TT ativado com 1M EDAC, tampão Na₂HPO₄ 0,1M, NaCl 0,15M pH 8,0, 2 dias de reação. Doseamento de PRP pelo método Orcinol e doseamento de proteína pelo método de Lowry. Média de 2 experimentos realizados.

2- Concentração inicial de PRP-ADH e TT.

3,4 – Quantidade de PRP-ADH e TT encontradas no conjugado PRP-ADH-TT, após purificação em gel filtração.

5 – Relação número de mol PRP-ADH e número de mol TT encontrado no conjugado final. Massa molecular de PRP-ADH 13kDa, massa molecular de TT 150kDa.

6 – Rendimento de conjugação relaciona a quantidade de PRP-ADH encontrada no conjugado e a quantidade de PRP-ADH inicial empregada na reação.

Com este experimento mostramos que variando apenas o parâmetro diluição, conseguimos um rendimento raramente mostrado na literatura. A otimização do protocolo de conjugação permitiu alcançar um rendimento de 80% de polissacarídeo conjugado, as condições de reação estabelecidas foram: 10mg PRP-ADH e 2,5mg TT em concentrações iniciais de 0,5mg/mL, TT previamente ativado com 1M EDAC; 2 dias de reação, tampão Na_2HPO_4 0,1M, NaCl 0,15M, pH8,0. A concentração de PRP-ADH e TT mostrou ser o fator que mais influenciou o rendimento de conjugação, ao passo que o tempo de reação foi o que teve menos relevância sobre o processo.

Normalmente os trabalhos de desenvolvimento de vacina conjugada correlacionam o método de conjugação adotado somente com a resposta imunológica obtida e não com a otimização do processo, pois em sua grande maioria não são trabalhos de caráter biotecnológico e, portanto não objetivam a maximização do rendimento. Além disto, muitos trabalhos sobre vacinas conjugadas citam apenas o rendimento de conjugação em relação a proteína e não ao polissacarídeo. Desta forma, a comparação e discussão dos nossos resultados são dificultadas.

A influência da concentração de PRP e TT no rendimento de conjugação (PRP ativado com CNBr derivatizado com ADH e acoplado a proteína na presença de EDAC) foi estudada no trabalho de Chu e colaboradores (1983) que relataram rendimento de 62% quando a concentração foi de 30mg/mL. Os autores também notaram decréscimo na relação em massa de proteína e PRP que passou de 3:1 quando a concentração era de 5mg/mL para 1,6:1 em 30mg/mL.

Apesar do alto rendimento, esta metodologia emprega brometo de cianogênio que é conhecido por suas características altamente tóxicas envolvendo gastos adicionais em equipamentos de segurança, treinamento de funcionários e tratamento de resíduos. A vacina Hiberix emprega a mesma metodologia descrita, porém detalhes do processo, como o rendimento de conjugação, estão protegidos. Devi e colaboradores (1991) obtiveram rendimentos em torno de 22,5% conjugando PSC com TT empregando concentração de 10 mg/mL (PSC derivatizado com ADH na presença de EDAC e conjugado a proteína também na presença de EDAC). De acordo com os trabalhos citados quanto maior a concentração de polissacarídeo e proteína maior é o rendimento da conjugação.

Já no protocolo desenvolvido por Fukasawa e colaboradores (2006), cuja etapa de conjugação é semelhante a nossa, a concentração de polissacarídeo e proteína não interferiu no rendimento se mantendo constante, por volta de 17,78%, em concentrações que variaram entre 10mg/mL a 30mg/mL. Concentrações abaixo de 10mg/mL não foram testadas. Os autores estabeleceram o emprego de concentrações de 10mg/mL, pois valores maiores dificultavam a operação do processo devido à alta viscosidade do meio de reação.

Na conjugação por Aminoação Redutiva realizada no início do projeto observamos baixos rendimentos de conjugação de PRP (13,5%), este resultado corrobora com os dados de Frasch (1999 *apud* FUKASAWA 2004) ressaltando que o rendimento de vacinas conjugadas que empregam proteínas tipo toxóide é normalmente baixo (12%).

Em um trabalho paralelo ao nosso, desenvolvido mais ou menos ao mesmo tempo Lee e Frasch apresentaram em 2005, uma patente na qual o método desenvolvido é muito semelhante ao nosso, ou seja, o polissacarídeo é oxidado com NaIO₄, derivatizado com o ADH e acoplado a proteína. A diferença entre este e o nosso protocolo é a etapa da reação catalisada pelo EDAC. No nosso protocolo, o EDAC é incluído na reação entre as macromoléculas PRP e TT – etapa mais difícil. Como consequência é esperado maior rendimento no nosso protocolo. Neste protocolo o rendimento de conjugação de proteína é de 60%, o rendimento em relação ao polissacarídeo não é mencionado.

No recente trabalho publicado por Silveira e colaboradores (2007) encontramos um protocolo de conjugação semelhante ao nosso. No trabalho em questão, o PSC é oxidado com NaIO₄ e acoplado a TT derivatizado com hidrazina (NH₂-NH₂) resultando em um protocolo de conjugação escalonável. O autor sugere indiretamente pelos dados de polissacarídeo não conjugado que o rendimento é alto. Entretanto a hidrazina, um agente redutor amplamente empregado na indústria, agricultura e medicina, apresenta propriedades carcinogênicas com grandes efeitos citotóxicos em células hepáticas (NODA *et al.*, 1987) e é um composto instável, o que dificulta o escalonamento do processo.

O desenvolvimento e a otimização do Método Hidrazona permitiu a obtenção de conjugados PRP-ADH-TT com características químicas definidas (PRP com 13kDa e 4 moléculas de ADH ligadas e relação PRP/TT por volta de 3). E em comparação a outros métodos, o rendimento obtido pelo Método Hidrazona foi muito superior (80% de PRP

conjugado). Desta forma, a etapa seguinte e outro objetivo do projeto, foi aplicar a metodologia desenvolvida em escala ampliada visando a reprodutibilidade e o escalonamento.

5.2 Estudo para escalonamento do Método Hidrazona

Os dados obtidos na primeira parte desse trabalho permitiram o desenvolvimento de um novo protocolo de conjugação com alto rendimento. O próximo passo consistiu então, na adaptação do método para aplicação em escala ampliada.

5.2.1 Ativação de PRP – ETAPA 1

Nesta etapa aplicamos o mesmo protocolo anteriormente utilizado para pequena escala para ativação de PRP (oxidação seguida de derivatização).

Contudo, devido a necessidade de uma maior quantidade de PRP ativado, testamos purificar os produtos das reações de oxidação e derivatização (PRPoxi e PRP-ADH respectivamente) por ultrafiltração tangencial (UF) no lugar da cromatografia de exclusão molecular (Sephadex G-25). Para tanto, empregamos membrana de corte nominal de 5kDa, pois, tanto PRPoxi quanto PRP-ADH apresentam massa molecular por volta de 14,5kDa. O controle da massa molecular após cada etapa de purificação foi realizado por cromatografia de filtração em gel Sephacryl S-400.

A **tabela 9** mostra os dados comparando o rendimento de purificação de PRPoxi e PRP-ADH por cromatografia de exclusão molecular e UF.

Tabela 9: Comparação de rendimento de purificação de PRPoxi e PRP-ADH por cromatografia de exclusão molecular e ultrafiltração tangencial.

ETAPA 1	Técnica de Purificação	PRP (mg/mL)	PRP (mg) recuperado ³	Massa Molecular (kDa) ⁴	Rendimento (%)
Oxidação	Exclusão Molecular ¹	10	8,2±0,4	14	81,7±3,4
	Ultrafiltração Tangencial ²	10	7,3±4,4	14	72,5±2,1
Derivatização	Exclusão Molecular	10	7,7±0,4	14	77,3±4,0
	Ultrafiltração Tangencial	10	7,5±3,4	14	74,4±1,7

Média de 3 experimentos realizados.

1 – Cromatografia de exclusão molecular realizada com a resina Sephadex G-25.

2 – Ultrafiltração tangencial realizada com membrana de corte nominal de 5kDa.

3 – Doseamento de polissacarídeo pelo Método Orcinol.

4 – Massa molecular determinada por Sephacryl S-400.

De acordo com a tabela 9, a recuperação de PRPoxi ou PRP-ADH foi ligeiramente superior em UF em comparação com a cromatografia de exclusão molecular. O controle da massa molecular das amostras por Sephacryl S-400 mostrou que o tamanho final (14kDa) não foi alterado pela pressão aplicada na ultrafiltração tangencial.

Mesmo apresentando perdas de polissacarídeo para o filtrado após a purificação por UF de PRPoxi (18,3% de perdas) ou PRP-ADH (27,5% de perdas), este processo mostrou-se mais vantajoso em relação a purificação por Sephadex G-25. Apesar de também apresentar perdas, estas foram menores (cerca de 22,6% de perda para PRPoxi e 25,5% de perda para PRP-ADH) e não houve necessidade de liofilização posterior. Estas perdas, provavelmente, se devem a linearidade da molécula de PRP e também por causa da pressão aplicada na membrana para promover a filtração.

No que diz respeito as características físico-químicas de PRPoxi ou PRP-ADH, observamos que mesmo aumentando o volume, estas se mantiveram constantes (4,3±0,2 ADH/PRP, média de 3 experimentos não mostrados).

Com a necessidade de obter maior quantidade de PRPoxi e PRP-ADH, aumentamos o volume destas soluções mantendo o mesmo protocolo de reação para PRPoxi e PRP-ADH. O volume máximo testado foi 100mL que foram purificados por UF com membrana de corte nominal de 5kDa. Contudo, algumas perdas de polissacarídeo para fração ultrafiltrada foram observadas. O Laboratório de Bioprocessos (Instituto Butantan) que atualmente trabalha no melhoramento da purificação de PRP nativo também relatou a passagem de polissacarídeo para o ultrafiltrado usando membrana de corte nominal de 100kDa (dado reportado oralmente por Silvia Albani).

O estudo desta **ETAPA 1** permitiu concluir que mantendo o mesmo protocolo de ativação de PRP e adotando como metodologia de purificação a UF, foi possível obter PRP ativado com características semelhantes às anteriormente encontradas (**Figura 15**).

Características físico-químicas do PRP-ADH ao final da **ETAPA 1**: MM 14kDa, ADH/PRP 4.

Etapa 1 – Ativação de PRP

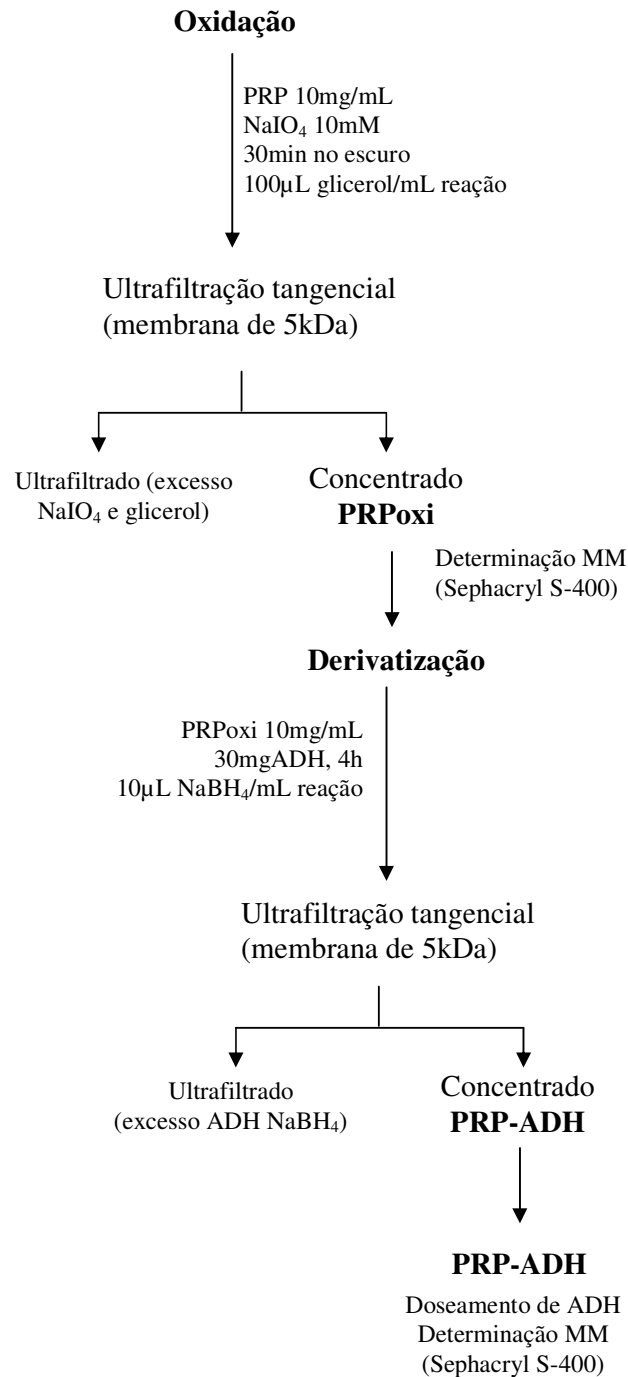


Figura 15: Fluxograma da **ETAPA 1** do Método de conjugação Hidrazona. **Etapa 1** – Ativação de PRP.

5.2.2 Conjugação – ETAPA 2

Os ensaios de conjugação testados nesta segunda etapa foram com 50mg e 200mg de PRP, o que significa um aumento final de 5 e 20 vezes em relação a quantidade anterior.

A **tabela 10** mostra os resultados obtidos quando usamos uma quantidade maior de polissacarídeo na conjugação. Nos testes realizados com 50mg de PRP-ADH ou com 200mg os rendimentos de conjugação foram semelhantes ($45,8 \pm 4,5\%$ para conjugação com 50mg de PRP-ADH e $47,5 \pm 1,9\%$ para conjugação com 200mg de PRP-ADH). Quando estes foram comparados com os experimentos realizados com 10mg de PRP-ADH, cujo rendimento é de $80,5 \pm 3,5$, notamos que houve decréscimo de quase 50% no rendimento final .

Tabela 10: Caracterização química e rendimento de conjugação PRP-ADH-TT em escala ampliada usando diferentes quantidades de PRP-ADH e TT.

Conjugado PRP-ADH-TT ¹						
PRP-ADH total (mg)	TT total (mg)	PRP Hib ² (mg)	TT ³ (mg)	PRP-ADH/TT (mg/mg)	nPRP/nTT ⁴	Rendimento (%) ⁵
10	2,5	8,1±0,3	2,5±0	3,2±0,2	38,7±0,2	80,5±3,5
50	12,5	22,9±2,2	23,6±0,6	0,9±0,1	11,1±0,8	45,8±4,5
200	50	95,1±3,7	25,0±2,4	3,8±0,2	44,0±2,5	47,5±1,8

1 – Conjugado PRP-ADH-TT obtido a partir da reação entre PRP-ADH e TT. Média de 2 experimentos realizados.

2,3 – Quantidade de PRP-ADH e TT encontradas no conjugado PRP-ADH-TT, após purificação em gel filtração.

4 – Relação número de mol PRP-ADH e número de mol TT encontrado no conjugado final. Massa molecular de PRP-ADH 13kDa, massa molecular de TT 150kDa.

5 – Rendimento de conjugação relaciona a quantidade de PRP-ADH encontrada no conjugado e a quantidade de PRP-ADH inicial empregada na reação.

Doseamento de PRP pelo método Orcinol e doseamento de proteína pelo método de Lowry.

Ao que tudo indica, a **ETAPA 1** do protocolo proposto manteve suas características químicas e rendimento quando em uma escala maior. No entanto, o mesmo não ocorreu com a **ETAPA 2**. Analisando mais detalhadamente constatamos que o único reagente adicionado nesta fase e que é o principal responsável pela efetiva ligação entre o PRP-ADH e a proteína é o EDAC. Por esta razão a presença do EDAC nesta segunda etapa da conjugação exigiu um

estudo mais profundo.

De modo a explicarmos a perda do rendimento de conjugação na **ETAPA 2** trabalhamos em cima de algumas hipóteses relacionadas com a concentração de EDAC:

- 1) A quantidade de EDAC não teria sido suficiente para ativar todas as carboxilas e então a disponibilidade de carboxilas ativadas para conjugação seria inferior;
- 2) Inibição pelo produto de degradação do EDAC. O EDAC quando em solução é muito instável podendo reagir com diferentes componentes do meio como: grupos sulfidrilas, aminos e carboxílicos, aminoácidos (tirosina), água e outros componentes (WROBEL *et al.*, 2002). Após a ativação de carboxilas o EDAC se transforma em seu derivado de uréia *N*-etil-*N'*-(dimetilaminopropil)uréia (EDU). Esta atividade catalítica do EDAC é dependente de pH, quantidade de grupos -COOH e de tempo de reação (LEI *et al.*, 2002; WROBEL *et al.*, 2002). O EDU poderia estar interferindo na reação entre a hidrazida do ADH e a carboxila do TT fazendo com o rendimento da conjugação máximo não seja atingido.

Para testar estas hipóteses fizemos alguns experimentos. No primeiro ensaio adicionamos mais EDAC ao conjugado PRP-ADH-TT após 2 dias de conjugação. As condições de conjugação testadas e analisadas foram:

- ❖ Conjugado controle: 50mg PRP-ADH, 12,5mg TT em concentrações iniciais de 0,5mg/mL, pH8, 2 dias de reação, TT ativado com 1M EDAC;
- ❖ Conjugado 1: 50mg PRP-ADH, 12,5mg TT em concentrações iniciais de 0,5mg/mL, pH8, 2 dias de reação, TT ativado com 1M EDAC + **0,2M EDAC**
- ❖ Conjugado 2: 50mg PRP-ADH, 12,5mg TT em concentrações iniciais de 0,5mg/mL, pH8, 2 dias de reação, TT ativado com 1M EDAC + **0,5M EDAC**
- ❖ Conjugado 3: 50mg PRP-ADH, 12,5mg TT em concentrações iniciais de 0,5mg/mL, pH8, 2 dias de reação, TT ativado com 1M EDAC + **1M EDAC**

Os resultados apresentados na **tabela 11** indicam que a adição posterior de EDAC nos conjugados não melhorou o rendimento final. O rendimento alcançado em todas as condições

foi semelhante ao rendimento do conjugado controle ($\pm 46\%$) e, ainda, inferior a este em mais de 10%, quando adicionada concentração extra de 1M de EDAC (Conjugado 3). Desta forma, podemos inferir que as carboxilas do TT estejam ativadas e a presença de mais EDAC não interfere no rendimento final de conjugação.

Tabela 11: Avaliação da interferência de EDAC no rendimento de conjugação de PRP-ADH e TT em experimento com adição de diferentes quantidades de carbodiimida.

Conjugado	PRP Hib ² (mg)	Conjugado PRP-ADH-TT ¹			Rendimento (%) ⁵
		TT (mg) ³	PRP-ADH/TT (mg/mg)	nPRP/nTT ⁴	
controle*	22,9	23,6	1	11,1	45,8
Conjugado 1 +0,2M EDAC	22,3	19,3	1,15	13,3	44,6
Conjugado 2 +0,5M EDAC	20,8	14,2	1,4	16,9	41,7
Conjugado 3 +1M EDAC	15,5	9,8	1,6	18,3	31,1

1 – Conjugado PRP-ADH-TT obtido a partir da reação entre PRP-ADH e TT.

2,3 – Quantidade de PRP-ADH e TT encontradas no conjugado PRP-ADH-TT, após purificação em gel filtração.

4 – Relação número de mol PRP-ADH e número de mol TT encontrado no conjugado final. Massa molecular de PRP-ADH 13kDa, massa molecular de TT 150kDa.

5 – Rendimento de conjugação relaciona a quantidade de PRP-ADH encontrada no conjugado e a quantidade de PRP-ADH inicial empregada na reação. Doseamento de PRP pelo método Orcinol e doseamento de proteína pelo método de Lowry.

*controle: 50mg PRP-ADH, 12,5mg TT em concentrações iniciais de 0,5mg/mL, tampão Na₂HPO₄ 0,1M, NaCl 0,15M, pH8, TT ativado com 1M EDAC, 2 dias de reação

Para averiguar a segunda hipótese realizamos o seguinte experimento: o conjugado, após 2 dias de reação, foi concentrado em Centriprep (Amicon) de corte nominal de 3kDa para a retirada do excesso de EDU, uma vez que a massa molecular deste composto é de inferior a 37Da (massa molecular do EDAC) e em seguida uma concentração extra de EDAC foi adicionada. O objetivo deste experimento foi avaliar a possível interferência de EDU no rendimento de conjugação.

A condição de conjugação analisada foi semelhante à condição de conjugação controle com adição posterior de 0,5M de EDAC após concentração em Centriprep.

Neste mesmo ensaio, ainda com objetivo de notar a interferência do EDU no rendimento de conjugação, realizamos outro conjugado cuja condição foi semelhante à condição controle, contudo TT ativado com EDAC foi diluído com uma solução de EDAC pH5 previamente preparada (EDAC 1M a pH5 sob agitação lenta por 5h) para que todo EDAC se transforme em EDU (LEI *et al.*, 2002; WROBEL *et al.*, 2002).

A **tabela 12** mostra os detalhes dos conjugados testados neste experimento sobre a avaliação da interferência de EDU.

Tabela 12: Avaliação da interferência de EDU no rendimento de conjugação de PRP-ADH e TT.

Conjugado	Conjugado PRP-ADH-TT ¹				Rendimento (%) ⁵
	PRP Hib ² (mg)	TT (mg) ³	PRP-ADH/TT (mg/mg)	nPRP/nTT ⁴	
controle*	22,9	23,6	1,0	11,1	45,8
[3kDa] + 1M EDAC**	19,0	17,8	1,06	12,3	38,0
solução EDAC 1M pH5***	19,4	18,2	1,06	12,3	38,9

1 – Conjugado PRP-ADH-TT obtido a partir da reação entre PRP-ADH e TT. Doseamento de PRP pelo método Orcinol e doseamento de proteína pelo método de Lowry.

2,3 – Quantidade de PRP-ADH e TT encontradas no conjugado PRP-ADH-TT, após purificação em gel filtração.

4 – Relação número de mol PRP-ADH e número de mol TT encontrado no conjugado final. Massa molecular de PRP-ADH 13kDa, massa molecular de TT 150kDa.

5 – Rendimento de conjugação relaciona a quantidade de PRP-ADH encontrada no conjugado e a quantidade de PRP-ADH inicial empregada na reação.

*controle: 50mg PRP-ADH, 12,5mg TT em concentrações iniciais de 0,5mg/mL, tampão Na₂HPO₄ 0,1M, NaCl 0,15M, pH8, TT ativado com 1M EDAC, 2 dias de reação

** [3kDa] +1MEDAC: conjugado controle concentrado em Centriprep de 3kDa, adição de 0,5M EDAC ao concentrado de 3kDa e a reação seguiu por mais 2 dias.

*** solução EDAC 1M pH5: conjugado controle. TT ativado com 1M EDAC solução preparada previamente em pH5 por 5h.

Segundo os resultados detalhados na **tabela 12**, notamos que o produto de degradação do EDAC, EDU, não interfere no rendimento da conjugação, pois em relação ao conjugado controle não houve alteração.

A terceira hipótese para perda de rendimento tem relação com a instabilidade do

EDAC em solução. Esta instabilidade pode ser revertida na presença *N*-hidroxisuccinimida (NHS) (WROBEL *et al.*, 2002; SEHGAL e VIJAY, 1994) que eleva consideravelmente o tempo de meia vida de EDAC em solução.

NHS são ésteres ativos hidrofílicos que sofrem hidrólise mais lentamente quando comparado com a taxa de reação com aminogrupos. Embora somente NHS seja suficiente para a ativação de grupos -COOH, quando EDAC e NHS encontram-se em uma mesma solução a eficiência desta reação é maior (WROBEL *et al.*, 2002; SEHGAL e VIJAY, 1994). De acordo com Hermanson (1996) uma solução de 5mM de Sulfo-NHS seria suficiente para melhorar a estabilidade do EDAC.

Em um primeiro momento avaliamos o rendimento da conjugação na presença de EDAC 1M e Sulfo-NHS 5mM (**Tabela 13**). Este ensaio foi realizado conforme conjugado controle. A quantidade de PRP-ADH variou (10, 50 e 200mg) e em função disto a quantidade de TT também variou mantendo a proporção 4:1 (massa final).

A presença de Sulfo-NHS melhorou a estabilidade do EDAC e conseqüentemente, do intermediário *O*-acilisourea, pois o rendimento da reação manteve-se alto (83,2%, média dos rendimentos) mesmo quando aumentamos a quantidade de polissacarídeo na reação. Os conjugados sem Sulfo-NHS não mantiveram os mesmos rendimentos.

Os resultados promissores nos levaram a avaliar novamente a influência da concentração inicial dos reagentes PRP-ADH e TT e o tempo da reação no rendimento da conjugação para facilitar o escalonamento. O pH ótimo de trabalho para ativação de proteínas por EDAC e Sulfo-NHS é entre 7-8 (Catálogo Pierce), por isto este parâmetro não foi reavaliado.

Tabela 13: Avaliação da presença de Sulfo-NHS e EDAC no rendimento de conjugação de PRP-ADH e TT.

Conjugado PRP-ADH-TT ¹							
	PRP-ADH total (mg)	TT total (mg)	PRP Hib ² (mg)	TT(mg) ³	PRP-ADH/TT (mg/mg)	nPRP/nTT ⁴	Rendimento (%) ⁵
com Sulfo-NHS	10	2,5	8,5	2,34	3,6	41,9	85
	50	12,5	40,6	11,21	3,6	41,8	81,3
	200	50	167	42,1	3,9	45,7	83,5
sem Sulfo-NHS	10	2,5	8,2	2,2	3,7	42,8	82
	50	12,5	22,3	8,7	2,5	29,3	44,6
	200	50	84,6	22,2	3,8	43,9	42,3

1 – Conjugado PRP-ADH-TT obtido a partir da reação entre PRP-ADH e TT. Doseamento de PRP pelo método Orcinol e doseamento de proteína pelo método de Lowry.

2,3 – Quantidade de PRP-ADH e TT encontradas no conjugado PRP-ADH-TT, após purificação em gel filtração.

4 – Relação número de mol PRP-ADH e número de mol TT encontrado no conjugado final. Massa molecular de PRP-ADH 13kDa, massa molecular de TT 150kDa.

5 – Rendimento de conjugação relaciona a quantidade de PRP-ADH encontrada no conjugado e a quantidade de PRP-ADH inicial empregada na reação.

Condição de conjugação das linhas sem preenchimento: PRP-ADH e TT em concentrações iniciais de 0,5mg/mL, PRP-ADH:TT (4mg:1mg), tampão Na₂HPO₄ 0,1M, NaCl 0,15M, pH8, 2 dias de reação. Proteína previamente ativada com 1MEDAC e 5mM de Sulfo-NHS por 30 min.

Condição de conjugação das linhas alaranjadas: PRP-ADH e TT em concentrações iniciais de 0,5mg/mL, PRP-ADH:TT (4mg:1mg), tampão Na₂HPO₄ 0,1M, NaCl 0,15M, pH8, 2 dias de reação. Proteína ativada previamente com 1MEDAC por 30 minutos.

A **tabela 14** apresenta os dados do ensaio no qual a variável foi a concentração de PRP-ADH e TT:

Tabela 14: Reavaliação da concentração de PRP-ADH e TT no rendimento de conjugação.

Conjugado PRP-ADH-TT ¹							
PRP-ADH TT (mg/mL) ²	PRP- ADH total (mg)	TT total (mg)	PRP Hib ³ (mg)	TT(mg) ³	PRP- ADH/TT (mg/mg)	nPRP/nTT ⁴	Rendimento (%) ⁵
0,5	50	12,5	40,6	11,2	3,6	41,8	81,3
	200	50	152,8	42,7	3,6	41,3	76,4
1,0	50	12,5	39,5	10,9	3,6	41,8	79,1
	200	50	166,4	45,5	3,6	42,2	83,2
2,0	50	12,5	21,6	9,8	2,2	25,4	43,3
	200	50	80,8	33,3	2,4	27,9	40,4

1 – Conjugado PRP-ADH-TT obtido a partir da reação entre PRP-ADH e TT.

Condição de conjugação: PRP-ADH:TT (4mg:1mg), tampão Na₂HPO₄ 0,1M, NaCl 0,15M, pH8, 2 dias de reação. Proteína previamente ativada com 1MEDAC e 5mM de Sulfo-NHS por 30 min.

2 – Concentração inicial de PRP-ADH e TT

3 – Quantidade de PRP-ADH e TT encontradas no conjugado PRP-ADH-TT, após purificação em gel filtração.

4 – Relação número de mol PRP-ADH e número de mol TT encontrado no conjugado final. Massa molecular de PRP-ADH 13kDa, massa molecular de TT 150kDa.

5 – Rendimento de conjugação relaciona a quantidade de PRP-ADH encontrada no conjugado e a quantidade de PRP-ADH inicial empregada na reação.

Doseamento de PRP pelo método Orcinol e doseamento de proteína pelo método de Lowry.

Com a adição de Sulfo-NHS houve uma melhora no rendimento mesmo com os reagentes mais concentrados: 1mg/mL (rendimento final 79,1% para 50mg de PRP-ADH e 83,2% para conjugação com 200mg de PRP-ADH). Já quando a concentração dos reagentes foi de 2 mg/mL houve queda no rendimento final (43,3% para reação com 50mg de PRP-ADH e 40,4% para reação com 200mg de PRP-ADH). Não foi possível avaliar o rendimento de conjugação em concentrações superiores a 2mg/mL, contudo é possível inferir que este seja ainda menor com base nos experimentos já realizados (**Tabela 8**). Em vista dos ensaios apresentados na **tabela 14**, adotamos a concentração de 1mg/mL para conjugações futuras.

O tempo de reação também foi reavaliado (**Tabela 15**) e gerou novos resultados interessantes. Trabalhamos com tempos de reação inferiores (4h, 8h, 12h, 24h e 48h) aos já descritos neste trabalho (**Figura 16**).

Os dados da tabela sugerem aumento gradativo no rendimento de conjugação, o valor máximo foi atingido 24h de reação (83,4%). Em tempo de reação superior a 24h o rendimento

se mantém relativamente estável ou com uma ligeira queda (77,8%).

Tabela 15: Reavaliação da influência do tempo no rendimento de conjugação.

Tempo (h)	Conjugado PRP-ADH-TT ¹						Rendimento (%) ⁵
	PRP-ADH total (mg)	TT total (mg)	PRP Hib ² (mg)	TT(mg) ³	PRP- ADH/TT (mg/mg)	nPRP/nTT ⁴	
4	50	12,5	2,7	3,8	0,7	8,4	5,5
8	50	12,5	7,9	6,5	1,2	13,9	15,8
12	50	12,5	21,9	10,8	2,0	23,4	43,9
24	50	12,5	41,7	11,4	3,6	42,0	83,4
48	50	12,5	38,9	11,5	3,4	39	77,8

1 – Conjugado PRP-ADH-TT obtido a partir da reação entre PRP-ADH e TT.

Condição de conjugação: 50mg PRP-ADH, 12,5 mg TT em concentrações iniciais de 1mg/mL, tampão Na₂HPO₄ 0,1M, NaCl 0,15M, pH8. Proteína previamente ativada com 1MEDAC e 5mM de Sulfo-NHS por 15 min.

2,3 – Quantidade de PRP-ADH e TT encontradas no conjugado PRP-ADH-TT, após purificação em gel filtração.

4 – Relação número de mol PRP-ADH e número de mol TT encontrado no conjugado final. Massa molecular de PRP-ADH 13kDa, massa molecular de TT 150kDa.

5 – Rendimento de conjugação relaciona a quantidade de PRP-ADH encontrada no conjugado e a quantidade de PRP-ADH inicial empregada na reação.

Doseamento de PRP pelo método Orcinol e doseamento de proteína pelo método de Lowry.

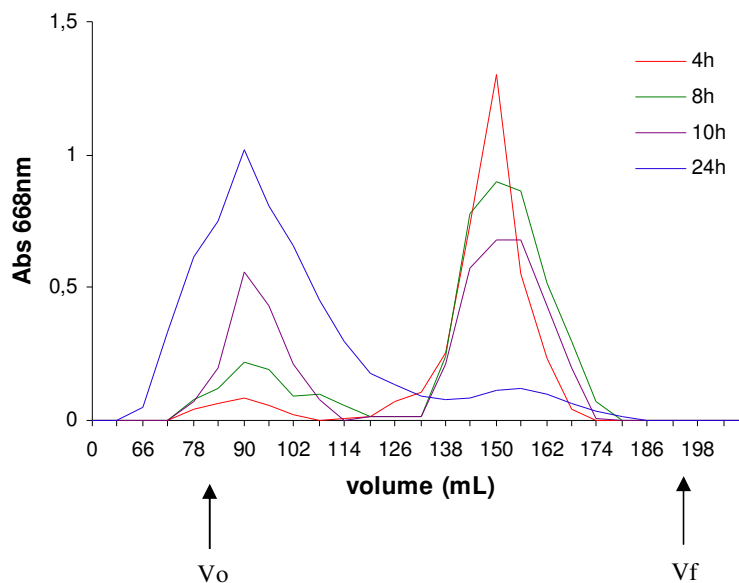


Figura 16: Análise do perfil cromatográfico do conjugado em diferentes tempos de reação. Condição de conjugação: 50mg PRP-ADH, 12,5mg TT em concentrações iniciais de 1mg/mL, tampão Na_2HPO_4 0,1M, NaCl 0,15M, pH8, TT ativado com 1M EDAC e 5mM de Sulfo-NHS por 30 min, 2 dias de reação

Na **figura 16** podemos acompanhar a formação do conjugado analisado por cromatografia de filtração em gel. Nesta figura está representado somente a eluição do PRP-ADH. O primeiro pico, logo após V_0 , corresponde ao volume de eluição do conjugado sendo observado a saída concomitante de PRP e TT (curva de eluição de TT não apresentada). O segundo pico corresponde a saída somente de PRP-ADH livre. Claramente, conforme o tempo de reação aumenta, notamos uma diminuição no pico de eluição de PRP livre e um aumento no pico de eluição do conjugado.

Pensando em aumento de escala, realizamos alguns ensaios preliminares purificando o conjugado por UF. Os resultados apontaram uma aparente hidrólise do PRP-ADH (**Figura 17 A**) quando não havia Sulfo-NHS na reação de conjugação. Este quadro parece reverter com a adição de Sulfo-NHS à reação preservando a estrutura do PRP-ADH (**Figura 17 B**).

O estudo detalhado da **ETAPA 2** permitiu que o rendimento de conjugação permanecesse inalterado quando houve aumento de 5 ou 20 vezes a escala de bancada (**Figura 18**). A UF como alternativa a filtração em cromatografia mostrou-se eficiente na purificação do conjugado somente após adição de Sulfo-NHS.

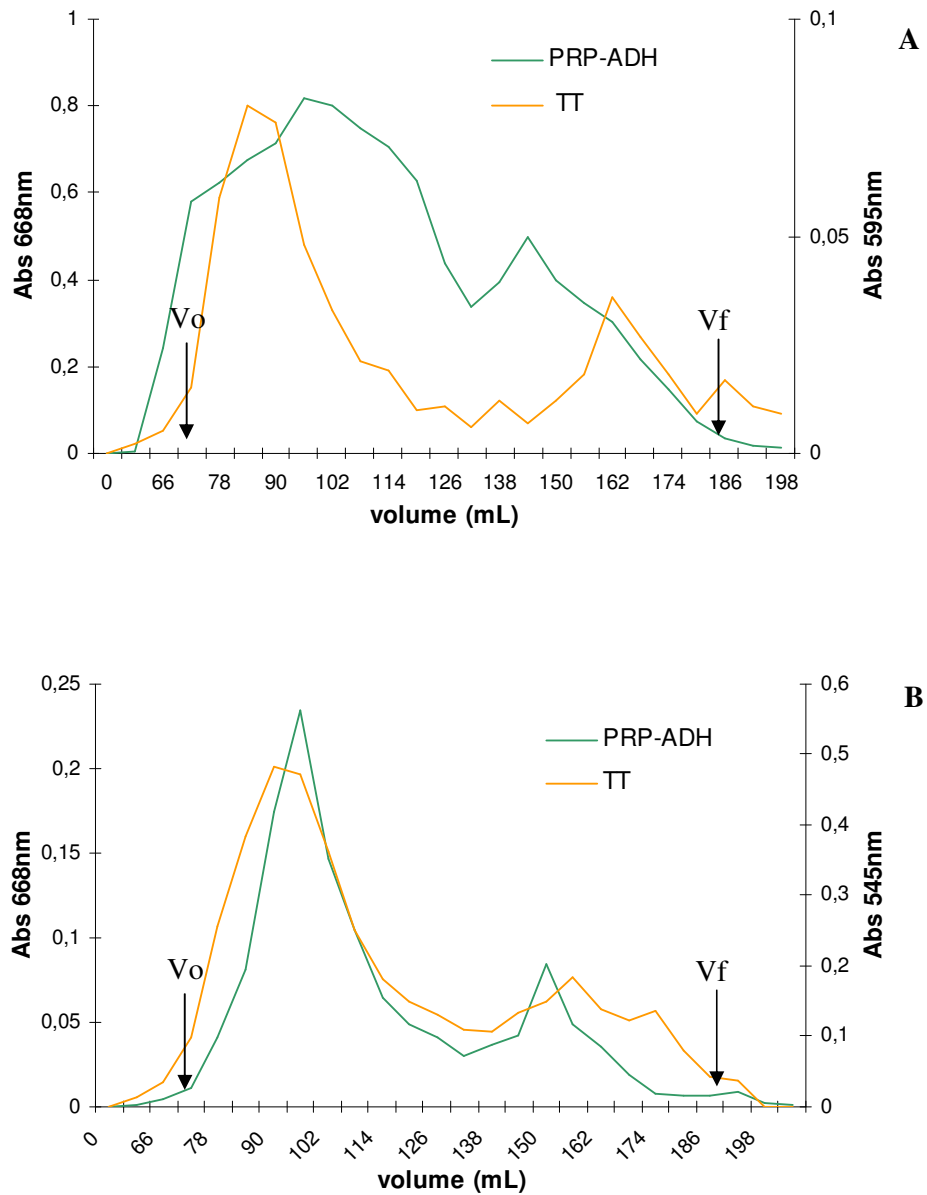


Figura 17: Perfil cromatográfico de um conjugado purificado em ultrafiltração tangencial com membrana de corte nominal de 100kDa. **(A)** conjugado sem Sulfo-NHS. **(B)** conjugado com Sulfo-NHS. Condição de conjugação: 50mg PRP-ADH, 12,5mg TT em concentrações iniciais de 1mg/mL, tampão Na₂HPO₄ 0,1M, NaCl 0,15M, pH8, TT ativado com 1M EDAC e 5mM de Sulfo-NHS por 30 min, 2 dias de reação.

Etapa 2 – Conjugação de PRP e TT

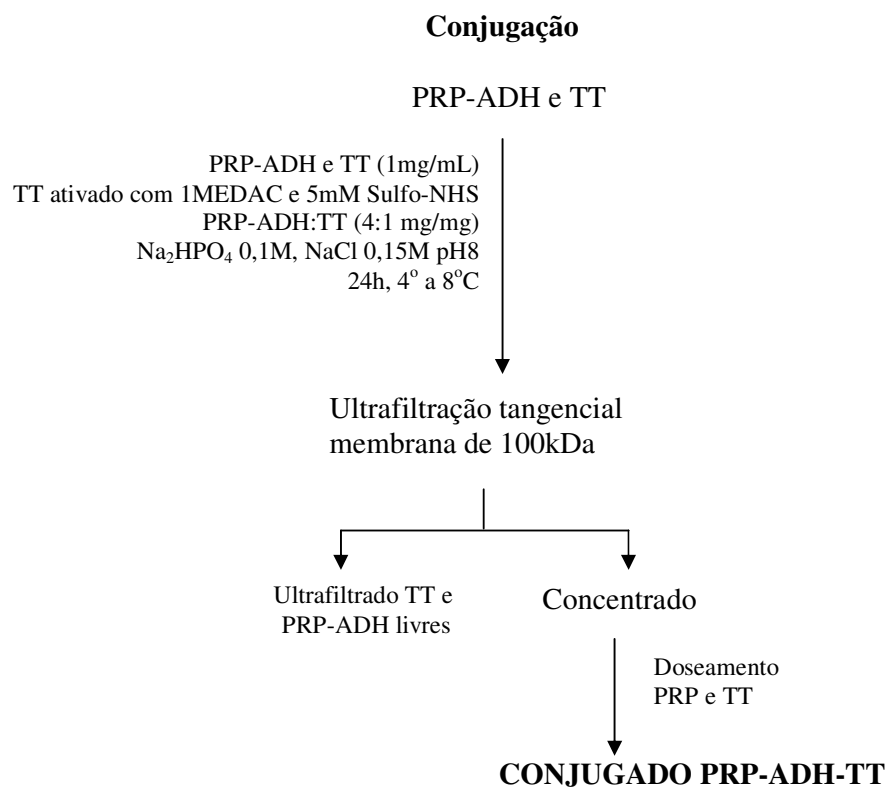


Figura 18: Fluxograma da ETAPA 2 – Conjugação de PRP-ADH e TT.

Em conclusão, a adição de Sulfo-NHS à reação de conjugação permitiu:

- ✓ O rendimento da reação permaneceu elevado (~80%) mesmo quando aumentamos a quantidade de PRP na reação;
- ✓ O tempo de conjugação para que tal rendimento fosse atingido passou de 48h para 24h;
- ✓ A concentração dos componentes passou de 0,5mg/mL para 1mg/mL.
- ✓ Preservação do PRP-ADH nos ensaios de purificação por UF.

O método Hidrazona estabelecido neste estudo apresenta diversas vantagens em relação aos demais métodos de conjugação descritos na literatura: é composto de apenas 2 etapas simples, de fácil reprodutibilidade e escalonamento, não necessita de reagentes tóxicos para ativação dos componentes, apresenta alto rendimento de conjugação requerendo apenas uma única etapa de concentração por UF.

5.2.3 Purificação do conjugado

Apesar do aumento na concentração dos componentes, o volume de reação a ser purificado ainda é elevado para a técnica normalmente aplicada, a cromatografia de exclusão molecular, fazendo-se necessário uma etapa de liofilização. Portanto, estudamos algumas alternativas para substituir a cromatografia de filtração.

Além da cromatografia por exclusão molecular (Sephacryl S-400) foram testadas: cromatografia de troca iônica (Q-Sepharose f.f.), cromatografia por interação hidrofóbica (Phenyl Sepharose) e ultrafiltração tangencial (UF) com membrana de corte nominal de 100kDa.

A purificação do conjugado tem por objetivo a remoção dos componentes não conjugados (PRP-ADH, TT e excesso de reagentes – EDAC e Sulfo-NHS) e se faz necessária para seu uso como antígeno vacinal. O PRP-ADH livre não deve ficar no produto final porque a dosagem da vacina é definida pela quantidade de PRP-ADH conjugado. Também há

evidências de que o PRP-ADH não conjugado pode induzir tolerância (KNISKERN e MARBURG, 1994).

A vasta literatura a respeito de purificação de conjugados indica a cromatografia de filtração molecular usando a resina Sepharose CL-4B (LAFERRIÈRE *et al.*, 1997; KISHINO e MIYAZAKI, 1997; SCHNEERSON *et al.*, 1980) como opção para purificação final do conjugado. Além deste tipo de cromatografia, as técnicas de cromatografia de troca iônica (PATO, 2006) e por interação hidrofóbica (PAWLOWSKI *et al.*, 1999) também foram testadas.

Na cromatografia por exclusão molecular a resina testada foi a Sephacryl S-400 HR cuja faixa de separação para dextran está compreendida entre 1×10^4 a 2×10^6 Da e para proteínas a faixa de separação é de 2×10^4 a 8×10^6 Da. A Sephacryl S-400 HR foi escolhida por permitir uma separação de melhor resolução que a Sepharose CL-4B. Ao longo de todo projeto a filtração em gel mostrou-se eficiente na purificação dos conjugados.

A cromatografia por exclusão molecular é um método capaz de separar os componentes conjugados dos não conjugados. A desvantagem deste método é que se trata de uma metodologia demorada devido ao baixo fluxo de trabalho, o volume de amostra aplicado é muito reduzido e, além disso, a amostra é muito diluída no final (NÓBREGA *et al.*, 2005).

A cromatografia de troca iônica baseia-se na ligação de íons com cargas opostas entre a resina e a amostra e na eluição da amostra adsorvida pelo aumento da força iônica ou pela alteração de pH. No caso, a resina testada foi a Q-Sepharose f.f. que é uma resina de troca aniônica. De acordo com a **figura 1**, o grupo fosfato seria o responsável pela carga negativa do polissacarídeo.

Os controles para verificação da força iônica para eluição de PRP-ADH e TT livres foram realizados e estes componentes foram eluídos em duas frações distintas. Entretanto o conjugado é eluído na mesma fração que o PRP-ADH livre (**ANEXO I**). Portanto, a cromatografia de troca iônica não se mostrou um bom método para separação de componentes conjugados do livre.

A maioria das proteínas possui uma região hidrofóbica em sua superfície que permite interação com uma resina hidrofóbica em meio aquoso. As forças responsáveis pela adsorção

a um material carregador deste tipo dependem do aumento da entropia que surge do deslocamento das regiões hidrofóbicas da molécula no meio polar (FILHO e MENDIETA-TABOADA, 2005). Essas forças são aumentadas com o aumento da concentração de sal (*salting out*). Os resíduos de fenil, butil e octil são comumente utilizados como ligantes em cromatografia por interação hidrofóbica. As propriedades hidrofóbicas da Phenyl são favoráveis para purificar a maioria das proteínas sob condições não denaturantes (FILHO e MENDIETA-TABOADA, 2005).

A adsorção do conjugado a resinas hidrofóbicas depende do grau de substituição do conjugado (quantidade de polissacarídeo ligado a proteína) e também do tamanho do polissacarídeo (PAWLOWSKI *et al.*, 1999). A ligação de conjugados muito substituídos ou com polissacarídeos de alto peso molecular à resina de interação hidrofóbica é mais fraca em relação a conjugados pouco substituídos ou com polissacarídeos de baixo peso molecular. No trabalho descrito por Pawlowski e colaboradores (1999), o conjugado polissacarídeo-proteína foi eluído da resina Phenyl-Sepharose na presença de 30% de Isopropanol, enquanto que os reagentes livres foram eluídos separadamente.

A cromatografia por interação hidrofóbica (Phenyl Sepharose f.f.), da mesma maneira que a troca iônica permitiu separar os componentes livres em picos distintos, no entanto a separação do conjugado do restante foi pouco eficiente, pois o conjugado eluiu muito próximo do pico de eluição de polissacarídeo (**ANEXO J**).

Os resultados encontrados, tanto na Q-Sepharose f.f. quanto na Phenyl Sepharose f.f., sugerem que provavelmente a ligação do PRP-ADH ao TT não foi suficiente para alterar a carga final do PRP e também não foi suficiente para alterar a hidrofobicidade final da proteína.

A última metodologia testada foi a UF com membrana de corte nominal de 100kDa. O corte da membrana foi escolhido com base nos resultados obtidos em escala de bancada no qual a fração conjugada foi eluída em Sephacryl S-400 logo após o “void volume” sugerindo um composto de alta massa molecular.

A solução de conjugação foi concentrada em sistema Labscale® (Millipore) na qual obtivemos 2 frações denominadas ultrafiltrado e concentrado. Na fração concentrada encontramos PRP-ADH e TT e na fração ultrafiltrada apenas PRP-ADH. O concentrado foi

então aplicado em Sephacryl S-400 para verificação da eficiência da separação por ultrafiltração. De acordo com a **figura 17B**, observamos que a UF pode ser uma metodologia alternativa à filtração em gel na purificação do conjugado.

Neste estudo para purificação do conjugado observamos que a cromatografia por exclusão molecular e a UF foram as metodologias que melhor purificaram o conjugado, separando-o dos componentes não conjugados.

A UF é uma técnica de purificação de macromoléculas, mas sua aplicação na área de separação de bioconjugados ainda não é muito expandida. Segundo Lee e Frasch (2004) o emprego da UF é recomendado quando o rendimento de conjugação é alto não havendo, portanto, a necessidade de remoção dos componentes não conjugados. Portanto, a falta de trabalhos relacionando a técnica e conjugação se deve ao baixo rendimento dos processos de conjugação. Desta forma, a purificação do conjugado poderia ser simplificada a uma etapa de diafiltração para remoção de moléculas pequenas. No nosso caso, o alto rendimento de conjugação alcançado justificaria o uso da UF evitando assim a cromatografia de exclusão molecular.

5.3 Testes de imunogenicidade

Foi medido IgG anti-PRP com a finalidade de comprovar a eficácia do conjugado PRP-ADH-TT como antígeno vacinal. Todos os testes foram feitos utilizando-se a vacina Hiberix como controle positivo (**Materiais e Métodos** item **4.5**).

Nos primeiros ensaios de imunização empregamos camundongos Swiss (**Materiais e Métodos** item **4.5.1**). As análises dos resultados dos ensaios de ELISA para determinação do título de anticorpos anti-PRP em camundongos revelaram que em todos os grupos houve baixa produção de anticorpos, mesmo após 3 doses. O grupo controle que foi imunizado com a vacina Hiberix também não resultou em produção expressiva de anticorpos anti-PRP (resultado não mostrado).

Camundongos, normalmente, não respondem ao componente polissacarídeo do conjugado após a administração da primeira dose, mas respondem bem à segunda e terceira dose (GUPTA *et al.*, 1992). Em contradição, em nossos experimentos não observamos indução de anticorpos anti-PRP mesmo após o esquema de imunização completo. Outros autores encontraram achados semelhantes aos nossos (FUSCO *et al.*, 1997). Em particular, camundongos não respondem bem à vacinas conjugadas contendo TT ou CRM₁₉₇ como carregadores protéicos (FUSCO *et al.*, 1997; SIBER *et al.*, 1995).

Gupta e colaboradores (1999) e Fuscoe colaboradores (1997) indicam a cobaia como modelo animal mais adequado, pois esta apresentaria resposta de anticorpos contra PRP semelhante a encontrada em humanos. Entre outras semelhanças, cobaias com peso até 400g e crianças até os 18 meses de idade, não respondem bem a imunização de vacina de PRP Hib não conjugada (SIBER *et al.*, 1995).

Cobaias são normalmente empregadas em testes de potência de vacinas infantis, particularmente em vacinas anti-tétano e difteria (FITZGERALD, 1991), tornado-as mais úteis para testes com vacinas DTP em combinação com Hib (SIBER *et al.*, 1995). Este modelo animal gera uma grande variedade na resposta de anticorpo entre indivíduos do mesmo grupo podendo refletir tanto no desvio padrão do título como no intervalo de confiança. Cobaias, em ensaios de imunogenicidade com vacinas conjugadas contra Hib necessitam de pelo menos 3 doses de antígeno para que o título máximo seja atingido (FUSCO *et al.*, 1998).

O esquema de imunização adotado para estes animais está detalhado no capítulo **Materias e Métodos** (item 4.5.2). A **tabela 16** apresenta a caracterização química das vacinas utilizadas.

Tabela 16: Parâmetros físico-químicos dos antígenos vacinais administrados em cobaias.

Grupo experimental	MM PRP (kDa)	PRP-ADH/TT ⁵ (mg:mg)	Método de Conjugação
Salina (NaCl 0,9%)	-	-	-
PRP-ADH	13	-	-
PRP-ADH + TT ¹	13	0,3	-
Conjugado 1 ²	13	0,28	Hidrazona
Conjugado Hidrazona ³	13	3,6	Hidrazona
Conjugado Aminoação Redutiva ⁴	13	0,15	Aminoação Redutiva
Hiberix	1X10 ⁵	0,3	CNBr

1 – PRP-ADH+TT – Antígenos vacinais coadministrado.

2 – Conjugado 1 – condição de conjugação: PRP-ADH e TT (1mg/mL), PRP-ADH:TT (4mg:mg), TT ativado com 1M EDAC, Na₂HPO₄ 0,1M, NaCl 0,15M pH 8, 48h de reação. Conjugado purificado por Sephacryl S-400.

3 – Conjugado Hidrazona – condição de conjugação: PRP-ADH e TT (1mg/mL), PRP-ADH:TT (4mg:mg), TT ativado com 1M EDAC e 5mM Sulfo-NHS, Na₂HPO₄ 0,1M, NaCl 0,15M pH 8, 24h de reação. Conjugado purificado por Ultrafiltração Tangencial.

4 – Conjugado Aminoação Redutiva – condição de conjugação: PRPoxi e TT (1mg/mL), PRP-ADH:TT (mg:mg), 4mg de CNNaBH₃, Na₂HPO₄ 0,1M, NaCl 0,15M pH 8, 25 dias de reação.

5 – PRP-ADH/TT – relação entre a quantidade de polissacarídeo e proteína do conjugado em miligramas.

Em ensaios de ELISA com vacinas conjugadas de polissacarídeo, o “coating” da placa deve ser feito com o polissacarídeo. Porém, a ligação do polissacarídeo livre com a placa é muito fraca e uma das formas de melhorar esta ligação seria o uso do polissacarídeo conjugado. O laboratório do Dr. M. Nahn, da Universidade de Birmingham, Alabama disponibiliza um oligossacarídeo de Hib conjugado a albumina sérica humana (HbO-HA) para testes aos produtores e laboratórios de ensaio (**ANEXO K**).

Os primeiros testes de ELISA foram feitos com o HbO-HA. Em paralelo também realizamos ELISA empregando PRP nativo como "coating". Os resultados de ambos foram semelhantes (não apresentados), por isso, adotamos PRP nativo em todos os ensaios subsequentes. O PRP nativo para os ensaios de ELISA foi proveniente de um mesmo lote de fermentação de PRP, garantindo assim as mesmas características físico-químicas.

A análise dos soros individuais dos animais, após administração das 3 doses, permitiu comparar os títulos obtidos anti-PRP entre os grupos experimentais (**Figura 19**). A análise estatística foi realizada pelo teste de Mann Whitney com nível de significância de p<0,05.

Em relação a imunogenicidade, os conjugados testados (Conjugado 1, Conjugado

Hidrazona, Conjugado Amino Redutivo e Hiberix) induziram altos títulos de anticorpo IgG anti-PRP demonstrando que os métodos empregados foram (Hidrazona, Amino Redutivo e CNBr) eficazes na conversão do polissacarídeo em antígeno T-dependente (**Figura 19**). O fato mais relevante deste ensaio é que o Conjugado Hidrazona apresentou níveis de anticorpos anti-PRP comparáveis a vacina Hiberix nas 3 sangrias realizadas.

Os resultados dos ensaios de imunização sugerem que o método Hidrazona foi capaz de estabelecer uma ligação covalente entre PRP-ADH e TT e foi tão eficiente na indução de anticorpos anti-PRP quanto a vacina Hiberix. As principais diferenças entre estas duas vacinas são: método de conjugação, tamanho de PRP e relação final PRP/TT. As semelhanças entre as duas vacinas são: mesmo PRP derivatizado com ADH e proteína carregadora.

O método de conjugação adotado pela empresa fabricante da vacina Hiberix foi o método CNBr, que permite a ativação aleatória dos grupos -OH do polissacarídeo, que ao final desta etapa encontra-se com massa molecular por volta de 1×10^5 . Em seguida o polissacarídeo ativado foi derivatizado com ADH apresentando 4 ADH a cada 100 subunidades de PRP. A ligação com a proteína ocorre após ativação de TT por uma carbodiimida.

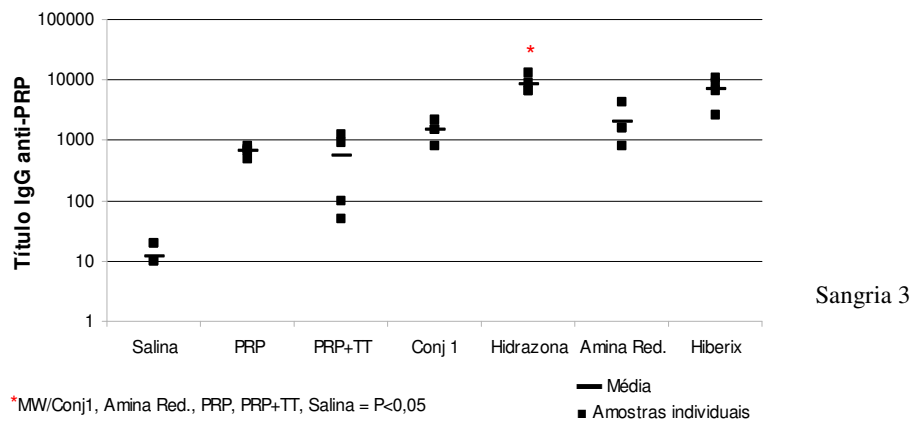
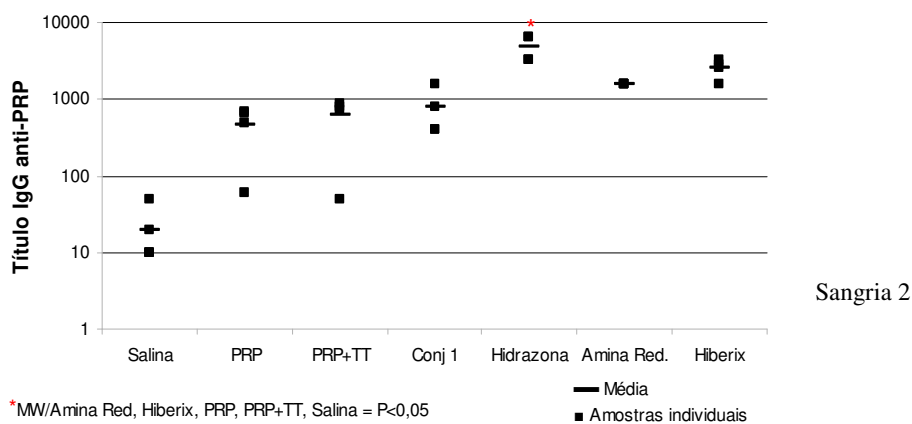
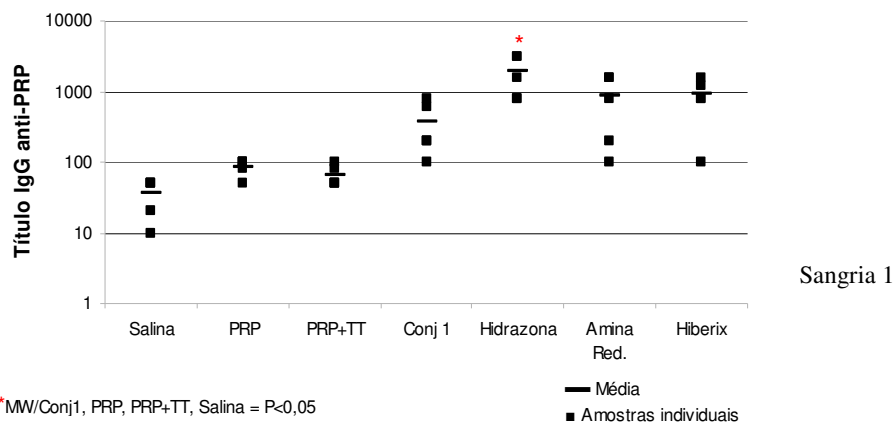


Figura 19: Título de anticorpos IgG anti-PRP em soros individuais de cobaias previamente imunizadas, por via subcutânea, com três doses da vacina em intervalo de 29 dias e as sangrias realizadas nos dias 30, 60 e 90 dias após a primeira dose (3 experimentos). **PRP** – 10µg de PRP, **PRP+TT** – 10µg de PRP-ADH + 30µg TT coadministrado, **Conj1** – 10µg de PRP-ADH – Conjugado PRP-ADH-TT pelo Método Hidrazona (relação final PRP/TT 0,28), **Hidrazona** – 10µg de PRP-ADH – Conjugado PRP-ADH-TT pelo Método Hidrazona (relação final PRP/TT 3,6), **Amina Red.** – 10µg de PRP – Conjugado PRP-TT pelo Método Aminoação Redutiva (relação final PRP/TT 0,15), **Hiberix** – 10µg de PRP – vacina conjugada PRP-ADH-TT pelo Método CNBr (relação final PRP/TT 0,3). Análise estatística realizada pelo teste de Mann Whitney com nível de significância de p<0,05.

Uma revisão dos dados da literatura mostra que os principais fatores que influenciam na imunogenicidade são: tamanho da cadeia do polissacarídeo, relação polissacarídeo/proteína e método de conjugação.

Em outro trabalho, Anderson e colaboradores (1989) usando diferentes tamanhos de polissacarídeo de Hib acoplado a proteína CRM₁₉₇ via Aminoação Redutiva relacionaram o efeito do tamanho da cadeia a indução de resposta imunológica e sugeriram que o tamanho mínimo da cadeia suficiente para induzir uma boa resposta imune em crianças estaria por volta de 20 subunidades repetitivas (7,5kDa).

Conjugados preparados via Aminoação Redutiva contendo moléculas pequenas de polissacarídeo (1 a 4kDa) induziram forte resposta anti-PRP em relação a conjugados preparados pelo método CNBr contendo polissacarídeo de mesmo tamanho. Conjugados com polissacarídeo com tamanho de 40kDa foram analisados imunologicamente e apresentaram uma resposta fraca tanto para os conjugados preparados por Aminoação Redutiva como para aqueles preparados por CNBr (SEPPALA e MAKELA, 1989). Estes resultados corroboram com os achados de Lafférière e colaboradores (1997) e Paoletti e colaboradores (1992).

Dentre as vacinas comerciais disponíveis também percebemos grande variedade com relação a massa molecular do PRP usada, variando de 4×10^4 (HbOC) a 2×10^7 (PRP-D). Também se observa variação no tipo de resposta imune induzida por cada vacina. No entanto, outros fatores, como método de conjugação e tipo de proteína carregadora podem influenciar na resposta imune.

No trabalho recentemente publicado por Silveira e colaboradores (2007), o conjugado PSC-TT preparado pela ativação de PSC por oxidação e ligação deste a proteína derivatizada com hidrazina, promoveu altos título de anticorpos anti-PSC comparáveis aos encontrados por Jennings e Lugowski (1981). Neste segundo artigo o método adotado para conjugação foi Aminoação Redutiva que apresenta uma grande desvantagem que é o tempo de reação que muitas vezes é superior a 2 dias (JENNINGS e LUGOWSKI, 1981; SCHNEERSON *et al.*, 1980).

O teste de avidéz dos soros policlonais serve para análise da medida global da força de interação entre o antígeno e o anticorpo em um determinado soro. Os índices de avidéz (IA) dos anticorpos IgG anti-PRP obtidos em cobaias imunizadas apenas com Conjugado 1,

Conjugado Hidrazona, Conjugado Aminação Redutiva e Hiberix foram determinados (**Figura 20**).

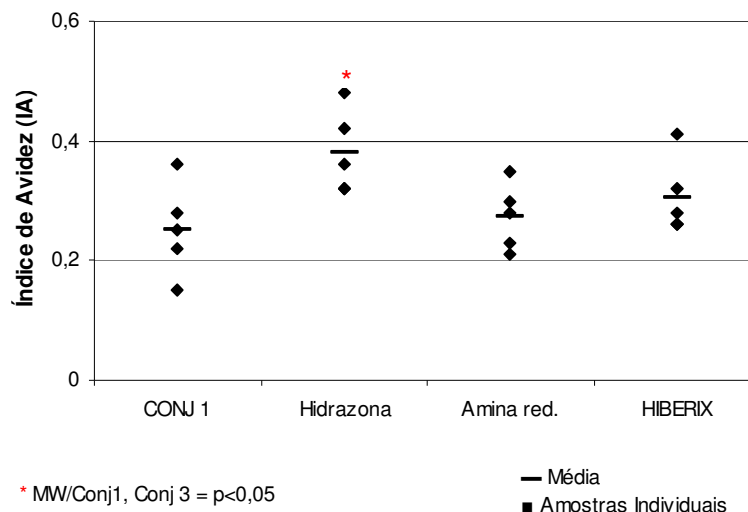


Figura 20: Determinação do índice de avidéz (IA) dos anticorpos IgG anti-PRP em soros individuais (após 90 dias da primeira dose) de cobaias imunizadas com 3 doses dos seguintes antígenos: **Conjugado 1** – Conjugado PRP-ADH-TT pelo Método Hidrazona (relação final PRP/TT 0,28), **Conjugado Hidrazona** – Conjugado PRP-ADH-TT pelo Método Hidrazona (relação final PRP/TT 3,6), **Conjugado Aminação redutiva** – Conjugado PRP-TT pelo Método Aminação Redutiva (relação final PRP/TT 0,15) e **Hiberix** – vacina conjugada PRP-ADH-TT pelo Método CNBr (relação final PRP/TT 0,3). Análise estatística realizada pelo teste de Mann Whitney com nível de significância de p<0,05.

De acordo com a classificação do índice de avidéz (**Materiais e Métodos** item 4.5.4), a avidéz dos anticorpos induzidos pelo Conjugado Hidrazona pode ser classificada entre intermediária a alta, apesar do IA não ser estatisticamente diferente em relação ao IA do grupo imunizado com a vacina Hiberix (teste Mann Whitney, p<0,05). Os outros grupos induziram anticorpos de avidéz baixa ou intermediária (Conjugado 1 e Conjugado Aminação Redutiva).

Goldblatt e colaboradores (1998) obtiveram IA em torno de 0,55 (alta avidéz) em anticorpos IgG gerados por crianças menores de 12 meses imunizadas com vacinas de Hib conjugada a TT. Dados semelhantes foram mostrados no trabalho de Schlesinger e colaboradores (1992) em um estudo que aponta diferenças no IA entre as vacinas comerciais

(PRP-D, HbOC, PRP-OMP, PRP-T) contra Hib. A vacina Hiberix induz anticorpos IgG anti-PRP de alta avidéz em relação a vacina PRP-OMP. Anticorpos com alta avidéz exibem boa atividade bactericida.

5.4 Análise do conjugado PRP-ADH-TT por HPLC

Colunas de exclusão molecular acopladas ao HPLC (High Performance Liquid Chromatography) permitem a análise do perfil do conjugado de uma forma mais rápida do que a cromatografia líquida tradicional ou mesmo o FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography). A técnica de HPSEC (High Performance Size Exclusion Chromatography) permite também o uso de menores quantidades de amostra. Assim, a análise de conjugado PRP-ADH-TT por HPSEC permitiu comparar os perfis cromatográficos dos conjugados obtidos ao perfil da vacina Hiberix. Esta comparação não seria possível em resina Sephacryl S-400, pois a vacina Hiberix já vem formulada na dose final contendo apenas 10µg de PRP conjugado a 30µg de TT.

Os conjugados PRP-ADH-TT não purificado, purificado em Sephacryl S-400 e a vacina Hiberix foram aplicados em coluna de filtração em gel acoplada ao HPLC. As **figuras 21, 22 e 23** apresentam o perfil cromatográfico representativo destas amostras citadas.

No que toca o perfil cromatográfico da vacina Hiberix, é possível observar que este é composto basicamente por um pico principal no tempo de retenção próximo a 5,1 min, seguido de outro pico eluído em tempo de retenção maior (**Figura 21**).

O primeiro pico representa a saída do conjugado e o segundo pico representa provavelmente a lactose adicionada na formulação final da vacina como estabilizante do composto.

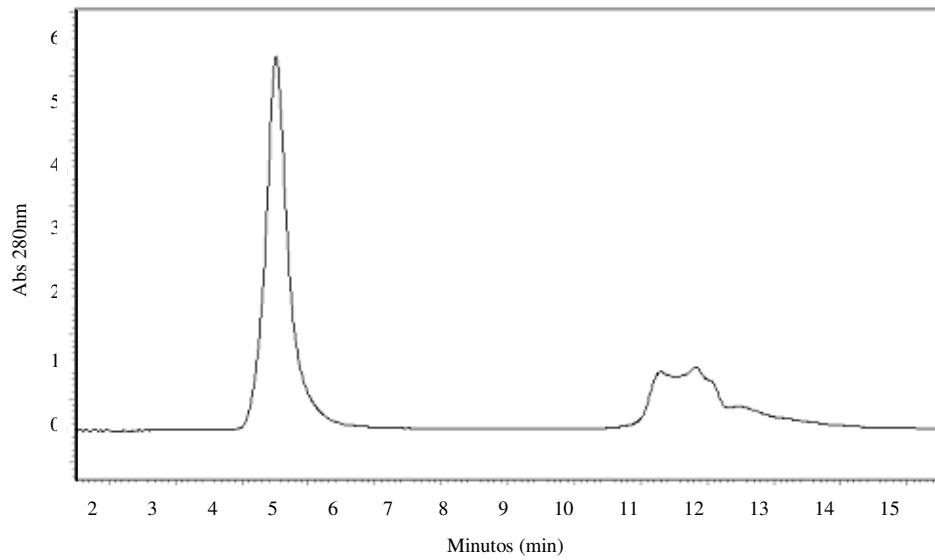


Figura 21: Perfil cromatográfico da vacina Hiberix (0,4 μ g de PRP, 0,6 μ g de TT) aplicada em coluna de filtração em gel TSK ProgelTM G3000 SW acoplada ao HPLC.

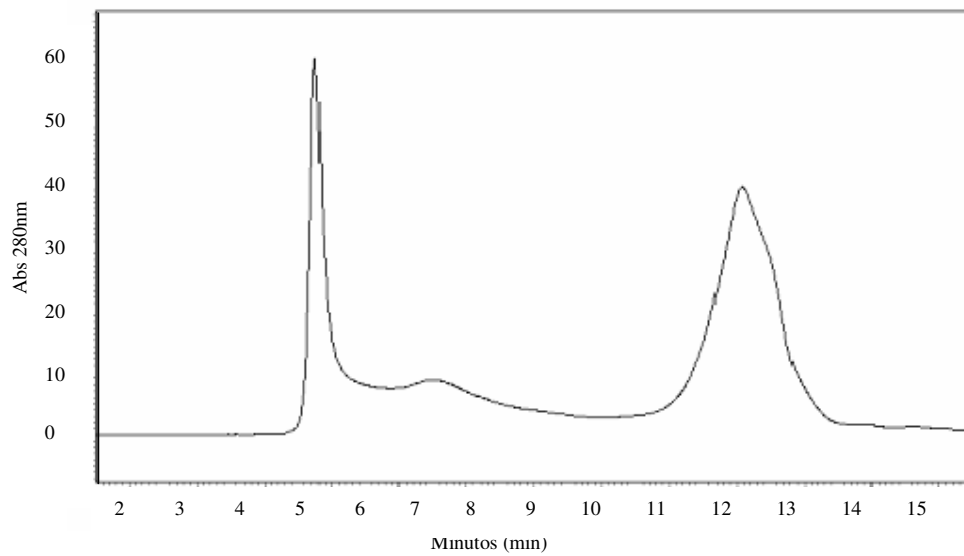


Figura 22: Perfil cromatográfico do conjugado PRP-ADH-TT não purificado (9,6 μ g de PRP-ADH, 45 μ g de TT) aplicado coluna de filtração em gel TSK ProgelTM G3000 SW acoplada ao HPLC.

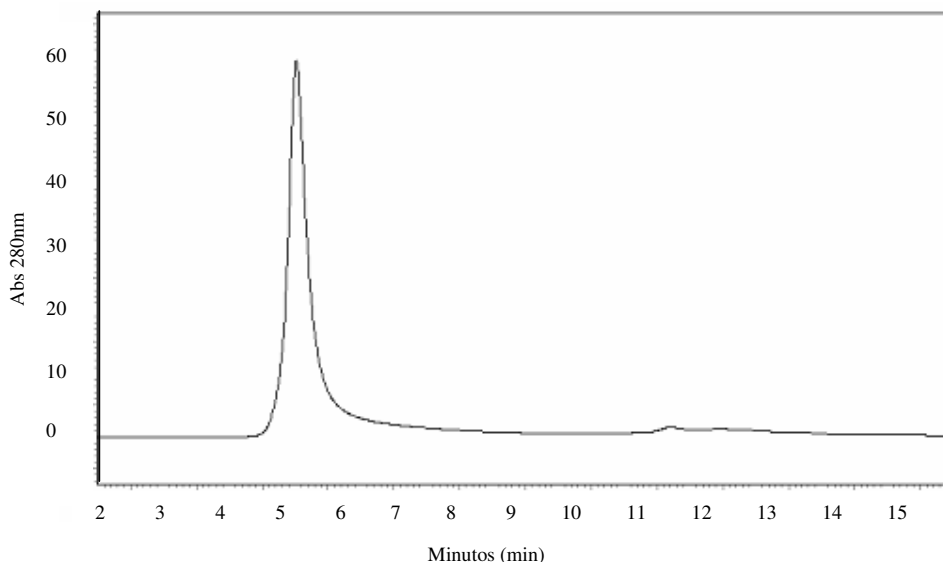


Figura 23: Perfil cromatográfico do conjugado PRP-ADH-TT purificado (5,7 μ g de PRP-ADH, 22,3 μ g de TT) em Sephacryl S-400 e aplicado em coluna de filtração em gel TSK ProgelTM G3000 SW acoplada ao HPLC.

O conjugado PRP-ADH-TT não purificado apresenta um pico principal com tempo de retenção próximo a 5,25 min, seguido de um “ombro” deste pico que corresponde à proteína livre na amostra (tempo de retenção do TT livre 7 min – dados não apresentados) (**Figura 22**). No final da corrida, observamos a eluição de um outro pico considerável no tempo de retenção 11,57 min, equivalente ao tempo de retenção do PRP-ADH livre – (dado não apresentado). A detecção de PRP no comprimento de onda A280nm só foi possível graças a presença do ADH ligado à molécula.

Assim sendo, este perfil cromatográfico veio confirmar a presença concomitante do conjugado PRP-ADH-TT, do TT livre e PRP-ADH livre na amostra não purificada.

O perfil cromatográfico do conjugado PRP-ADH-TT purificado assemelha-se ao perfil apresentado na **figura 21** da vacina Hiberix na medida em que é possível observar um pico principal acentuado no tempo de retenção 5,14 min (**Figura 23**). Contrariamente às outras amostras testadas, não se observou nenhum outro pico adicional com tempo de retenção maior, confirmando a eficiência do processo de purificação por cromatografia de filtração em gel com a resina Sephacryl S-400.

Estes resultados atestam que a técnica de HPSEC pode ser usada como ferramenta para acompanhar o estabelecimento da ligação entre PRP-ADH e TT.

5.5 Teste de estabilidade acelerada do conjugado PRP-ADH-TT

O teste de estabilidade acelerada é comumente utilizado no controle de qualidade de vacinas e permite determinar a temperatura ideal de estoque bem como o prazo de validade. Testes preliminares de estabilidade acelerada foram realizados em conjugados purificados e liofilizados.

Os conjugados foram estocados em 5 diferentes grupos de temperatura (-20°C, 4°C, 25°C, 37°C, 50°C), sendo 4°C a temperatura controle. A vacina Hiberix também foi submetida a estas temperaturas. Todas as amostras foram submetidas ao teste por 10 semanas e a cada semana uma amostra de cada grupo era analisada em HPLC para verificar alguma alteração no perfil cromatográfico. Novamente a técnica de HPSEC coluna TSK Progel™ G3000 SW (30cmX7,5mm) foi adotada para monitoramento da possível degradação do conjugado devido ao efeito térmico. Somente as temperaturas (37°C e 50°C) nas quais notamos mudanças no comportamento do perfil cromatográfico estão detalhadas abaixo (**Figuras 24 e 25**).

Os conjugados e a vacina Hiberix, apesar de serem vacinas diferentes, quando mantidos por 10 semanas a -20°C, 4°C e 25°C não apresentaram mudanças no perfil de HPLC (resultados não mostrados).

Para os conjugados PRP-ADH-TT mantidos a 37°C e 50°C por 10 semanas (**Figura 25**) notamos um perfil diferente de eluição comparado ao padrão: o pico principal que corresponde a eluição do conjugado, eluído normalmente no tempo de retenção 5,14min, após 10 semanas de estoque em elevada temperatura houve diminuição no tempo de retenção inferindo no aumento da massa molecular além deste ter sofrido uma degradação. Esta degradação provavelmente é consequência da elevada temperatura de estoque. Na vacina Hiberix a 37°C e 50°C (**Figura 24**), notamos grande perda de material após estoque em temperatura elevada. Segundo a bula do medicamento, o produto liofilizado deve ser armazenado entre 2°C a 8°C e deve ser protegido da luz.

O estoque das vacinas em elevadas temperaturas parece promover aumento na massa molecular do conjugado. De acordo com Bolgiano e colaboradores (2001) e Crane e colaboradores (1997), no caso da vacina HbOC, o aumento aparente na massa molecular do conjugado parece estar relacionado com a conformação mais aberta da proteína quando estocado em temperatura $\geq 37^\circ\text{C}$.

Os trabalhos de estabilidade acelerada muitas vezes correlacionam a degradação da massa molecular dos conjugados analisados com a perda da capacidade dos mesmos em estimular a resposta imune em animais. Interessantemente, não há diferença estatística entre os níveis de IgG anti-PRP produzidos na vacina controle (estocada a 4°C) e a vacina teste (estocada a 37°C) sugerindo que a agregação por si só não é suficiente para diminuir a imunogenicidade em animais (BOLGIANO *et al.*, 2001).

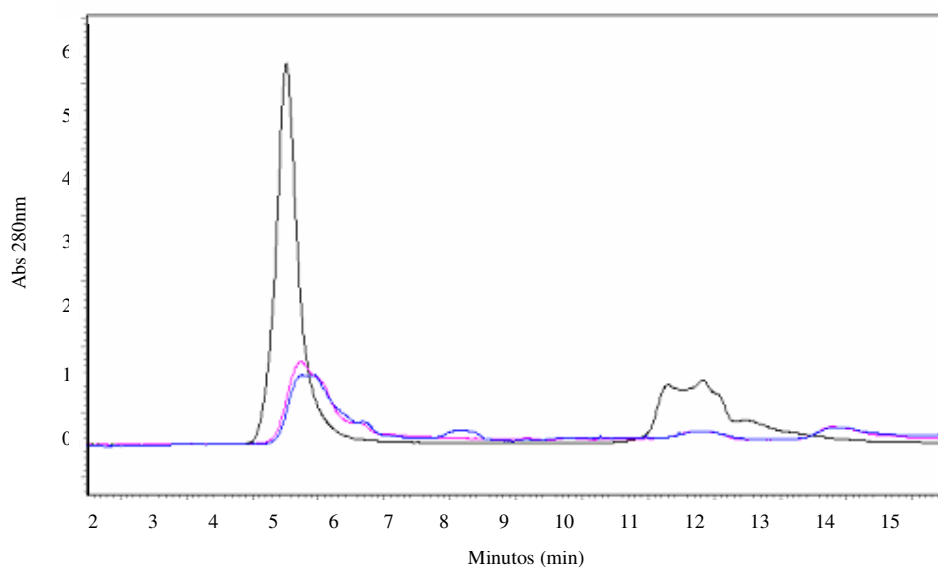


Figura 24: Teste de estabilidade da Vacina Hiberix. Preto – Vacina Hiberix controle (0,4 μ g PRP e 1,2 μ g de TT) mantida a 4°C por 10 semanas. Rosa – Vacina Hiberix (0,4 μ g PRP e 1,2 μ g de TT) mantida a 37°C por 10 semanas. Azul – Vacina Hiberix (0,4 μ g PRP e 1,2 μ g de TT) mantida a 50°C por 10 semanas.

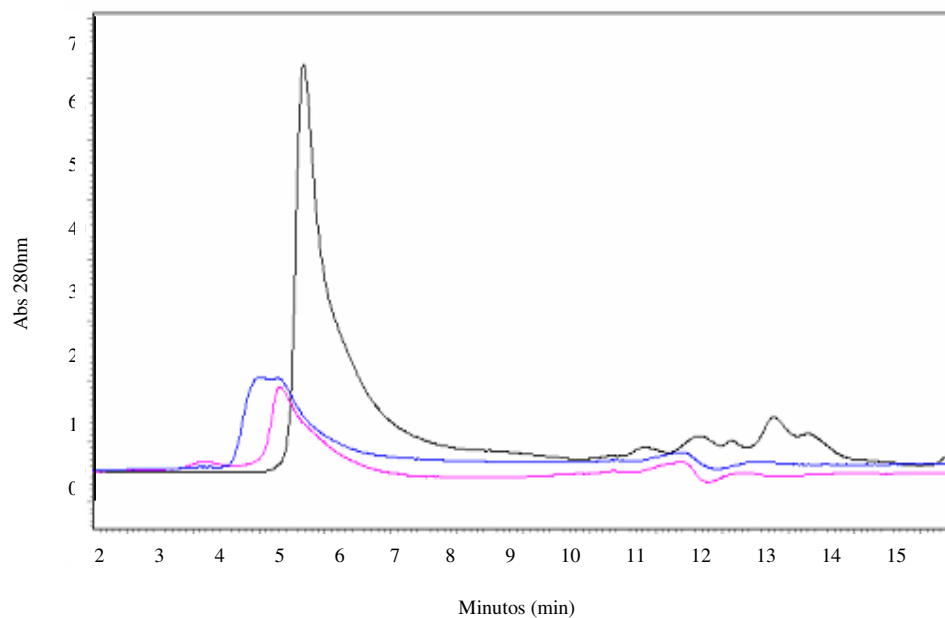


Figura 25: Teste de estabilidade do conjugado PRP-ADH-TT. Preto – Conjugado controle (0,4 μ g PRP e 1,4 μ g de TT) mantido a 4°C por 10 semanas. Rosa – Conjugado mantido a 37°C (0,4 μ g PRP e 1,2 μ g de TT) por 10 semanas. Azul – Conjugado mantido a 50°C (0,4 μ g PRP e 1,2 μ g de TT) por 10 semanas.

6 CONCLUSÕES

- ✓ O desenvolvimento do Método Hidrazona de conjugação que permitiu a ligação de polissacarídeo capsular de *H. influenzae* tipo b e proteína toxóide tetânico é composto basicamente por três etapas:
 - i. Oxidação de PRP;
 - ii. Derivatização de PRPoxi;
 - iii. Conjugação de PRP-ADH a TT.

- ✓ A otimização do protocolo de conjugação obtido resultou em altos rendimentos (80%) e em conjugados com características químicas bem definidas: PRP com massa molecular em torno de 14kDa com 4 moléculas de ADH acopladas por molécula de PRP e relação PRP/proteína por volta de 3.

- ✓ O Método Hidrazona apresentou vantagens em relação aos disponíveis (CNBr, Carbodiimida e Aminoação Redutiva) pois,
 - i. emprega número reduzido de reagentes;
 - ii. o tempo de processamento é menor;
 - iii. maior rendimento;
 - iv. não requer uso de reagente tóxico como CNBr.

- ✓ O protocolo de conjugação proposto mostrou ser escalonável pelo menos até 200mg dos componentes.

- ✓ O Método Hidrazona foi eficiente na conversão de PRP em antígeno timo-dependente com avidéz intermediária.

- ✓ A proteína TT não foi afetada pelo método de conjugação mostrando-se eficiente como proteína carregadora e como antígeno vacinal.

- ✓ HPSEC mostrou ser uma boa técnica na verificação da formação de conjugado e no controle de degradação da estrutura do conjugado quando submetido a temperaturas elevadas de estoque.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AALMO, K.M.; PAINTER, T.J. Periodate Oxidation of Methyl Glycopyranosides rate Coefficients and Relative Stabilities of Intermediate Hemiacetals. **Carbohydr. Res.**, v.89; p. 73-82, 1981.

ADA, G.; ISAACS, D. Carbohydrate-protein conjugate vaccines. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 9, p. 79-85, 2003.

ALMEIDA, A.E.C.C.; FILIPIS, I.; ABREU, A.O.; FERREIRA D.G.; GEMAL, A.L.; MARZOCHI, K.B.F. Ocurrence of *Haemophilus influenzae* strains in three Brazilian states since the introduction of a conjugate *Haemophilus influenzae* type b vaccine. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 38, n.5, p. 777-781, 2005.

ANDERSON, P.; INSEL, R.A.; SMITH, D.H.; CATE, T.R.; COUCH, R.B.; GLEZEN, W.P. A polysaccharide-protein complex from *Haemophilus influenzae* type b. 3. Vaccine trial in human adults. **J. Infect. Dis.**, v. 144, p. 530-538, 1981.

ANDERSON, P.; PICHICHERO, M.E.; INSEL, R.A. Immunogens Consisting of oligosaccharides from the Capsule of *Haemophilus influenzae* type b Coupled to diphtheria Toxoid or the Toxin Protein CRM₁₉₇. **J. Clin. Invest.**, v. 76, p. 52-59, 1985.

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.

ANDERSON, P.W.; PICHICHERO, M.E.; STEIN, E.C.; PORCELLI, S.; BETTS, R.F.; CONNUCK, D.M.; KORONES, D.; INSEL, R.A.; ZAHRADNIK, J.M. EBY, R. Effect of oligosaccharide chain length, exposed terminal groups, and hapten loading the antibody response of human adults and infants to vaccines consisting of *Haemophilus influenzae* type b capsular antigen uniterminally coupled to the diphtheria protein CRM₁₉₇. **J. Immunol.**, v.142, p. 2464, 1989.

De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:**

Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ANDERSON, P.W.; EBY, R.J. **Immunogenic conjugates**. n. 4902506, 20 fevereiro 1990.

ASHWELL, G. Colorimetric analysis of sugar. **Methods Enzymol.**, v. 3, p. 87-90, 1957.

BARTOLONI, A.; NORELLI, F.; CECCARINI, C.; RAPPUOLI, R.; COSTANTINO, P. Immunogenicity of meningococcal B polysaccharide conjugated to tetanus toxoid or CRM₁₉₇ via adipic acid dihydrazide. **Vaccine**, v. 13, n. 5, p. 463-470, 1995.

BASU, A.; SHRIVASTAV, T.G.; KARIYA, K.P. Preparation of enzyme conjugate through adipic acid dihydrazide as linker and its use in immunoassays. **Clin. Chem.**, v. 49, n° 8, p. 1410-1412, 2003.

BISGARD, K.M.; KAO, A.; LEAKE, J. *Haemophilus influenzae* invasive disease in the United States (1994-1995): Near disappearance of a vaccine-preventable childhood disease. **Emerg. Infect. Dis.**, v.4, p. 229-237, 1998.

BEUVERY, E. C.; KAADEN, A. V. D.; KANHAI, V.; LEUSSINK, A. B. Physiocochemical and immunological characterization of meningococcal group A polysaccharide-tetanus toxoid conjugates prepared by two methods. **Vaccine.**, v.1, p. 31-36, 1983.

BOLGIANO, B.; MAWAS, F.; YOST, S.E.; CRANE, D.T.; LEMERCINIER, X.; CORBEL, M.J. Effect of physico-chemical modification on the immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b oligosaccharide-CRM₁₉₇ conjugate vaccines. **Vaccine.**, v. 19, p. 3189-3200, 2001.

BRADFORD, M.M. **Anal Biochem.**, v. 72, p. 248 - 254, 1976.

BYSTRICKY, S.; MACHOVA, E.; MALOVIKOVA, A.; KOGAN, G. Determination of the cross-linking effect of adipic acid dihydrazide on glycoconjugate preparation. **Glicoconj.**, v. 16, p. 691-695, 1999.

CARLSSON, R-M.; CLAESSION, B.A.; KAYHTY, H.; SELSTAM, U.; IWARSON, S. Studies on a Hib-tetanus toxoid vaccine, of administration route and of combined administration with an inactivated polio vaccine. **Vaccine**, v. 18.p. 468-478, 2000.

CATÁLOGO PIERCE – NHS and Sulfo-NHS Instructions, 2004.

CHAKERIAN, B.; LOWY, D.R.; SCHILLER, J.T. Conjugation of a self-antigen to

papillomavirus-like particles allows for efficient induction of protective autoantibodies. **J. Clin. Invest.**, v.108 n.3, p.415-423, 2001.

CHU, C.; SCHNEERSON, R.; ROBBINS, J. B.; RASTOGI, S.C. Further Studies on the Immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b and Pneumococcal type 6A Polysaccharide-Protein Conjugates. **Infect. Immun.**, v.40, n. 1, p. 245-256, 1983.

COCHI, S.L.; BROOME, C.V.; HIGHTOWER, A.W. Immunization of U.S. children with *H. influenzae* type b polysaccharide vaccine: A cost-effectiveness model of strategy assessment. **JAMA.**, v. 253, p. 521-529, 1985.

CRANE, D.T.; BOLGIANO, B.; JONES, C.; Comparison of the diphtheria mutan 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.

CRIPPS, A.W.; FOXWELL, R.; KYD, J. Challenges for the development of vaccines against *Haemophilus influenzae* type b and *Neisseria meningitidis*. **Curr. Opin. Immunol.**, v.14, p. 553-557, 2002.

CRISEL, R. M. O.; BACKER, R. S; DORMAN, D. E. Capsular polymer of *Haemophilus influenzae*, type b. I-Structural characterization of the capsular polymer of strain Eagan. **J. Biol. Chem.**, v.250, p. 4926-4930, 1975.

CROWLEY-LUKE,; REDDIN, K.; GORRINGE, A.; HUDSON, M. J.; ROBINSON, A. Formulation and characterization of *Bordetella pertussis* fimbriae as a novel carrier protein for Hib conjugate vaccines. **Vaccine**, v. 19, n. 25-26, p. 3399-3407, 2001

CSORDAS, F.C.L. **Teste de uma vacina antipneumocócica conjugada: polissacarídeo sorotipo 23F com a proteína PspA recombinante.** Monografia (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

CUERVO, M.L.C.; PEREZ, L.R.; OVIEDO, M.; COSTA, L.; PERDOMO, V. Relationship among physico-chemical and biological tests for a synthetic Hib-TT conjugate vaccine. **Vaccine**, v. 25, p. 194-200, 2007.

DEVI, S. J. N.; ROBBINS, J. B.; SCHNEERSON, R. Antibodies to poly[(2→8)- α -N-acetylneuraminic acid] and poly[(2→9)- α -N-acetylneuraminic acid] are elicited by immunization of mice with *Escherichia coli* K92 conjugates: potential vaccines for groups B

and C meningococci and *E. coli* K1. **Prod. Natl. Acad. Sci. USA**, v.88, p. 7175-7179, 1991.

DONNELLY, J.J.; LIU, M.A. Immunobiology of Protein Carriers. In: ELLIS, R. W.; GRANOFF, D. M. **Development and clinical uses of *Haemophilus b* conjugate vaccines**. New York: Marcel Dekker, 1994. p. 71.

FATTOM, A.; LI, X.; CHO, Y. H.; BURNS, A.; HAWWARI, A.; SHEPHERD, S. E.; COUGHLIN, R.; WINSTON, S.; NASO, R. Effect of conjugation methodology, carrier protein, and adjuvants on the immune response to *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. **Vaccine**, v.13, p 1288-1293, 1995.

FILHO, F.M.; MENDIETA-TABOADA, O. Cromatografia de interação hidrofóbica. In: JUNIOR, A. P.; KILIKIAN, B.V. **Purificação de Produtos biotecnológicos**. São Paulo. Manole. 2005. p. 37.

FITZGERALD, E.A. Overview of methods for potency testing of diphtheria and tetanus toxoid in the United States. In: MANCLARK, C.R. **Proceedings of an Informal Consultation on the World Health Organization Requirements for Diphtheria, Tetanus, Pertussis and Combined Vaccines**. Bethesda:Marcel Dekker, 1991. p.61-64.

FLECK, F. WHO and MSF appeal for funds for new meningitis vaccine. **Brit. Med. J.**, v. 372, p.769. 2003.

FRASCH, CE. Regulatory perspectives in vaccine licensure. In: ELLIS, R. W.; GRANOFF, D. M. **Development and clinical uses of *Haemophilus b* conjugate vaccines**. New York: Marcel Dekker, 1994. p. 435-453.

FOTHERGILL, L.D.; WRIGHT, J. *Influenzae* meningitis: The relation of age incidence to the bactericidal power of blood against the causal organism. **J. Immunol.**, v. 24, p 273-284, 1933.

FUKASAWA, L. O.; GORLA, M. C. O.; SCHENKMAN, R. P. F.; GARCIA, L. R.; CARNEIRO, S. M.; RAW, I.; TANIZAKI, M. M. *Neisseria meningitidis* serogroup C polysaccharide and serogroup B outer membrane vesicle conjugate as a bivalent meningococcus vaccine candidate. **Vaccine**, v. 17, p. 2951-2958, 1999.

FUKASAWA, L.O. **Desenvolvimento de uma vacina conjugada antimeningocócica sorogrupos B/C**. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

FUKASAWA, L.O.; SCHENKMAN, R.P.F.; PERCIANI, C.T.; CARNEIRO, S.M.; DIAS, W.O., TANIZAKI, M.M. Optimization of the conjugation method for a serogroup B/C meningococcal vaccine. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 45, p. 141-146, 2006.

FUNKHOUSER, A.; STEINOF, M.C.; WARD, J. *Haemophilus influenzae* disease and immunization in developing countries. **Rev. Infect. Dis.**, v. 13S, p. 542-554, 1991.

FUSCO, P.C.; MICHON, F.; TAI, J.Y.; BLAKE, M.S. Preclinical evaluation of a novel group B meningococcal conjugate vaccine that elicits bactericidal activity in both mice and nonhuman primates. **J. Infect. Dis.**, v. 175, p. 364-372, 1997.

FUSCO, P. C.; MICHON, F.; LAUDE-SHARP, M.; MINETTI, C. A. S. S.; HUANG, C-H.; HERON, I.; BLAKE, M. S. Preclinical studies on a recombinant group B meningococcal porin as a carrier for a novel *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine. **Vaccine**, v.16, n. 19, p. 1842-1849, 1998.

GOLDBLATT, D. Conjugate Vaccines. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 119, p. 1-3, 2000.

GOLDBLATT, D.; VAZ, A.R.J.P.M.P.; MILLER, E. Antibody avidity as a surrogate marker of successful priming by *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines following infant immunization. **J. Infec. Dis.**, v. 177, p. 1112-1115, 1998.

GORDON, L.K. Polysaccharide endotoxoid conjugate vaccines, U.S. Patent n. 4619828, 1986.

GRABAREK, J.; GERGELY, J. Zero-length crosslinking procedure in the use of active esters. **Biochemistry**, n.185, p.131-135, 1990.

GUPTA, R.K.; SZU, S.C.; FINKELSTEIN, R.A.; ROBBINS, J.B. Synthesis, characterization, and some immunological properties of conjugates composed of the detoxified lipopolysaccharide of *Vibrio cholerae* O1 serotype Inaba bound to cholera toxin. **Infect. Immun.**, v.60, p. 3201-3208, 1992.

GUPTA, R. K.; ANDERSON, R.; CECCHINI, D.; ROST, B.; XU, J.; GENDREAU, K.; SAROFF, D. L.; MARCHANT, C.; SIBER, G. R. Evaluation of a Guinea Pig Model to Assess Interference in the Immunogenicity of Different Components of a Combination Vaccine Comprising Diphtheria, Tetanus and Acellular Pertussis (DTaP) Vaccine and *Haemophilus influenzae* type b Capsular Polysaccharide Conjugate Vaccine. **Biologicals**, v. 27, p. 167-176, 1999.

HEATH, P.T.; McVERNON, J. The UK Hib vaccine experience. **Arch. Dis. Child.**, v. 86, p. 396-399, 2002.

HERMANSON, G. T. **Bioconjugate Techniques**. San Diego: Academic Press, 1996. 785p.

HOUGS, L., JUUL, L., DITZEL, H.J.; HEILMANN, C.; SVEJGAARD, A.; BARINGTON, T. The first dose of a *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine reactivates memory cells B: evidence for extensive clonal selection, intraclonal affinity maturation, and multiple isotype switched to IgGA2. **J. Immunol.**, v.162, p. 224-237, 1999.

HUEBNER, R.E.; MBELLE, N.; FORRESTE, B.; MADORE, D.V.; KLUGMAN, K.P. Immunogenicity after one, two or three doses and impact on the antibody response to coadministered antigens of a nonavalent pneumococcal conjugate vaccine in infants of Soweto, South Africa. **Ped. Infect. Dis.**, v.21, p.1004-1007, 2002.

HUNOLSTEIN, von C.; PARISI, L.; RECCHIA, S. A routine high-performance size-exclusion chromatography to determine molecular size distribution of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. **Vaccine**, v. 17, p. 118-125, 1999.

JENNINGS, H.J.; LUGOWSKI, C. Immunochemistry of groups A, B, and C meningococcal polysaccharide-tetanus toxoid conjugates. **J. Immunol.**, v.127, p.1011-1018, 1981.

JENNINGS, H.J.; PON, R.A. Polysaccharides and glycoconjugates as human vaccines. In: DIMITRIU, S. **Polysaccharides in medical applications**. New York: Marcel Dekker, 1997. p. 443-479.

JONES, C. Vaccines based on the cell surface carbohydrates of pathogenic bacteria. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 77, p. 293-324, 2005.

JORDENS, J.Z.; SLACK, M.P.E. *Haemophilus influenzae*: Then and Now. **Eur. J. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 14, n. 11, p.935-948, 1995.

KAÿHTY, H.; MÄKELÄ, P.H.; PELTOLA, H. Immunological Basis for PRP Vaccines. In: ELLIS, R. W.; GRANOFF, D. M. **Development and clinical uses of *Haemophilus b* conjugate vaccines**. New York: Marcel Dekker, 1994. p. 1 - 19.

KELLY, D. F.; MOXON, E. R.; POLLARD, A. J. *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. **Immunology**, v. 113, p. 163-174, 2004.

KILIAN, M.; POLUSEN, K.; HJORTH, B.J.P.; THOGERSEN, H.C. Cloning and sequencing of the immunoglobulin A1 protease gene (IgA) of *Haemophilus influenzae* serotype b. **Infect. Immun.**, v.57, p. 3097-3105, 1989.

KILIAN, M. A taxonomic study of the genus *Haemophilus* with the proposal of a new species. **J. Gen. Microbiol.**, v.93, p. 9-62, 1976.

KING, T.P.; ZHAO, S.W.; LAM, T. Preparation of Protein Conjugate via Intermolecular Hydrazone Linkage. **Biochemistry**, v. 25, p. 5774-5779, 1986.

KISHINO, S.; MIYAZAKI, K. Separation methods for glycoprotein analysis and preparation. **J. Chromatogr. B.**, v. 699, p. 371-381, 1997.

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

KOSSACZKA, Z.; BYSTRICKY, S.; BRYLA, D.A.; SHILOACH, J. ROBBINS, J.B.; SZU, S.C. Synthesis and Immunology Properties of Vi and Di-O-Acetyl Pectin Protein Conjugates with Adipic Acid Dihydrazide. **Infect. Immun.**, v. 65, n. 6, p. 2088-2093, 1997.

KUMAR, R.; SHUKLA, A.K.; BAGGA, E.; KUMARI, S.; BAJPAI, R. P.; BHARADWAJ, L.M. 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide interference with Lowry method. **Anal. Biochem.**, v. 336, p. 132 – 134, 2005.

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.

LEE, C-H.; FRASCH, C.E. **Polysaccharide-protein conjugate vaccines**. U.S. n, 6 agosto 2004.

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

LEI, Q.P.; LAMB, D.H.; HELLER, R.K.; SHANNON, A.G.; RYAL, R.; CASH, P. Kinetics

studies on the rate of hydrolysis of N-ethyl-N'- (dimethylaminopropyl)carbodiimide in aqueous solutions using mass spectrometry and capillary electrophoresis. **Anal. Biochem.**, v. 310, p. 122-124, 2002.

LIEBERMAN, J.; GREENBERG, D.P.; WONG, V.K. The effect of neonatal immunization with diphtheria and tetanus toxoid on antibody responses to *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. **J. Pediatr.**, v. 126, p. 198-205, 1995.

LIPUMA, J.J.; RICHMAN, H.; STULL, T.L. Hemocin, the bacteriocin produced by *Haemophilus influenzae*: species distribution and role in colonization. **Infect. Immun.**, v.58, p.1600-165, 1990.

MALLET, E.; BELOHRADSKY, B.H.; LAGS, R.; GOTHEFORS, L.; CAMIER, P.; CARRIERE, J-P.; KANRA, G.; HOFFENBACH, A.; LANGUE, J.; UNREINER, F.; ROUSSEL, F.; REINERT, P.; FLODMARK, C-E., STOJANOV, S.; LIESE, J.; LEVINE, M.M.; MUNOZ, A.; SCHODEL, F.; HESSEL, L.; ON BEHALF OF THE HEXAVALENT VACCINE TRIAL STUDY GROUP. A liquid hexavalent combined vaccine against diphtheria, tetanus, pertussis, poliomyelitis, *Haemophilus influenzae* type b and hepatitis B: reviewed of immunogenicity and safety. **Vaccine**, v. 22, p. 1343-1357, 2004.

MARBURG, S.; JORN, D.; TOLMAN, R.L.; ARISO, B.; McCAULEY, J.; KNISKERN, P.J.; HAGOPIAN, A.; VELLA, P.P. Bimolecular chemistry of macromolecules: synthesis of bacterial polysaccharide conjugates with *Neisseria meningitidis* membrane protein. **J. Am. Chem. Soc.**, v.108, p.5282-5287, 1986.

McINTYRE, P. Worldwide epidemiology of invasive Hib disease. **JAMA**, v. 9, p. 5-10, 2003.

MEANS, G.E.; FEENEY, R.E. Chemical Modifications of Proteins: History and Applications. **Bioconjug. Chem.**, v. 1, p. 2-12, 1990.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em: < www.saude.gov.br>. Acesso em: 13 nov. 2006.

MOXON, E.R. Molecular basis of invasive *H. Influenzae* type b disease. **J. Infect. Dis.**, v.165S, p.77-81, 1992.

NOBREGA, R.; BORGES, C.P.; HABERT, A.C. Processos de separação por membranas. In:

JUNIOR, A. P.; KILIKIAN, B.V. **Purificação de Produtos biotecnológicos**. São Paulo. Manole. 2005. p. 37.

NODA, A.; SENDO, T.; OHNO, K.; NODA, H.; GOTO, S.; Metabolism and cytotoxicity of hydrazine in isolated rat hepatocytes. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 35, n.6, p. 2538-2544, 1987.

Organização Mundial da Saúde. Disponível em: <www.who.int>. Acesso em: 12 abril 2007.

PAOLETTI, L.C.; KASPER, D.L.; MICHON, F.; DIFABIO, J.; JENNINGS, H.J.; TOSTESON, T.D.; WESSELS, M.R. Effects of Chain Length on the Immunogenicity in rabbits of Groups B *Streptococcus* Type III Oligosaccharide-Tetanus Toxoid Conjugates. **J. Clin. Invest.**, v. 89, p. 203-209, 1992.

PAOLETTI, L.C.; PINEL, J., JOHNSON, K.D.; REINAP, B.; ROSS R.A.; KASPER, D.L. Synthesis and preclinical evaluation of glycoconjugate vaccines against group B *Streptococcus* types VI and VIII. **J. Infect. Dis.**, v. 180, p. 892-895, 1999.

PARISI, L.; HUNOLSTEIN, von C. Determination of the molecular size distribution of *Haemophilus influenzae* type b-tetanus toxoid conjugate vaccines by size-exclusion chromatography. **J. Chromatogr. A.**, v. 847, p. 209-211, 1999.

PATO, T.P.; BARBOSA, A.P.R.; JUNIOR, J.G.S. Purification of capsular polysaccharide from *Neisseria meningitidis* serogroup C by liquid chromatography. **J. Chromatogr. B.**, v. 832, p. 262-267, 2006.

PAWLOWSKI, A.; KALLENIOUS, G.; SVENSON, S. B. A new method of non-cross-linking conjugation of polysaccharides to proteins via thioether bonds for the preparation of saccharide-protein conjugate vaccines. **Vaccine**, v. 17, p. 1474-1483, 1999.

PEDERSEN, M.K.; SORENSEN, N.S.; HEEGAARD, P.M.H.; BEYER, N.H.; BRUNN, L. Effect of different hapten-carrier conjugation ratios and molecular orientations antibody affinity against a peptide antigen. **J. Immunol. Methods.**, v. 311, p. 198-206, 2006.

PEETERS, C.C.A.M.; TENBERGENS-MEEKES, A.M.; POOLMAN, J.T. Immunogenicity of a *Streptococcus pneumoniae* type 4 polysaccharide-protein conjugate vaccine is decreased by admixture of high doses of free saccharide. **Vaccine**, v. 10, p. 833-840, 1992.

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

PELTOLA, H. *Haemophilus influenzae* type b disease and vaccination in Latin America and the Caribbean. **Pediatr Infect Dis J.**, v. 16, p. 750-57, 1997

PELTOLA, H. Worldwide *Haemophilus influenzae* type b Disease at the Beginning of the 21st Century: Global Analysis of the Disease Burden 25 Years after the Use of the polysaccharide Vaccine and the decade after the Advent of Conjugate. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 13, n. 2, p. 302-317, 2000.

PERCIANI, C.T.; PEIXOTO, P.S.; DIAS, W.O.; KUBRUSLY, F.S.; TANIZAKI, M.M. Improved Method to Calculate the Antibody Avidity Index. **J. Clin. Lab. Anal.**, v. 21, p. 210-206, 2007.

PITTMAN, M. Variation and type specificity in the bacterial species *H. influenzae*. **J. Exp. Med.**, v 53, p 471-495, 1931.

PLANS, P. Cost-effectiveness of 23-valent antipneumococcal vaccination in Catalonia (Spain). **Gac. Sanit.**, v. 16, p. 392-400. 2002.

PLAUT, A.G. The IgG1 proteases of pathogenic bacteria. **Annu. Rev. Microbiol.**, v.37, p. 603, 1983.

PLOTKINS, S. Vaccines. In: WARD, J.; LIEBERMAN, J.M.; COCHI, S.L., L.B. ***Haemophilus influenzae* Vaccines**, Sanders Company, 1994. p.337-383.

POPA, V.I.; SPIRIDON, I. Hemicelluloses: Structure and Properties. In: **Polysaccharides – Structural, Diversity and Functional Versatility**, New York., Marcel Dekker, 1998. p.297-312.

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

RAVENS-CROFT, N.; AVERANI, G.; BARTOLONI, A.; BERTI S.; BIGIO, M.; CARINCI,

V.; CONSTANTINO, P.; D'ASCENZI, S.; GANNOZZI, A.; NORELLI, F.; PENNATINI, C.; PROIETTI, D.; CECCARINI, C.; CESCUTTI, P. Size determination of bacterial capsular oligosaccharides used to prepare conjugate vaccines. **Vaccine**, v. 17, p. 2802-2816, 1999.

ROBINS, J. M; SCHNEERSON, R.; PITTMAN, M. *Haemophilus influenzae* type b infections. **Bacterial Vaccines**, New York: Academic Press, 1984. cap10.

SCHLESINGER, Y.; GRANOFF, D.M. Avidity and bactericidal activity of antibody elicited by different *Haemophilus influenzae* type b conjugates vaccines. The Vaccine Study Groups. **JAMA**, v. 267, p. 1489-1494, 1992.

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 analysis of serum antibodies elicited in adults by *Haemophilus influenzae* type b and pneumococcus type 6A capsular polysaccharide-tetanus toxoid conjugates. **Infect. Immun.**, v.52, p. 519, 1986

SCHNEERSON, R.; BARRERA, O.; SUTTON, A.; ROBBINS, J.B. Preparation, Characterization and Immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-protein conjugate. **J. Exp. Med.**, v.152, p. 361-376, 1980.

SCHNEERSON, R.; RODRIGUES, L. P.; PARKE, J. C. Jr; ROBBINS. J.B. Immunity to disease caused by *H. influenzae* type b. II. Specificity and some biological characteristics of "natural", infection acquired and immunizations induced antibody to the capsular, polysaccharide. **J Immunol.** v.107, p. 1081-1089, 1971.

SCHWARTZ, B.; MOORE, P.S.; BROOME, C.V. Global epidemiology of meningococcal disease. **Clin Microbiol. Rev.**, v.2, p. 118, 1989.

SEHGAL D., VIJAY, I.K. A Method for the High Efficiency of Water-Soluble Carbodiimide-Mediated Amidation. **Anal. Biochem.**, v. 218, p. 87-91, 1994.

SELL, S.H. *Haemophilus influenzae* type b meningitidis: manifestation and long term sequelae. **Pediatr. Infect. Dis.**, v. 6, p. 775-778, 1987.

SEPPÄLÄ, I.; MÄKELÄ, O. Antigenicity of dextran-protein conjugates in mice. Effect of

molecular weight of the carbohydrate and comparison of two modes of coupling. **J. Immunol.**, v. 6, p. 1259-1264, 1989.

SHAFFER, D.E.; TOLL, B.; SCHMAN, R.F.; NELSON, B.L.; MOND, J.J.; LEES, A. Activation of soluble polysaccharides with 1-cyano-4-dimethylaminopyridinium tetrafluoroborate (CDAP) for use in protein-polysaccharide conjugate vaccines and immunological reagents. II. Selective crosslink of proteins to CDAP-activated polysaccharides. **Vaccine**, v. 18, p. 1273 – 1281, 2000.

SIBER, G.R.; ANDERSON, R.; HABAFY, M.; GUPTA, R.K. Development of a guinea pig model to assess immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide conjugate vaccines. **Vaccine**, v.13, n.6, p. 525-531, 1995.

SILVEIRA, I.A.F.B.; BASTOS, R.C.; NETO, M.S.; LARANJEIRA, A.P.; ASSIS, E.F.; FERNANDES, S.A.R.; LEAL, M.L.; LEE, C-H.; FRASCH, C.E.; PERALTA, J.M.; JESSOUROUN, E. Characterization and immunogenicity of meningococcal group C conjugate vaccine prepared using hydrazide-activated tetanus toxoid. **Vaccine**, v.27, p.7261-7270, 2007.

STAROS, J.V.; WRIGHT, R.W.; SWINGLE, D.M. Enhancement by *N*-hidroxysulfosuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions. **Anal. Biochem.**, v.156, p. 220-222, 1986.

STEIN, K.E. Thymus-independent and thymus-dependent responses to polysaccharide antigens. **J. Infect. Dis.**, v.165:S49, 1992. Sup11.

ST. GEME III, J.M.; CUTTER, D. Influence of pili, ad capsule on in vitro adherence by *Haemophilus influenzae* type b. **Mol. Microbiol.**, v. 21, p. 21-31, 1996.

SUSSICH, F.; CESARO, A. The kinetics of periodate oxidation of carbohydrates: a calorimetric approach. **Carbohydr. Res.**, v.329, n.1, p.87-95, 2000.

TAKAGI, M. **Produção e purificação do polissacarídeo capsular de *Haemophilus influenzae* tipo b.** 117 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

TURK, D.C. **Clinical importance of *H. Influenzae*.** In: SELL, S.H.; WRIGHT, P.F. (Ed.) *H. Influenzae*. New York: Elsevier Science, 1982.

VAN ALPHEN, L. Molecular Epidemiology of Hib Strains. In: ELLIS, R. W.; GRANOFF, D. M. **Development and clinical uses of *Haemophilus b* conjugate vaccines.** New York:

Marcel Dekker, 1994. p. 129-144.

VANDHEIM, M.; WARD, I.J. Epidemiology in Developed Countries. In: ELLIS, R. W.; GRANOFF, D. M. **Development and clinical uses of *Haemophilus b* conjugate vaccines**. New York: Marcel Dekker, 1994. p. 231-247.

VELLA, P.P. Antibody Assays. In: ELLIS, R. W.; GRANOFF, D. M. **Development and clinical uses of *Haemophilus b* conjugate vaccines**. New York: Marcel Dekker, 1994. p. 275-290.

VEREZ-BENCOMO, V.; FERNANDEZ-SANTANA V.; HARDY, E.; TOLEDO, M.E.; RODRIGUEZ, M.C.; HEYNNNGNEZZ, L.; RODRIGUES, A.; BALY, A.; HERRERA, L.; IZQUIERDO, L; VILLA, A.; VALDES, Y.; COSME, K.; DELER, M. L.; MONTANE, M.; GARCIA, E.; RAMOS, A. AGUIAR, A.; MEDINA, E.; TORANO, G.; SOSA, I.; HERNANDEZ, I.; MARTINEZ, R.; MUZACHIO, A.; CARMENANTES, A.; COSTA, L.; CARDOSO, F.; CAMPA, C.; DIAZ, M.; ROY, R. A synthetic conjugate polysaccharide vaccine against *Haemophilus influenzae* Type b. **Science**, v. 305, p. 522-525, 2004.

VOLD, I.M.N.; CHRISTENSEN, B.B. Periodate Oxidation of Chitosan with Different Chemical Compositions. **Carbohydr. Res.**, v.340, n.4, p 679-684, 2005.

WENGER, J. D.; HIGHTOWER, A. W.; FACKLAN, R. R. Bacterial meningitis in the United States, 1986: Report of a multistate surveillance study. **J. Infect. Dis.**, v.162, p.1316-1323, 1990.

WENGER, J.D.; BOOY, R.; HEATH, P.T.; MOXON, R. Epidemiological Impact of Conjugate Vaccines on Invasive Disease Caused by *Haemophilus influenzae* type b. In: LEVINE, M.M.; WOODROW, G.C.; KAPER, J.B.; COBON, G.S. **New generation vaccines**. New York: Marcel Dekker. 1997. p. 489-502.

WILCHEK, M.; BAYER, E.A. Labeling glycoproteins with hydrazide reagents. **Methods Enzymol.**, v. 138, p. 429-442, 1987.

WOLFE, C.A.C.; HAGE, D.S. Studies on Rate and Control of Antibody Oxidation by Periodate. **Anal. Biochem.**, v.231(1), p.123-130, 1995.

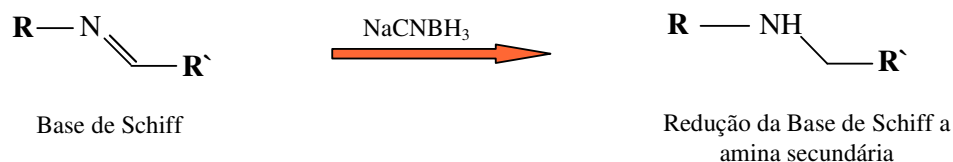
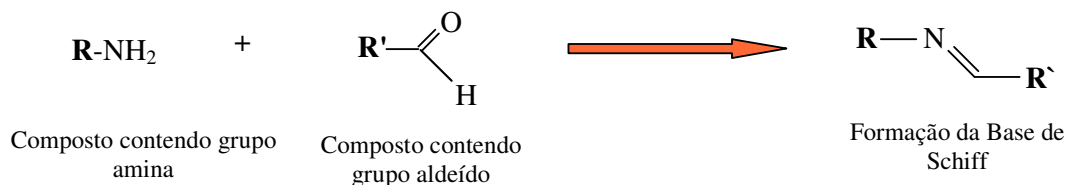
WROBEL, N.; SCHINKINGER, M.; MIRSKY, V.M. A novel ultraviolet assay for testing side reactions of carbodiimides. **Anal. Biochem.**, v. 35, p. 135-138, 2002.

ZANZE, S.E.; MOXON, E.R.S. Composition of the Lipopolisaccharide from different capsular serotype strains of *Haemophilus influenzae*. **J. Gen Microbiol.**, v.133, p. 1443-1451, 1987.

ZOLLINGER, W.D. New and improved vaccines against meningococcal disease. In: LEVINE, M.M.; WOODROW, G.L.; KAPER, J.B.; COBON, G.S. **New generation of vaccines**. New York: Marcel Dekker, 1997. p. 469-488.

ANEXO A

Método Aminoação Redutiva com formação da Base de Schiff:

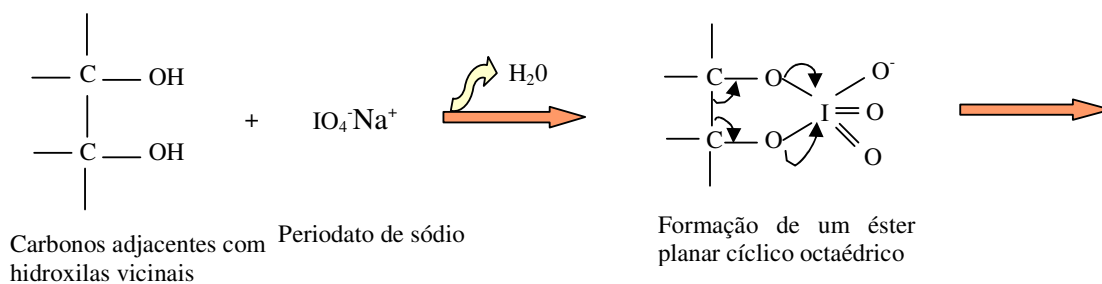


Aldeídos ou cetonas podem reagir com aminas primárias ou secundárias para formar Bases de Schiff, uma reação de desidratação que leva a geração de iminas. No entanto, a formação da Base de Schiff é relativamente lábil, uma interação reversível que é rapidamente clivada por hidrólise em solução aquosa. O rendimento da reação é consideravelmente mais elevado quando efetuado em solução com pH alcalino, mas ainda não é o suficiente para ser aplicado em condições de conjugação de macromoléculas a menos que a ligação seja reduzida a uma amina terciária ou quaternária.

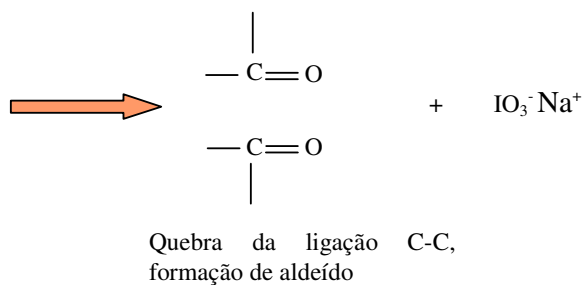
ANEXO B

Mecanismo de Oxidação por periodato de sódio:

- ❖ Ataque do íon iodato a uma das hidroxilas, formação de um intermediário cíclico e planar de forma octaédrica.



- ❖ Quebra da ligação carbono-carbono, formação de grupos aldeídos.



O mecanismo de reação de oxidação, que pode ser dividida em dois passos, envolve íon periodato e uma molécula com diols vicinais. O sítio de clivagem localiza-se entre C-C e leva a formação subsequente de 2 grupos aldeídos.

- (1) uma das ligações I-O do periodato ataca 1 dos 2 grupos hidroxilas do diol vicinal, formação de um éster planar cíclico como parte de um intermediário octaédrico.
- (2) clivagem da ligação C-C, com formação de grupos aldeídicos reativos.

ANEXO C

Vacina conjugada PRP-D (ProHIBiT®):

Redução da massa molecular do polissacarídeo de Hib (massa molecular inicial >600kDa):



Ativação do polissacarídeo com brometo de cianogênio:



Derivatização da proteína Toxóide Diftérico:



Conjugação pelo Método de Aminoação Redutiva:

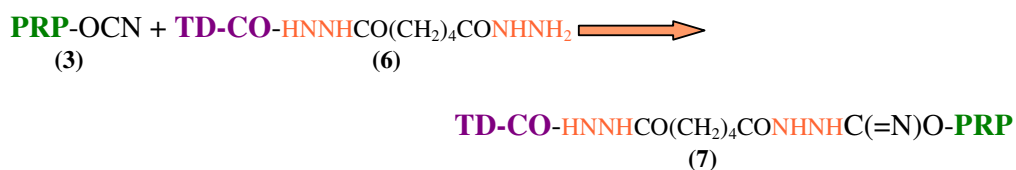
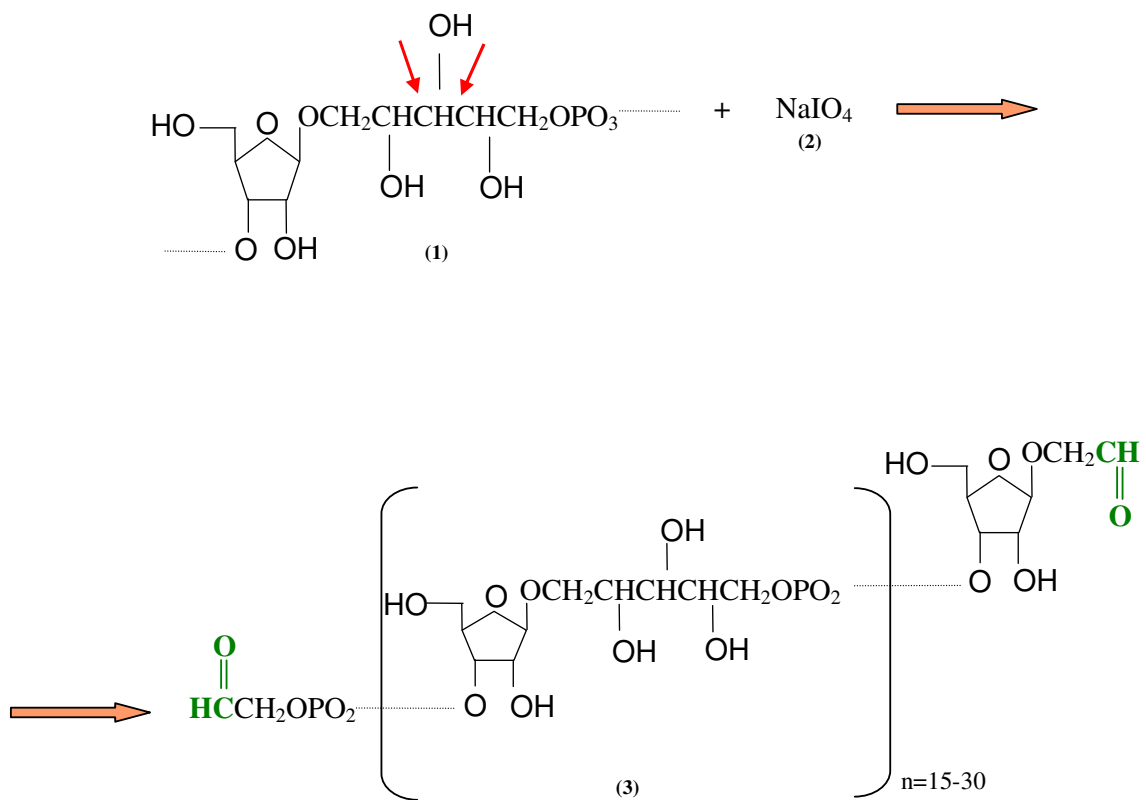


Figura A: Método de conjugação para obtenção da vacina PRP-D. (1) PRP de tamanho reduzido por hidrólise térmica; (2) Brometo de Cianogênio; (3) PRP ativado com Brometo de Cianogênio; (4) Toxóide Diftérico; (5) Diidrazida do ácido adípico (ADH); (6) TD derivatizada; (7) Conjugado final TD-ADH-PRP.

ANEXO D

Vacina conjugada HbOC (HibTiter®):

Oxidação do polissacarídeo de Hib:



Conjugação do oligossacarídeo oxidado a proteína CRM₁₉₇:

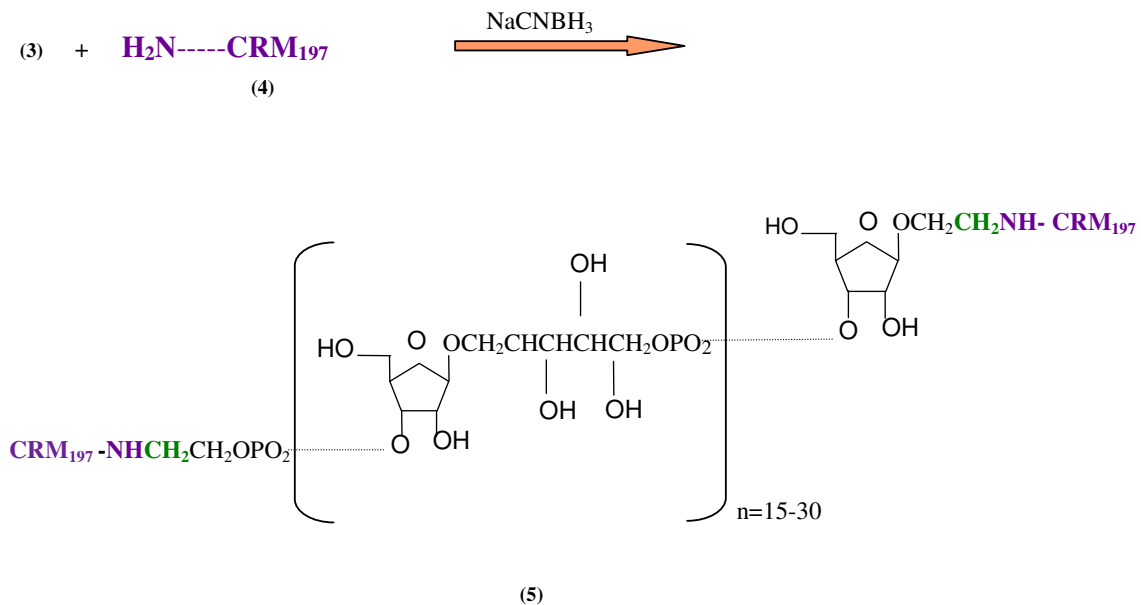


Figura B: Método de conjugação para obtenção da vacina HbOC. (1) estrutura do polissacarídeo de *H. influenzae* tipo b (PRP); (2) Metaperiodato de sódio; (3) PRP oxidado; (4) Toxóide diftérico modificado geneticamente CRM₁₉₇; (5) Conjugado PRP-CRM₁₉₇.

ANEXO E

Vacina conjugada PRP-OMV (PedvaxHIB®)

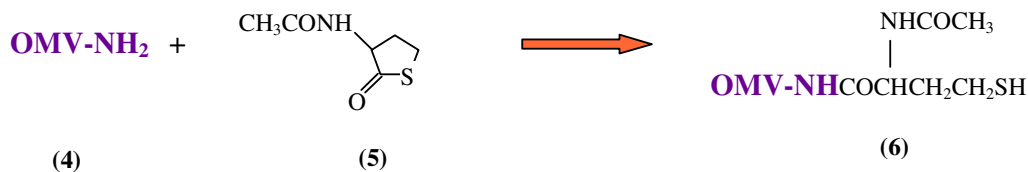
Redução da massa molecular do polissacarídeo de Hib:



Seguem-se outras etapas de ativação do polissacarídeo na presença de solventes orgânicos com objetivo de preparar a molécula para derivatização com cloreto de bromoacetil:



Derivatização da OMV



Conjugação PRP e OMV:

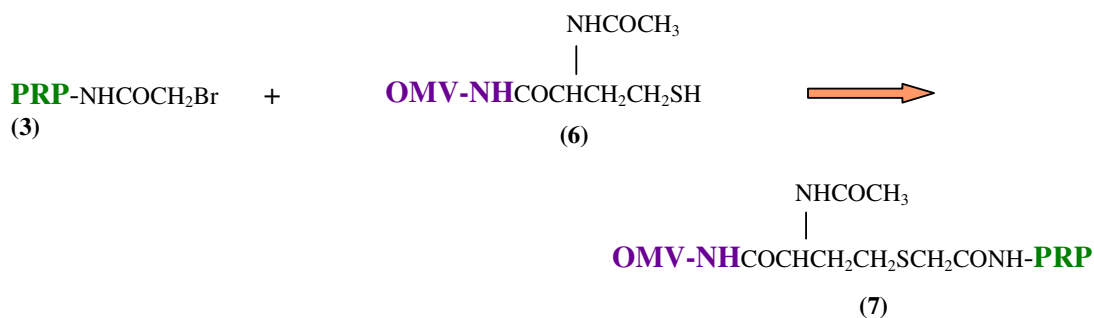


Figura C: Método de conjugação para obtenção da vacina PRP-OMV. (1) PRP de tamanho reduzido; (2) Cloreto de Bromoacetil; (3) PRP bromoacetilado; (4) Vesícula de membrana externa de *N. meningitidis* sorotipo B (OMV); (5) N-acetilhomocisteína tiolactona; (6) OMV derivatizada; (7) Conjugado final PRP e OMV.

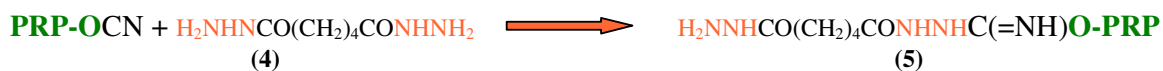
ANEXO F

Vacina conjugada PRP-T (Hiberix®)

Ativação do polissacarídeo com brometo de cianogênio:



Derivatização do polissacarídeo com ADH:



Conjugação do polissacarídeo ativado e da proteína:

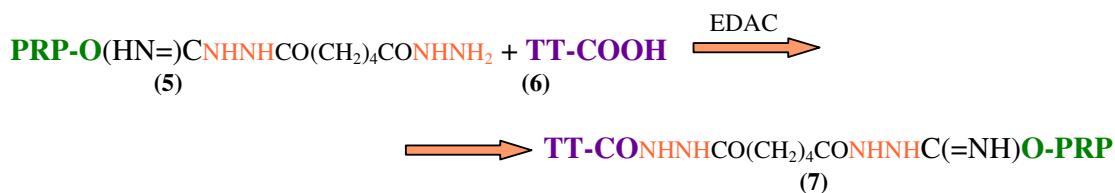


Figura D: Método de conjugação para obtenção da vacina PRP-TT. (1) PRP Poliribosilribitol fosfato. (2) Brometo de Cianogênio (CNBr). (3) PRP ativado com CNBr. (4) Diidrazida do ácido adípico (ADH). (5) PRP derivatizado com ADH. (6) Proteína Toxóide Tetânico (TT). (7) Conjugado final TT-ADH-PRP.

ANEXO G

Curva de Calibração para Dextrans – Resina Sephacryl S-400.

Curva Padrão realizada com solução de dextran dissolvido em NaCl 0,9%.

Condições de corrida:

Fluxo de trabalho: 0,6mL/min

Fase móvel: NaCl 0,9%

Frações coletadas a cada 3 mL

A **tabela A** abaixo apresenta a concentração de dextrans aplicados, o volume de eluição de cada amostra determinado pelo método de doseamento de polissacarídeo (Fenol Sulfúrico) e a constante de distribuição para cada dextran.

Tabela A: Calibração da coluna Sephacryl S-400 com os seguintes dextrans (Blue Dextran, 229kDa, 90kDa, 40kDa, 10kDa e Riboflavina).

Dextran (mg) ¹	LOG PM ²	Kd ³	Vol eluição ⁴
Blue (10mg)	2,6		93
229 (5mg)	5,4	0,17	117
90 (5mg)	5	0,22	123
40 (5mg)	4,6	0,35	141
10 (5mg)	4	0,43	153
Riboflavina (10mg)	6,3		231

1- Concentração de Dextrans aplicados na coluna.

2- Log da massa molecular do dextran. Considerou-se que a massa molecular de Blue Dextran é de 2000kDa e de Riboflavina é de 376Da.

3- Constante de distribuição das amostras determinada pela **equação (1)**.

4- Volume de eluição dos dextrans aplicados na coluna. Após corrida, foi realizada leitura de absorbância no comprimento de onda A280nm somente para Blue Dextran e Riboflavina. Os volumes de eluição dos dextrans 229kDa, 90kDa, 40kDa e 10kDa foram determinados após ensaio colorimétrico de doseamento de dextran (Fenol Sulfúrico), a leitura de absorbância foi realizada no comprimento de onda A490nm.

Equação (1): Constante de Distribuição (Kd)=

$$Kd = \frac{(Ve - Vo)}{(Vf - Vo) - Ve}$$

Onde:

Vo= volume de morto e eluição do Blue Dextran;

Ve= volume de eluição da amostra;

Vf= volume final e eluição da Riboflavina

Depois de determinado o Kd das amostras aplicadas, foi possível plotar o gráfico (LOG PM X Kd) e encontrar a equação da reta. Esta equação mostra a curva de seletividade de uma molécula que determina a faixa operacional da resina para separação entre diferentes moléculas. Dessa forma, o volume de eluição de um soluto desconhecido pode ser relacionado aos volumes de eluição de diversas outras moléculas de tamanho conhecido, viabilizando a estimativa de sua massa molecular por interpolação.

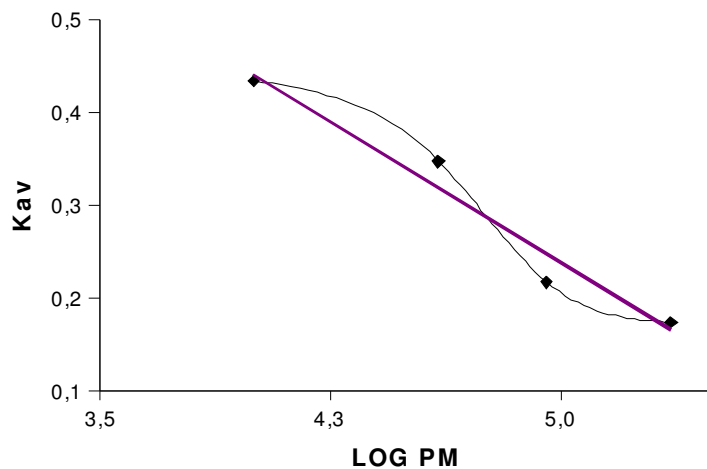


Figura E – Curva de Seletividade (LOG PM X Kd) para determinação da equação da reta após regressão linear.

ANEXO H

Controle de formação de polímero TT-TT na presença de EDAC

Devido a probabilidade de haver formação de polímeros TT-TT através da ligação entre os grupos NH_2 e COOH das proteínas na presença de carbodiimida, realizamos 2 ensaios para verificação de polimerização.

Condição dos ensaios:

1 – 1mg/mL TT, tampão Na_2HPO_4 0,1M, NaCl 0,15M, pH8, 2 dias de reação

2 – 1mg/mL TT, EDAC 1M, tampão Na_2HPO_4 0,1M, NaCl 0,15M, pH8, 2 dias de reação

Após 48h de reação as amostras foram aplicadas em Sephacryl S-400 e os tubos coletados foram submetidos a leitura no comprimento de onda A280nm e determinado o volume de eluição de TT tratado ou não com EDAC 1M. A **figura F** apresenta o resultado destes ensaios.

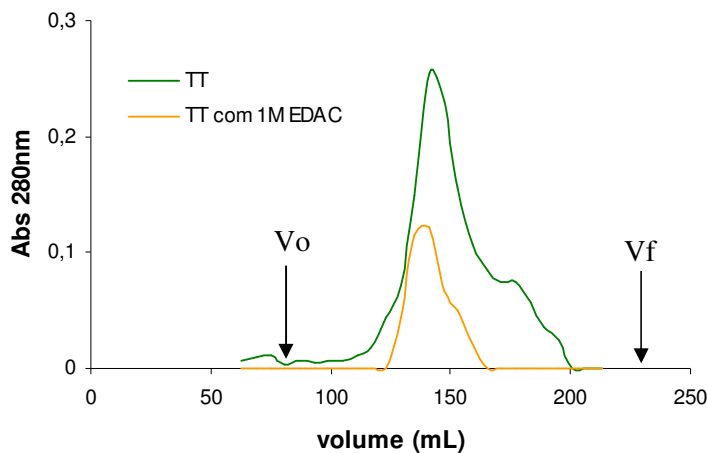


Figura F: Perfil cromatográfico de toxóide tetânico não tratado com EDAC (linha verde) e tratado com EDAC 1M (linha laranja) em Sephacryl S-400. Condição do ensaio: TT não tratado com EDAC 1mg/mL TT, tampão Na_2HPO_4 0,1M, NaCl 0,15M, pH8, 2 dias de reação; TT tratado com EDAC 1mg/mL TT, EDAC 1M, tampão Na_2HPO_4 0,1M, NaCl 0,15M, pH8, 2 dias de reação.

De acordo com a leitura no comprimento de onda A280nm e com a **figura F**, o volume de eluição das ambas as amostras é 141mL. Desta forma, podemos supor que a presença da carbodiimida não leva a polimerização de TT.

ANEXO I

Purificação do conjugado PRP-ADH-TT em cromatografia de troca iônica (Q-Sepharose f.f.)

O conjugado PRP-ADH-TT foi purificado em Q-Sepharose f.f. nas seguintes condições (Fluxo de corrida: 5mL/min, coluna: XK16):

Tampão A: Tris HCl 25mM pH7

Tampão B: Tris HCl 25mM, NaCl 1M pH7.

O programa de corrida pode ser dividido em:

- 1 – equilíbrio da resina com tampão A
- 2 – entrada de amostra (conjugado PRP-ADH-TT)
- 3 – reequilíbrio da resina com tampão A
- 4 – step com 25% de tampão B
- 5 – gradiente linear de 25 a 70% de tampão B
- 6 – step com 100% de tampão B

A **figura G** mostra o cromatograma após purificação em Q-Sepharose f.f.

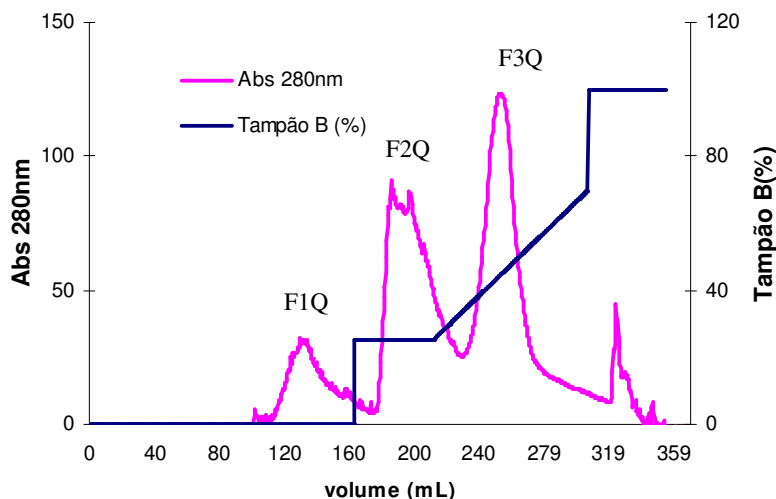


Figura G: Perfil cromatográfico do conjugado PRP-ADH-TT purificado em Q-Sepharose f.f. **F1Q** – Fração não adsorvida (flow through) + Reequilíbrio. **F2Q** – Step com 25% Tampão B. **F3Q** – Gradiente linear de 25 a 70% de Tampão B. **Tampão A:** Tris HCl 25mM pH7, **Tampão B:** Tris HCl 25mM, NaCl 1M pH7. Condição de corrida: Fluxo (5mL/min), coluna XK16.

Em corridas com amostra controle (proteína e PRP-ADH livres), a proteína é eluída com 40,7% de tampão B (F2Q) e o polissacarídeo é eluído com 59,5% de tampão B (F3Q). Quando o conjugado é aplicado na coluna, a fração que corresponde a amostra conjugada (presença de polissacarídeo e proteína concomitantemente) é eluída 62% de Tampão A (F3Q).

ANEXO J

Purificação do conjugado PRP-ADH-TT em cromatografia de interação hidrofóbica (Phenyl Sepharose f.f.)

O conjugado PRP-ADH-TT foi purificado em Phenyl Sepharose f.f. nas seguintes condições (Fluxo de corrida: 5mL/min, coluna: XK16):

Tampão A: Sulfato de amônio 0,7M, fosfato de sódio 20mM pH7.

Tampão B: Fosfato de sódio 20mM pH7.

Tampão C: Isopropanol 15%

Tampão D: Isopropanol 30%

O programa de corrida pode ser dividido em:

- 1 – equilíbrio da resina com tampão A
- 2 – entrada de amostra (conjugado PRP-ADH-TT)
- 3 – reequilíbrio da resina com tampão A
- 4 – gradiente linear decrescente de sulfato de amônio
- 5 – gradiente linear de 25 a 70% de tampão B
- 6 – step com 100% de tampão B

A **figura H** mostra o cromatograma após purificação em Q-Sepharose f.f.

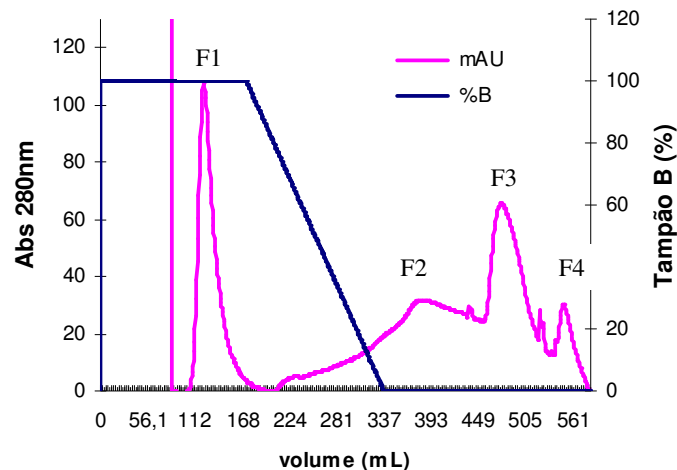


Figura H: Perfil cromatográfico do conjugado PRP-ADH-TT purificado em Phenyl Sepharose f.f. **F1** – Fração não adsorvida (flow through) + Reequilíbrio (Tampão A). **F2** – Step com 100% de Tampão B. **F3** Step com 100% de Tampão C. **F4** Step com 100% de Tampão D. **Tampão A:** Sulfato de amônio 0,7M, fosfato de sódio 20mM pH7. **Tampão B:** Fosfato de sódio 20mM pH7. **Tampão C:** Isopropanol 15%. **Tampão D:** Isopropanol 30%. Condição de corrida: Fluxo (5mL/min), coluna XK16.

Em corridas com proteína e PRP-ADH livres, a proteína é eluída com 100% de tampão B (F2) e o polissacarídeo é eluído com 100% de tampão A (F1). Quando o conjugado é aplicado na coluna este é eluído na fração correspondente ao “flow through” com 100% de tampão A (F1).

ANEXO K