

**DOUGLAS BORGES DE FIGUEIREDO**

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

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

São Paulo

2019

**DOUGLAS BORGES DE FIGUEIREDO**

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

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

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Viviane Maimoni Gonçalves

Versão original.

São Paulo  
2019

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Figueiredo, Douglas Borges de  
Desenvolvimento e produção de uma nova vacina  
pneumocócica de nanopartículas formulada para  
administração em pó por via pulmonar / Douglas Borges  
de Figueiredo; orientador Viviane Maimoni Conçalves.  
-- São Paulo, 2019.  
185 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,  
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Nanopartículas. 2. Vacinas pulmonares. 3.  
Proteína A de superfície do pneumococo. 4.  
Pneumolisina detoxificada. 5. Planejamento  
experimental. I. Conçalves, Viviane Maimoni,  
orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia**

Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Douglas Borges de Figueiredo

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

Orientador: Dra. Viviane Maimoni Gonçalves

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou o(a) candidato(a):

( ) **Aprovado(a)**                      ( ) **Reprovado(a)**

Examinador(a):                      Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Presidente:                              Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUAIB)  
INSTITUTO BUTANTAN

---

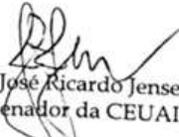
## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Desenvolvimento e produção de uma nova vacina pneumocócica de nanopartículas formulada para administração em pó por via pulmonar", protocolo nº 1378/15, sob a responsabilidade de Viviane Maimoni Gonçalves e Douglas Borges de Figueiredo - que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 13/5/2015.

This is to certify that the proposal "Development and production of a new pneumococcal vaccine of nanoparticles designed for pulmonary delivery via dry powder inhalation", protocol nº 1378/15, under the responsibility of Viviane Maimoni Gonçalves and Douglas Borges de Figueiredo - which involves the breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings) - has been reviewed by the Institute Butantan Animal Care and Use Committee and approved in 13/5/2015. This proposal is in accordance with standards outlined by Brazilian laws for use of experimental animals, and with ethical principles adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation.

<b>Vigência do Projeto:</b> 05/2015 - 03/2019 Centro de Biotecnologia	<b>Nº de animais/espécie</b> 96 Camundongos Balb/c 18-22g (F) - Procedentes da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
---	--

São Paulo, 14 de maio de 2015

  
Dr. José Ricardo Jensen  
Coordenador da CEUAIB

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada "Vacina de mucosa contra pneumonia pneumocócica baseada em nanopartículas", protocolada sob o CEUA nº 7667100317, sob a responsabilidade de **Eliane Namie Miyaji** e equipe: *Douglas Borges Figueiredo; Tasson da Costa Rodrigues; Imran Y Saleem; Viviane Maimoni Gonçalves* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto Butantan (CEUAIB) na reunião de 22/03/2017.

We certify that the proposal "Pulmonary Delivery of a Targeted Mucosal Nanocarrier Vaccine for Pneumonia", utilizing 232 Isogenics mice (232 females), protocol number CEUA 7667100317, under the responsibility of **Eliane Namie Miyaji and team; Douglas Borges Figueiredo; Tasson da Costa Rodrigues; Imran Y Saleem; Viviane Maimoni Gonçalves** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Butantan Institute (CEUAIB) in the meeting of 03/22/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **04/2017 a 03/2022** Área: **Bacteriologia**

Origem:	<b>Biotério Externo</b>		
Espécie:	<b>Camundongos isogênicos</b>	sexo:	<b>Fêmeas</b>
		idade:	<b>5 a 7 semanas</b>
		N:	<b>232</b>
Linhagem:	<b>BALB/c</b>	Peso:	<b>18 a 24 g</b>

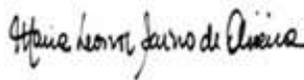
Resumo: *Streptococcus pneumoniae* é um importante patógeno humano, causando diversas doenças graves como meningite, bacteremia e pneumonia. As vacinas atualmente disponíveis são baseadas na indução de anticorpos contra o polissacarídeo capsular, mas apresentam algumas desvantagens, como o elevado custo e cobertura restrita aos sorotipos contidos nas vacinas. O uso das vacinas polissacarídicas conjugadas resultou em uma drástica redução de doença invasiva causada por sorotipos vacinais, mas houve uma rápida substituição por sorotipos não-vacinais. Além disso, essas vacinas apresentam uma eficácia bem mais baixa contra doenças não-invasivas, incluindo pneumonia não-bacterêmica. Desse modo, o desenvolvimento de novas vacinas contra pneumococo continua sendo uma prioridade e estratégias alternativas estão sendo avaliadas, como o uso de antígenos proteicos. Diversas proteínas recombinantes expressas em *Escherichia coli* estão sendo estudadas atualmente como antígenos vacinais, destacando-se PspA (Pneumococcal surface protein A) e toxóides de pneumolisina (Ply). Neste projeto, propomos testar a eficácia de formulações baseadas em nanopartículas (NPs) contendo rPspA4Pro (PspA recombinante), rPdT (triplo mutante de pneumolisina recombinante) e a fusão rPspA4Pro-rPdT para imunização pulmonar contra pneumonia pneumocócica. As NPs serão formuladas em microcarreadores, as NCMPs ([nanocomposite microparticle carriers]), estáveis e ideais para administração pulmonar com inaladores ou nebulizadores. Nosso grupo já testou imunização pulmonar com NP/NCMPs compostas por NPs do polímero PGA-c-PDL (poli(glicerol adipato-co-omega-pentadecalactona) adsorvidas com rPspA4Pro, que se mostraram imunogênicas e induziram proteção parcial em modelo de pneumonia letal em camundongos. Este projeto visa à avaliação de novas formulações vacinais. Propomos a avaliação de novas formulações de NP/NCMPs contendo antígenos proteicos. Serão testadas formulações compostas de camadas (LbL - [layer-by-layer]), sendo a primeira camada composta de PGA-co-PDL NPs adsorvidas com proteína, a segunda camada composta pelo adjuvante alfa-galactosilceramida (alfa-GC) adsorvido e a terceira camada composta de N-trimetil-quitosana (TM-CHT) ou carboximetil-quitosana (CM-CHT). Essas partículas serão formuladas então como NCMPs. A indução de resposta imune será avaliada através da dosagem de anticorpos no soro e no lavado broncoalveolar (BAL). Será realizada a análise dos níveis de citocinas e quimiocinas no BAL, assim como a imunofenotipagem de células infiltradas. A produção de citocinas por células do baço de animais imunizados e estimulados in vitro com o antígeno rPspA4Pro também será avaliada. A eficácia da imunização na proteção contra pneumonia será avaliada através de modelos de desafio intranasal letal e não-letal com diferentes linhagens de pneumococo.

Local do experimento: Biotério do Laboratório de Bacteriologia - Unidade 2

São Paulo, 27 de março de 2017



Jose Ricardo Jensen  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto Butantan



Maria Leonor Sarno de Oliveira  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto Butantan

## AGRADECIMENTOS

Antes de qualquer outra pessoa ou entidade, tenho que agradecer à minha orientadora Viviane Gonçalves por sua paciência titânica. Eu não mereci uma orientadora tão boa e nem ela um aluno tão difícil. Você é a quintessência do que um cientista deve ser, e a humanidade como um todo estaria melhor se houvessem mais Vivianes fazendo pesquisa neste mundo. E já que começamos pelos pesquisadores, gostaria de agradecer à Dra. Eliane Miyaji, por disponibilizar seu laboratório e por toda a ajuda com no manuseio dos camundongos e em tantas outras coisas. Agradeço igualmente ao seu aluno Tasson Rodrigues, pela ajuda com os experimentos. Agradeço infinitamente ao Dr. Imran Saleem e toda a sua equipe da Liverpool John Moores University por me receberem tão bem em seu laboratório e por me ensinar tanto, não só sobre a produção de nanopartículas, mas sobre diferentes culturas e costumes. Meu tempo em Liverpool foi curto, graças a vocês nunca será esquecido.

Gostaria de agradecer aos meus colegas de laboratório, os que já foram e agora ganham dinheiro na iniciativa privada, e os que ainda estão no Butantan expandindo as fronteiras da Ciência. Ste, Manu, Felipe, Sérgio, Luciano e Fara, trabalhar com vocês foi uma honra. E extremamente divertido. Também tenho que agradecer ao Dr. Joaquin Cabrera-Crespo, possivelmente a pessoa mais divertida para se conversar no mundo e que me ensinou muito sobre processos de purificação, e a Célia Liberman, que me deu um boné quando estava sol e que uma das minhas inspirações no cuidado com os animais. Também gostaria de agradecer ao Máximo, Fátima e Pedro, funcionários do laboratório, por toda a ajuda ao longo estes anos.

Já que falamos de animais no paragrafo anterior, gostaria de agradecer aos peludos que tornam esta vida tão mais fofa e divertida. Agradeço ao gato Alphonse, a gata Galadriel, a gata Ramona, ao gato Gibson, ao gato Goonie, a gata Batatinha, a tartaruga Michellangela e a cachorrinha Matilda. Eu sei que vocês nunca vão conseguir ler isso, mas vocês são os melhores bichos do mundo e foram fundamentais para a manutenção da minha saúde mental ao longo deste doutorado. Outros que contribuíram para a manutenção da minha saúde mental foram meus amigos Breno, Fabrício,

Nelson, Fábio Moraes, Fábio Augusto e Felipe. Muito obrigado por tudo! Pelas viagens juntos, pelas comilanças, filmes, jogatinas e por entenderem quando eu não podia jogar porque tinha que passar a sexta a noite no laboratório ou escrevendo.

Agradeço muito a minha mãe, Vera Lúcia e minha irmã Marina por todo o apoio, por sempre me incentivar a ser uma pessoa melhor e por acreditarem que este trabalho poderia trazer algo de bom para o mundo. E finalmente, agradeço à Anna Carolina Gatto, a pessoa mais incrível, maravilhosa e especial que eu poderia ter ao meu lado. Obrigado por sempre me apoiar, por aguentar todos os dramas, desesperos e finais de semana de trabalho sem nunca deixar de estar ao meu lado. Agora uma nova fase vai começar, e eu não poderia estar mais feliz com a pessoa que vai estar ao meu lado!

Agradeço também a CNPq, à CAPES e à FAPESP pelo apoio financeiro sem o qual este trabalho não poderia ter sido realizado.

E finalmente, agradeço a você que está se dando ao trabalho de ler esta Tese. Espero que ela lhe seja útil!

“ Por exemplo, no planeta Terra, os homens sempre se consideraram mais inteligentes do que os golfinhos por causa de tudo o que eles criaram – a roda, Nova Iorque, guerras e assim por diante – enquanto tudo o que os golfinhos faziam era ficar na água e se divertir. Mas, inversamente, os golfinhos sempre acreditaram que eram muito mais inteligentes que o homem - precisamente pelas mesmas razões.”

- Douglas Adams, O Guia do Mochileiro das Galáxias.

## RESUMO

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

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

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

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

## ABSTRACT

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

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

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

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

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: A) Representação esquemática dos quatro domínios da PspA nativa e da PspA4Pro recombinante. B) Esquema da disposição da PspA na superfície do pneumococo. .... 34
- Figura 2: Monômero de Ply solúvel e inserido na membrana. Estrutura de uma subunidade da Ply inserida na membrana (A) e estrutura via raios-X da Ply solúvel (B) vistas de lado (esquerda) e do meio do poro (direita). .... 36
- Figura 3: Estrutura geral do complexo de poros Ply. (A) Mapa de microscopia crioeletrônica de partícula única de Ply com resolução de 4,5 Å com modelo ajustado. Os quatro domínios do PLY (D1 – D4) estão coloridos em vermelho (D1), amarelo (D2), verde / ciano D3) e azul (D4). Inserção:  $\beta$ -grampos dobrados (HP1 e HP2) encaixados no mapa. Cadeias- $\beta$  (em ciano) têm reenrolado a partir de feixes de hélice em D3 da forma solúvel. (B) Seção transversal com dimensões gerais do complexo de poros. A barra cinza indica a posição da bicamada lipídica. Inserção: vista lateral do monômero inserido na membrana com densidade toroidal de anfífilos desordenados (linha tracejada). .... 37
- Figura 4: Representação esquemática de um vetor de expressão. MCS: Multiple cloning site (sítio de múltipla clonagem). Região hachurada: gene da proteína desejada. .... 40
- Figura 5: Rendimento de um processo de purificação de acordo com o número de etapas e a recuperação de cada uma delas ..... 43
- Figura 6: Divisão entre brônquio, bronquíolo e alvéolos. .... 47
- Figura 7: Representação esquemática do pulmão humano e da divisão de brônquios, bronquíolos e alvéolos. .... 48
- Figura 8: Diagrama das ramificações dos pulmões e das camadas que formam os tecidos pulmonares. Na direita, acima, estão representadas as células ciliadas e a camada de muco. Abaixo está a representação do epitélio alveolar. .... 49
- Figura 9: Comparação entre a estrutura e o epitélio das vias aéreas de camundongos e de humanos ..... 53

Figura 10: Representação esquemática de nanopartículas de quitosana atravessando o epitélio via transporte paracelular e transcelular .....	57
Figura 11: Produção das nanopartículas de PGA-co-PDL e PLGA via emulsão simples (A) e emulsão dupla (B).....	69
Figura 12: PspA4Pro ligada às nanopartículas por adsorção (A) e por encapsulamento (B).....	73
Figura 13: Produção das micropartículas de L-leucina com NP pelo método de <i>spray-dry</i> .....	76
Figura 14: Impactador de Última Geração (Next Generation Impactor, NGI).....	78
Figura 15: Estratégia de análise no FlowJo. Primeiro, determinou-se a população total de células, seguida pela população de células individuais e de células vivas. As células dendríticas (CD11b+/CD11c+) foram selecionadas dentre as células vivas. Finalmente as populações CD40+, CD80+ CD86+ e Irf1+ foram medidas em cada amostra. ....	81
Figura 16: Gel de agarose 0,8% com o gene da PdT amplificado. 1) Padrão, 2) PdT - 2 mM MgSO <sub>4</sub> e 3) PdT - 3,5 mM MgSO <sub>4</sub> .....	86
Figura 17: Gel de agarose 0,8% do pGEM-T vazio e transformado com o gene da PdT .....	87
Figura 18: Gel de agarose 0,8% mostrando o mapa de restrição do pGEM-T carregando o gene da PdT e do pET-28a. 1) Padrão, 2) Digestão pGEM-T-PdT com Eco RI, 3) Digestão pGEM-T-PdT com Nco I, 4) Digestão pGEM-T-PdT com Xho I, 5) Digestão dupla do pGEM-T-PdT com Nco I e com Xho I, 6) Digestão pET28 com Nco I, 7) Digestão pET28 com Xho I, 8) Digestão pET28 com Nco I e XhoI.....	87
Figura 19: Crescimento celular dos clones selecionados de <i>E. coli</i> BL21(DE3) pET28-PdT para avaliar a produção de PdT.....	88
Figura 20: SDS-PAGE 12% das amostras dos cultivos para escolha do clone produtor de PdT em <i>E. coli</i> BL21(DE3). 1: Clone 1 Induzido; 2: clone 1 não-induzido; 3: clone 2 induzido; 4: clone 2 não-induzido; 5: padrão de massa molecular; 6: clone 3 induzido; 7: clone 3 não-induzido; 8: clone 4 não-induzido; 9: clone 4 induzido. As flechas indicam a banda correspondente à PdT. ....	88

- Figura 21: *Western blot* das amostras dos cultivos para escolha do clone produtor de PdT em *E. coli* BL21(DE3). 1: clone 1 não-induzido; 2: clone 1 induzido; 3: clone 2 não-induzido; 4: clone 2 induzido; 5: clone 3 não induzido; 6: clone 3 induzido; 7: clone 4 não-induzido; 8: clone 4 induzido. .... 89
- Figura 22: Gráficos de Pareto mostrando a influência de cada variável nos diferentes parâmetros da etapa de clarificação da PspA4Pro. A) Remoção de proteínas totais, B) Remoção de polissacarídeos; C) Remoção de ácidos nucleicos; D) Recuperação da PspA4Pro; E) Pureza da PspA4Pro ..... 92
- Figura 23: Gráfico de Pareto e correlação entre valores preditos e experimentais dos ensaios do DCCR para a pureza da PspA4Pro. X1 corresponde à concentração de CTAB, X2 à concentração da biomassa e X3 à agitação.. 94
- Figura 24: Superfícies de resposta da pureza da PspA4Pro em função de: concentração de CTAB (X1) x concentração de biomassa úmida (X2); concentração de CTAB x agitação (X3) e concentração da biomassa úmida x agitação. A cor laranja representa a maior pureza..... 95
- Figura 25: Gráfico de Pareto e correlação entre valores preditos e experimentais dos ensaios do rotacional para a recuperação da PspA4Pro. X1 corresponde à concentração de CTAB, X2 à concentração da biomassa úmida e X3 à agitação..... 97
- Figura 26: Superfície de resposta do aumento da recuperação da PspA4Pro em função de: concentração de CTAB (X1) x concentração de biomassa úmida (X2); concentração de CTAB x agitação (X3) e concentração de biomassa úmida x agitação..... 98
- Figura 27: Gráfico de Pareto e correlação entre valores preditos e experimentais dos ensaios do rotacional para a redução de ácidos nucleicos. X1 corresponde à concentração de CTAB e X2 à concentração da biomassa. .... 99
- Figura 28: Superfície de resposta do aumento da redução de Ácidos Nucleicos em função da concentração de CTAB x concentração da amostra..... 99
- Figura 29: Gráfico de Pareto e correlação entre valores preditos e experimentais dos ensaios do rotacional para a redução de polissacarídeos totais. X1

corresponde à concentração de CTAB, X2 à concentração da biomassa e X3 à agitação.....	101
Figura 30: Superfície de resposta do aumento da recuperação da PspA4Pro em função de: concentração de CTAB x concentração da amostra; concentração de CTAB x agitação e concentração da amostra x agitação. ....	102
Figura 31: Ruptura celular das biomassas produtoras de PspA4Pro .....	104
Figura 32: Liberação da PspA4Pro adsorvida nas NP de PGA-co-PDL durante 24 h.	114
Figura 33: Liberação da PspA4Pro encapsulada nas NP de PGA-co-PDL durante 24 h .....	115
Figura 34: Liberação da PspA4Pro adsorvida nas NP de PLGA durante 24 h.....	115
Figura 35: Liberação da PspA4Pro encapsuladas nas NP de PLGA durante 24 h .....	116
Figura 36: SDS-PAGE 12% da PspA4Pro liberada das NP de PGA-co-PDL. A) PspA4Pro adsorvida. 1: PspA4pro controle; 2: Padrão de peso molecular; 3 e 4: NP com HCl-CS pH 7,0; 5 e 6: NP com CM-CS pH 4,0; 7 e 8: NP com CMC-CS pH 7,0; 9 e 10: NP sem quitosana pH 7,0; 11 e 12: NP sem quitosana pH 7,0. B) PspA4Pro encapsulada. 1: Padrão de peso molecular; 2: PspA4Pro controle; 3 e 4: NP com CM-CS; 5 e 6: NP com HCl-CS; 7 e 8: NP sem quitosana .....	117
Figura 37: Reconhecimento da PspA4Pro liberada das NP de PGA-co-PDL com proteínas adsorvidas (A) e encapsuladas (B) por anticorpos anti-PspA4Pro .....	118
Figura 38: Reconhecimento da PspA4Pro liberada das NP de PLGA com proteínas adsorvidas (A) e encapsuladas (B) por anticorpos anti-PspA4Pro.....	119
Figura 39: Ensaio de ligação à lactoferrina da PspA4Pro liberada das NP de PGA-co-PDL com proteína adsorvida (A) ou encapsulada (B) .....	120
Figura 40: Ensaio de ligação à lactoferrina da PspA4Pro liberada das NP de PLGA com proteína adsorvida (A) ou encapsulada (B) .....	121
Figura 41: Viabilidade de células dendríticas JAWS II na presença de concentrações crescentes de NP de PLGA e de PGA-co-PDL .....	123
Figura 42: Deposição das NCMP de PGA-co-PDL nas placas do NGI. A) PGA-co-PDL sem quitosana, B) PGA-co-PDL HCl-CS.....	125

Figura 43: Deposição das NCMP de PLGA nas placas do NGI. A) PLGA sem quitosana, B) PLGA HCl-CS .....	126
Figura 44: Efeito da presença das NCMP contendo diferentes formulações de NP, produzidas por emulsão simples, com e sem PspA4Pro adsorvida, na ativação de células dendríticas da medula óssea de camundongos. A) % CD CD40+ B) MFI CD40, C) % CD CD80+ D) MFI CD80, F) % CD CD86+ G) MFI CD86, G) % CD Iale+ H) MFI Iale. Diferenças estatisticamente significativas com o grupo controle sem estímulo estão indicadas (One-way ANOVA, pós-teste de Tukey). .....	128
Figura 45: Efeito da presença das NCMP contendo diferentes formulações de NP, produzidas por emulsão dupla, com e sem PspA4Pro encapsulada, na ativação de células dendríticas da medula óssea de camundongos. A) % CD CD40+ B) MFI CD40, C) % CD CD80+ D) MFI CD80, F) % CD CD86+ G) MFI CD86, G) % CD Iale+ H) MFI Iale. Diferenças estatisticamente significativas com o grupo controle sem estímulo estão indicadas (One-way ANOVA, pós-teste de Tukey). .....	130
Figura 46: Título de IgG anti-PspA4Pro no soro de animais imunizados com PspA4Pro (2 µg) e diferentes formulações de NCMP (sem PspA4Pro ou com 2 µg de PspA4Pro). A) Título após uma dose; B) Título após duas doses. Diferenças estatisticamente significativas com o grupo controle salina-pulmonar estão indicadas (One-way ANOVA, pós-teste de Tukey).....	132
Figura 47: Razão entre os títulos de IgG1 e IgG2a no soro de animais imunizados com duas doses de PspA4Pro (2 µg) e diferentes formulações de NCMP .....	133
Figura 48: Título de IgG anti-PspA4Pro no soro de animais imunizados com PspA4Pro (6 µg) e diferentes formulações de NCMP (sem PspA4Pro ou com 6 µg de PspA4Pro). A) Título após uma dose; B) Título após duas doses. Diferenças estatisticamente significativas com o grupo controle salina-pulmonar e PspA4Pro-pulmonar estão indicadas (One-way ANOVA, pós-teste de Tukey). .....	134
Figura 49: Razão entre os títulos de IgG1 e IgG2a no soro de animais imunizados com PspA4Pro (6 µg) e diferentes formulações de NCMP .....	135

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Vacinas pneumocócicas atualmente em uso .....	31
Tabela 2: Estratégia geral para otimização de um processo através do planejamento de experimentos .....	44
Tabela 3: Comparação entre as vias respiratórias de humanos e outros animais utilizados em laboratório.....	52
Tabela 4: Primers utilizados na amplificação do gene da PdT a partir do plasmídeo pET-28+PspA-PdT .....	60
Tabela 5: Descrição das condições dos ensaios da matriz Plackett& Burman de 12 ensaios - PB12 .....	64
Tabela 6: Descrição das condições dos ensaios da matriz do DCCR 23 com 6 pontos axiais e 3 pontos centrais .....	65
Tabela 7: Parâmetros utilizados para determinar a eficiência do processo de purificação .....	68
Tabela 8: Condições de preparação das NP por emulsão simples de óleo em água ....	70
Tabela 9: Esquema de imunização para o desafio com <i>S. pneumoniae</i> no experimento 1. As massas de NCMP listadas correspondem à quantidade de NCMP que contêm 2 µg de PspA4Pro.....	82
Tabela 10: Esquema de imunização para o desafio com <i>S. pneumoniae</i> no experimento 2. As massas de NCMP listadas correspondem à quantidade de NCMP que contêm 6 µg de PspA4Pro.....	83
Tabela 11: Cronograma dos experimentos de imunização com as NCMP e desafio letal com cepa virulenta de pneumococo .....	83
Tabela 12: Resultados da etapa de clarificação obtidos para os 12 ensaios (PB1-12) e os 3 pontos centrais (PC1-3) realizados de acordo com as condições definidas na matriz PB12 mostrada na Tabela 5.....	90
Tabela 13: Resultados da etapa de clarificação obtidos nos ensaios do DCCR 23 com 6 pontos axiais e 3 pontos centrais realizados de acordo com as condições mostradas na Tabela 6.....	93

Tabela 14: Cálculo de regressão e teste Anova para determinar a influência das variáveis concentração de CTAB, concentração de biomassa e agitação na pureza da PspA4Pro após a etapa de Clarificação. ....	94
Tabela 15: Cálculo de regressão e teste Anova para determinar a influência das variáveis concentração de CTAB, concentração de biomassa e agitação na recuperação da PspA4Pro após a etapa de Clarificação. ....	96
Tabela 16: Cálculo de regressão e teste Anova para determinar a influência das variáveis: concentração de CTAB e concentração de biomassa na remoção de ácidos nucleicos após a etapa de Clarificação .....	99
Tabela 17: Cálculo da regressão e teste Anova para determinar a influência das variáveis concentração de CTAB, concentração de biomassa e agitação na remoção de polissacarídeos após a etapa de Clarificação. ....	101
Tabela 18: Condições simuladas para otimização da clarificação com base nas equações geradas pelo modelo do DCCR .....	103
Tabela 19: Resultados experimentais dos ensaios realizados de acordo com as condições preditas como ótimas pelo modelo obtido do DCCR .....	103
Tabela 20: Tabela de purificação PspA4Pro empregando a clarificação com 0,1%CTAB e 100 g/L biomassa úmida (Purificação 1) .....	105
Tabela 21: Características das NP obtidas pelo método de emulsão simples a partir de cada formulação produzida .....	108
Tabela 22: Características das NP produzidas por emulsão simples com diferentes concentrações de HCl-CS .....	109
Tabela 23: Características das NP produzidas por emulsão simples com diferentes concentrações de CM-CS .....	110
Tabela 24: Características das NP produzidas por emulsão dupla quando HCl-CS e CM-CS são adicionadas às formulações .....	111
Tabela 25: Adsorção e encapsulamento da PspA4Pro nas NP .....	112
Tabela 26: Recuperação das NCMP produzidas por spray-dry .....	124
Tabela 27: Aerolização in vitro das NCMP .....	125

Tabela 28: Número de animais sobreviventes e taxa de sobrevivência após desafio letal com <i>S. pneumoniae</i> ATCC 6303. Camundongos Balb/c foram imunizados com 2 µg de PspA4Pro.....	136
Tabela 29: Número de animais sobreviventes e taxa de sobrevivência após desafio letal com <i>S. pneumoniae</i> ATCC 6303. Camundongos Balb/c foram imunizados com 6 µg de PspA4Pro.....	137
Tabela 30: Sequência de aminoácidos da PdT .....	166
Tabela 31: Composição em porcentagem de aminoácidos da PdT .....	166

## LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 - Proteínas totais.....	68
Equação 2 - Pureza PspA4Pro.....	68
Equação 3 - Quantidade de PspA4Pro.....	68
Equação 4 - Recuperação geral de PspA4Pro.....	68
Equação 5 - Recuperação por etapa de PspA4Pro.....	68
Equação 6 - Fator de purificação geral.....	68
Equação 7 - Fator de Purificação por etapa.....	68
Equação 8 – Eficiência da ligação de PspA4Pro às nanopartículas.....	73
Equação 9 – Dose de partículas finas.....	79
Equação 10 – Fração de partículas finas.....	79
Equação 11 – Modelo de pureza da PspA4Pro na etapa de Clarificação.....	95
Equação 12 – Modelo de recuperação de PspA4Pro na etapa de Clarificação.....	97
Equação 13 – Modelo de remoção de ácidos nucleicos na etapa de Clarificação.....	99
Equação 14 – Modelo de remoção de polissacarídeos na etapa de Clarificação.....	102

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

- BCG – *Bacillus Calmette-Guérin*
- BSA – Bovine Serum Albumin
- C1q – Componente do Complemento 1q
- Clear coli – cepa de *E. coli* produtora de LPS modificado
- CDC – Citolisinas dependentes de colesterol
- CM-CS – Carboximetil quitosana
- Crio-pH4,0 – Crioprecipitado em pH 4,0
- CTAB - cetyltrimethylammonium bromide
- DC – Dendritic Cells (Células Dendríticas)
- DCCR – Delineamento composto central rotacional
- DCM - Diclorometano
- DFP – Dose de partículas finas
- DMSO – Dimetil sulfóxido
- DO492 – Densidade ótica a 492nm
- DO600 – Densidade ótica a 600nm
- DOX – Cloridrato de Doxorubicina
- EDTA - Ethylenediaminetetraacetic acid
- ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
- EMA – European Medicines Agency
- FACS – Citômetro de Fluxo
- FDA – Food and Drug Administration
- FPF – Fração de partículas finas
- GM-CSF - Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
- g-PGA – Ácido poli-(gama-glutâmico)
- HCl-CS – cloridrato de quitosana
- HPLC – High-performance liquid chromatography
- IFN- $\gamma$  – Interferon gamma

IgA – Imunoglobulina A  
IgG – Imunoglobulina G  
Il-4 – Interleucina 4  
Il-6 – Interleucina 6  
IPTG - Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside  
JAWS II – linhagem comercial de células dendríticas  
LB – lysogeny broth  
Lc – Leito cromatográfico  
LPS – Lipopolissacarídeo  
MFI – Mediana da fluorescência das células marcadas  
MHC – Complexo de histocompatibilidade maior  
MMAD – Diâmetro mediano aerodinâmico de massa  
MOC – Micro Orifice Colector  
m/v – Massa/Volume  
mS/cm – Millisiemens/centímetro  
MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-dimetiltetrazolio  
NCMP – Nanocomposite microparticles (micropartículas nanocompostas)  
NGI – Next Generation Impactor  
NP - Nanopartícula  
OPD - o-phenylenediamine dihydrochloride  
PB12 – Matriz Plackett & Burman de 12 ensaios mais 3 pontos centrais  
PBS – Phosphate-Buffered Saline  
PBS-T – Tampão PBS com Tween 20  
PCR – Polymerase chain reaction  
PCV7 – Vacina pneumocócica conjugada 7-valente  
PCV10 – Vacina pneumocócica conjugada 10-valente  
PCV13 – Vacina pneumocócica conjugada 13-valente  
PDI – Índice de polidispersão

PdT – Pneumolisina geneticamente detoxificada

PEG – Polietilenoglicol

PGA-co-PDL – Poli-(glicerol adipato-co- $\omega$ -pentadecalactona)

PhtD – Proteína da tríade de histidina D

PhtE – Proteína da tríade de histidina E

pI – Ponto isoelétrico

PLG – poli-(d-L-lactídeo-co-glicolídeo)

PLGA – Ácido poli(d-L-lático-glicólico)

Ply – Pneumolisina

PlyD1 – Mutante da Ply

Plym – Mutante da Ply

PMSF - phenylmethylsulfonyl fluoride

PotD – Proteína transportadora de poliaminas

PPS23 – Vacina pneumocócica composta por de polissacarídeos 23-valente

PS – Polissacarídeo

PsaA – Adesina A de superfície do pneumococo

PspA – Proteína A de superfície do pneumococo

PspA4Pro – Fragmento da PspA do clado 4 contendo a região de  $\alpha$ -hélice e parte da região rica em prolina

PspC – Proteína C de superfície do pneumococo

PVA – Álcool polivinílico

RPMI – Méio Roswell Park Memorial Institute

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio

TCD4+ – Linfócito T CD4+

TCD8+ – Linfócito T CD8+

TNF-R – Fator de necrose tumoral

TFA – Trifluoroacetic acid

THY – Meio Todd-Hewitt com extrato de levedura

TLAB – Tecido linfoide associado aos brônquios

TLAM – Tecido linfóide associado a mucosas

UFC – Unidades formadoras de colônia

VC – Volume de coluna

v/v – Volume/volume

Ø - Diâmetro

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA .....	25
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	28
2.1. <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	28
2.2. Doenças pneumocócicas e vacinas .....	29
2.3. Proteínas do pneumococo com potencial vacinal .....	31
2.3.1. Proteína A de superfície do pneumococo .....	33
2.3.2. Pneumolisina destoxificada.....	35
2.4. Produção de antígenos proteicos.....	39
2.4.1. Sistemas de clonagem e expressão de genes heterólogos em <i>E. coli</i> .....	39
2.4.2. Purificação de bioprodutos .....	42
2.4.3. Planejamento experimental.....	43
2.5. Vacinação pulmonar.....	45
2.5.1 Anatomia dos pulmões humanos.....	46
2.5.2 Sistema imune pulmonar .....	49
2.5.3 Modelos animais para entrega de drogas nos pulmões .....	51
2.6 Vacinas de nanopartículas.....	53
2.6.1 Nanopartículas poliméricas.....	54
2.6.2. Poli-(glicerol adipato-co- $\omega$ -pentadecalactona).....	54
2.6.3. Ácido poli-(lático-co-ácido glicólico) (PLGA) .....	55
2.6.4. Quitosana .....	56
3. OBJETIVOS .....	59
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	60
4.1. Clonagem e produção da PdT .....	60
4.1.1. Obtenção do gene da PdT por PCR .....	60
4.1.2. Clonagem do gene da PdT.....	60
4.1.3. Teste de expressão do gene da PdT .....	62
4.2. Purificação da PspA4Pro .....	63
4.2.1. Ruptura celular .....	63
4.2.2. Delineamento experimental para otimização da etapa de clarificação da PspA4Pro .....	64
4.2.3. Clarificação .....	66
4.2.4. Cromatografia de troca aniônica em Q-Sepharose.....	66

4.2.5.	Crioprecipitação a pH 4,0.....	67
4.2.6.	Cromatografia de troca catiônica em SP-Sepharose.....	67
4.2.7.	Parâmetros de avaliação dos processos de purificação da PspA4Pro .....	67
4.3.	Preparo das nanopartículas de poli(glicerol adipato-co- $\omega$ -pentadecalactona) (PGA-co-PDL) e de poli(ácido lático-co-ácido glicólico) PLGA .....	68
4.4.	Caracterização da NP vazias.....	71
4.4.1.	Tamanho, índice de polidispersão e potencial Zeta.....	71
4.4.2.	Ensaio de toxicidade das NP.....	71
4.5.	Ligação da PspA4Pro às NP .....	72
4.6.	Liberação da PspA4Pro das NP.....	73
4.7.	Quantificação da proteína ligada às NP por HPLC .....	73
4.8.	Avaliação da PspA4Pro liberada das NP.....	74
4.8.1.	Integridade .....	74
4.8.2.	Reconhecimento por anticorpos.....	75
4.8.3.	Atividade biológica de PspA4Pro.....	75
4.9.	Preparação das micropartículas nanocompostas (NCMP).....	76
4.10.	Ensaio de aerolização <i>in vitro</i> das NCMP .....	77
4.11.	Ensaio de ativação de células dendríticas.....	79
4.11.1.	Extração e cultivo das células dendríticas de camundongos .....	79
4.11.2.	Estímulo das células e leitura no citômetro de fluxo .....	80
4.12.	Desafio letal com <i>S. pneumoniae</i> .....	81
4.13.1.	Preparo dos estoques da cepa de <i>S. pneumoniae</i> .....	81
4.13.2.	Imunização dos animais com as NCMP .....	82
4.13.3.	Determinação do título de anticorpos anti-PspA4pro no soro dos animais imunizados....	84
4.13.4.	Ensaio de desafio letal com cepa virulenta de pneumococo .....	85
5.	RESULTADOS .....	86
5.1.	Clonagem PdT.....	86
5.2.	Teste de expressão do gene da PdT.....	88
5.3.	Purificação PspA4Pro .....	90
5.3.1.	Delineamento experimental para otimização da etapa de clarificação da PspA4Pro .....	90
5.3.2.	Comparação entre a purificação da PspA4Pro empregando a clarificação otimizada e a clarificação com 0,1% CTAB .....	104
5.4.	Nanopartículas poliméricas.....	107
5.4.1.	Caracterização das nanopartículas.....	107

5.4.2.	Ligação da PspA4Pro às NP .....	111
5.4.3.	Caracterização da PspA4Pro liberada das NP .....	113
5.4.4.	Integridade da PspA4Pro liberada das NP.....	116
5.4.5.	Reconhecimento da proteína liberada das NP por anticorpos anti-PspA4Pro .....	117
5.4.6.	Atividade biológica .....	119
5.4.7.	Toxicidade das NP .....	123
5.4.8.	Produção das NCMP e ensaio de aerolização .....	123
5.4.9.	Ativação de células dendríticas .....	126
5.5.	Imunização de camundongos com NCMP contendo 2 ug de PspA4Pro .....	131
5.6.	Imunização de camundongos com NCMP contendo 6 ug de PspA4Pro .....	134
5.7.	Desafio letal com <i>S. pneumoniae</i> .....	136
6.	Discussão .....	138
7.	CONCLUSÕES.....	151
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	153
	ANEXO I .....	166
	ANEXO II .....	167

## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

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

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

antibióticos circulantes na população ao impedir sua transmissão (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2013). No Brasil, entre 2005 e 2015, houve mais de 7 milhões de internações no SUS decorrentes de pneumonias. De todas estas internações, aproximadamente 2 milhões foram de crianças menores de 2 anos e 1,9 milhões foram de idosos acima de 65 anos. De todos estes casos, cerca de 42 mil foram atribuídos apenas a infecções por *S. pneumoniae* (ANDRADE *et al.*, 2017).

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

Além da escolha dos antígenos, a forma de apresentação da vacina é outro fator importante a ser considerado durante seu desenvolvimento. Diferente das vacinas pneumocócicas polissacarídicas e conjugadas atualmente em uso, que são administradas através de injeção intramuscular e precisam ser armazenadas sob refrigeração, uma vacina formulada para apresentação em pó baseada em

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

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. *Streptococcus pneumoniae*

*Streptococcus pneumoniae* é um comensal que coloniza a nasofaringe humana. Apesar de a colonização ser normalmente assintomática e capaz de gerar imunidade contra o microrganismo, essa bactéria, que também pode ser chamada de pneumococo, é o principal causador de pneumonias adquiridas na comunidade (DOMMASCHK *et al.*, 2017). O pneumococo pertence à família Streptococcaceae e é uma bactéria Gram-positiva que se apresenta na forma de diplococos lanceolados ou em cadeias. Em condições de aerobiose ela possui atividade  $\alpha$ -hemolítica e, em anaerobiose,  $\beta$ -hemolítica. Sua característica mais marcante é ser envolta por uma cápsula de polissacarídeo, que é o principal fator de virulência da bactéria (HENRIQUES-NORMARK; TUOMANEN 2013). A cápsula inibe a opsonofagocitose mediada pelo complemento, que é o principal mecanismo para a eliminação do pneumococo nos pulmões. Os polissacarídeos também são altamente imunogênicos e os anticorpos gerados contra eles são empregados na classificação de *S. pneumoniae* em sorotipos (DANIELS; ROGERS; SHELTON 2016). Atualmente, são reconhecidos 97 sorotipos com base nas diferenças antigênicas dos polissacarídeos capsulares, sendo que cada um desses sorotipos tem um polissacarídeo capsular química e estruturalmente distinto (GENO *et al.*, 2015).

De acordo com a estrutura da superfície de *S. pneumoniae*, suas colônias apresentam dois aspectos distintos: colônias transparentes e colônias opacas. As colônias transparentes predominam na nasofaringe e apresentam cápsula menos espessa e menor quantidade de proteína A de superfície (PspA), outro fator de virulência importante do pneumococo. As colônias opacas produzem cápsula mais espessa, maior quantidade de PspA, têm maior capacidade de formar biofilmes e são mais invasivas (TRAPPETTI; OGUNNIYI; PATON 2011). É estimado que 40% a 70% das pessoas possuam a nasofaringe colonizada pelo pneumococo, sendo a colonização a primeira etapa do desenvolvimento da doença. Embora seja comumente assintomática, a colonização pode progredir a doenças respiratórias e sistêmicas. As infecções pneumocócicas variam consideravelmente quanto à severidade, sendo que

30% a 60% dos sobreviventes da doença invasiva carregam sequelas em longo prazo, como perda da audição e deficiências neurológicas (DE LENCASTRE *et al.*, 1999; BOGAERT *et al.*, 2004).

## **2.2. Doenças pneumocócicas e vacinas**

Não obstante a colonização da nasofaringe por *S. pneumoniae* seja bastante comum e geralmente assintomática, a invasão de outros nichos por este microrganismo pode levar a doenças graves como pneumonia bacterêmica, meningite e sepse. Estima-se que em 2015 ocorreram 2,7 milhões de óbitos por infecções respiratórias, das quais 700.000 ocorreram entre crianças com menos de 5 anos de idade, representando 12% do total de óbitos deste grupo no mundo todo. Destes óbitos, 55,8% foram causados pneumonia pneumocócica (aproximadamente 390.000 óbitos). Isso tornou a pneumonia pneumocócica a principal causa de óbitos entre crianças menores de 5 anos em todo mundo (WANG *et al.*, 2016).

Nos países de média e baixa renda *per capita*, onde há menor acesso a hospitais e antibióticos, as taxas de mortalidade entre crianças podem chegar a 20% para sepse pneumocócica (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012). Nas últimas décadas, a resistência do pneumococo à penicilina e a outros antimicrobianos tem aumentado em vários países (LIÑARES *et al.*, 2010; ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, 2013). Alguns sorotipos de pneumococo apresentam resistência a mais de 15 antibióticos diferentes e justamente estes sorotipos estão tipicamente presentes na microbiota das crianças, um dos principais grupos de risco para doenças pneumocócicas (FENOLL *et al.*, 1998). Por isso, a prevenção através da vacinação é considerada a estratégia mais eficaz para diminuir as taxas de incidência e de mortalidade dessas doenças (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012).

A primeira vacina pneumocócica foi lançada em 1977 e era composta por polissacarídeos capsulares de 14 sorotipos diferentes de pneumococo. Em 1983 a Food and Drug Administration (FDA) aprovou uma segunda vacina composta por 23 polissacarídeos capsulares dos principais sorotipos patogênicos do pneumococo (PPS23). Quando foi lançada, essa vacina cobria de 80% a 90% dos sorotipos causadores da doença em todo o mundo. A composição da PPS23 pode ser vista na Tabela 1, abaixo. A eficácia da PPS23 contra infecções pneumocócicas provocadas

pelos sorotipos cobertos pela vacina é de aproximadamente 65%. Para adultos com menos de 65 anos é recomendada entre uma e duas doses da PPS23, com intervalo de 5 anos, e mais uma dose é recomendada para indivíduos acima de 65 anos. Embora a imunização com PPS23 tenha reduzido os casos de doenças invasivas em adultos e idosos, não foi observada redução na colonização por *S. pneumoniae*. A PPS23 gera uma resposta T-independente, pois as subunidades do polissacarídeo capsular ativam as células B independentemente das células T-helper. Por isso, essa vacina é incapaz de gerar resposta imune em crianças menores de 2 anos, o principal grupo de risco das doenças pneumocócicas (DANIELS; ROGERS; SHELTON 2016).

Para contornar esse problema foram introduzidas vacinas de polissacarídeos conjugados à toxina diftérica. A conjugação do polissacarídeo a uma proteína transforma a resposta de T-independente em T-dependente, tornando a vacina eficaz em crianças menores de 2 anos. A primeira vacina conjugada foi desenvolvida em 2002 e era composta por 7 polissacarídeos diferentes (PCV7) (Tabela 1). Esta vacina reduziu significativamente as hospitalizações por doenças pneumocócicas em crianças e em idosos e também foi capaz de reduzir a colonização tanto em crianças vacinadas quanto em pessoas ao redor, devido ao fenômeno conhecido como imunidade de grupo ou proteção de rebanho (HABER *et al.*, 2007)

Em 2010 foi introduzida uma segunda vacina conjugada contendo 13 polissacarídeos distintos: os 7 sorotipos da PCV7, 5 sorotipos da PPS23 mais o sorotipo 6A, que até então não estava presente em nenhuma vacina. Isso levou à redução na taxa de infecções pneumocócicas invasivas e não invasivas dos sorotipos cobertos pela PCV7 e dos 6 sorotipos adicionais em todos os países onde a PCV13 foi introduzida (RITCHER *et al.*, 2013). No Brasil, foi introduzida em 2010 uma vacina conjugada contendo 10 sorotipos conjugados com 3 diferentes proteínas (PCV10, Tabela 1). A introdução desta vacina reduziu as hospitalizações de crianças menores de 5 anos em 35% e de idosos acima de 65 anos em 16%, gerando uma economia de mais de R\$ 190 milhões ao país (ANDRADE *et al.*, 2017). Apesar do sucesso da PCV10, já em 2012 foi observado aumento no número de casos de doenças causadas por sorotipos não vacinais (VERANI *et al.*, 2015).

Tabela 1: Vacinas pneumocócicas atualmente em uso

Vacina	Tipo	Polissacarídeos	Proteína carreadora	Efeito na doença pneumocócica
<b>23-valente (PPS23)</b>	Polissacarídeos livres	1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 20, 22F, 23F, 33F	Não se aplica	Redução das doenças invasivas Sem efeito na colonização
<b>10-valente (PCV10)</b>	Conjugada	1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C*, 19F#, 23F	Proteína D ( <i>H. influenzae</i> ), *toxóide tetânico, #anatoxina diftérica CRM <sub>197</sub>	Redução nas doenças invasivas e na colonização Imunidade de grupo Substituição de sorotipos
<b>13-valente (PCV13)</b>	Conjugada	1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F	Anatoxina diftérica CRM <sub>197</sub>	Redução nas doenças invasivas e na colonização Imunidade de grupo Substituição de sorotipos

Fonte: Adaptado de DANIELS; ROGERS; SHELTON (2016)

Apesar da eficiência das vacinas conjugadas, sua cobertura é limitada aos sorotipos presentes em sua composição. Além disso, o aumento na incidência de sorotipos não vacinais já foi observado apenas 5 anos após a introdução da PCV7 (SINGLETON *et al.*, 2007) e do aparecimento de cepas resistentes a antibióticos dentre estes sorotipos não cobertos (HSU *et al.*, 2009). Após a introdução da PCV13 nos EUA foi observado o aumento de infecções pelo sorotipo 35B (RICHTER *et al.*, 2013). Embora a cobertura dessas vacinas possa ser aumentada pela introdução de novos sorotipos em sua formulação, isso implicaria em aumento do custo da vacina, o que é um fator limitante para sua introdução, especialmente em países mais pobres.

A substituição de sorotipos, tanto na colonização quanto nas infecções, e o aumento da resistência a antibióticos entre os sorotipos não cobertos colocam a necessidade premente de desenvolvimento de novas vacinas pneumocócicas. Devido ao número elevado de sorotipos, as pesquisas atuais têm se voltado para o uso de antígenos proteicos conservados entre diferentes sorotipos.

### 2.3. Proteínas do pneumococo com potencial vacinal

Diversos antígenos proteicos têm sido estudados para compor novas vacinas pneumocócicas. Alguns exemplos de candidatos são:

- Adesina A de superfície do pneumococo (PsaA): lipoproteína componente do transportador de  $Mn^{2+}$ . A imunização nasal de camundongos com PsaA foi capaz de reduzir a colonização por *S. pneumoniae* na nasofaringe. A proteção contra a colonização foi aumentada quando a PsaA foi administrada junto da PspA. Apesar da redução da colonização, a imunização com PsaA não foi capaz de proteger os camundongos contra infecção sistêmica (JOHNSTON *et al.*, 2004).
- Proteína C de superfície do pneumococo (PspC): proteína de superfície associada à parede celular. PspC é capaz de se ligar ao componente C3 e ao fator H do complemento e ao componente secretório da imunoglobulina A. Além disso, PspC é altamente imunogênica e presente em quase todas as cepas de pneumococo, mas por ser muito polimórfica, é comum que cepas diferentes expressem PspC com variantes antigênicas diferentes umas das outras, o que é um obstáculo ao seu uso como vacina de ampla cobertura (GEORGIEVA *et al.*, 2018).
- Proteínas da tríade de histidina D e E (PhtD e PhtE): são proteínas de superfície conservadas entre diferentes cepas de pneumococo. Em modelos animais, ambas foram capazes de proteger contra sepse, pneumonia e colonização. Ensaio clínico com a PhtD e a PhtE mostraram proteção contra infecção natural em crianças e adultos (KHAN; PICHICHERO 2012).
- Proteína transportadora de poliaminas (PotD): proteína extracelular que transporta poliaminas para dentro da célula. Foi demonstrado que a PotD contribui para a virulência em modelos murinos de sepse e de pneumonia com pneumococo sorotipo 3. A imunização de camundongos com PotD recombinante gerou alto título de anticorpos anti-PotD e protegeu os animais em desafio letal com pneumococo sorotipo 3 (SHAH; SWIATLO 2006).

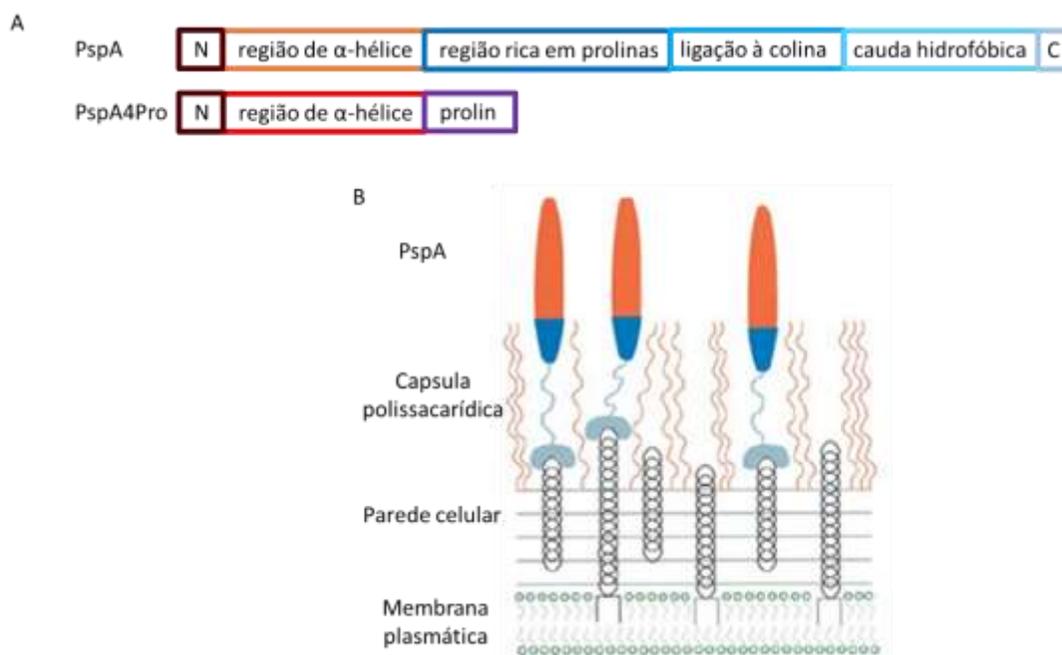
Outros dois candidatos vacinais importantes são a proteína A de superfície do pneumococo (PspA) e a pneumolisina geneticamente destoxificada (PdT), que vêm sendo amplamente estudadas como antígenos para a produção de novas vacinas pneumocócicas, sejam elas proteicas, conjugadas ou de nanopartículas. Estas

proteínas foram escolhidas como antígenos proteicos para as vacinas de nanopartículas produzidas neste trabalho. Esta escolha foi feita com base em estudos prévios realizados por nosso grupo envolvendo a produção e a imunização de camundongos com esses antígenos, que serão apresentados em mais detalhes nos próximos itens.

### **2.3.1. Proteína A de superfície do pneumococo**

PspA é uma proteína formada por 4 domínios distintos. Da porção N-terminal para a porção C-terminal ela é composta por uma região  $\alpha$ -hélice antiparalela e altamente carregada, uma região rica em prolina, uma região de ligação à colina e cauda hidrofóbica de 17 aminoácidos na porção C-terminal (MUKERJI *et al.*, 2012). Na sequência gênica de PspA encontra-se também um peptídeo sinal, que está ausente da proteína madura e direciona a PspA para fora da célula (Figura1). A região de  $\alpha$ -hélice da proteína tem sido bastante estudada por sua capacidade de gerar resposta imune mediada por anticorpos em camundongos e por ser a porção da proteína exposta além da capsula polissacarídica, portanto mais acessível a anticorpos (MUKERJI *et al.*, 2018). Outra região bastante estudada da PspA é a região rica em prolina. Esta região é composta por unidades de repetição com uma prolina a cada 3 ou 4 resíduos. Estas unidades de repetição podem ser interrompidas por sequências de aminoácidos sem prolina, chamados de blocos sem prolina, ou non-Pro. A região rica em prolina é bastante conservada e presente em todas as PspA, e já mostrou ser capaz de gerar proteção mediada por anticorpos em camundongos contra doenças pneumocócica invasiva (MUKERJI *et al.*, 2018).

Figura 1: A) Representação esquemática dos quatro domínios da PspA nativa e da PspA4Pro recombinante. B) Esquema da disposição da PspA na superfície do pneumococo.



Fonte: Adaptado de JEDRZEJAS *et al.*, 2001 e de MORENO *et al.*, 2010.

PspA atua protegendo o pneumococo da ação bacteriostática e bactericida da lactoferrina, uma glicoproteína família da ferritina que faz parte do sistema imune inato (SENKOVICH *et al.*, 2007). PspA também impede a deposição de complemento na superfície da bactéria, evitando assim a opsonização e morte da bactéria pelo sistema complemento. Foi observado que em cepas deficientes em PspA a deposição de complemento pela via clássica dependente de C1q é muito maior do que em cepas com PspA e que a remoção de bactérias deficientes em PspA do sangue era mais rápida do que a remoção de bactérias com PspA (MUKERJI *et al.*, 2012).

Com base na homologia e no alinhamento das sequências de aminoácidos de PspA de diferentes cepas de *S. pneumoniae*, foram observadas 3 famílias distintas desta proteína, as quais podem ser divididas em 6 grupos, denominados clados. A família 1 da PspA é constituída por dois clados: 1 e 2; a família 2, por três clados: 3, 4 e 5 e a família 3, por apenas um clado: 6 (HOLLINGSHEAD, S. K., BECKER, R., BRILES, D. E. 2000). Cada cepa de pneumococo carrega PspA de uma única família. Dentre os principais sorotipos causadores da doença foi observada a presença predominante de PspA das famílias 1 e 2. PspA de diferentes famílias apresentam

reatividade imune cruzada, assim a imunização com PspA de uma família normalmente é capaz de gerar proteção contra outras PspA da mesma família e algumas vezes contra cepas com PspA de famílias diferentes (NABORS *et al.*, 2000, MUKERJI *et al.*, 2012).

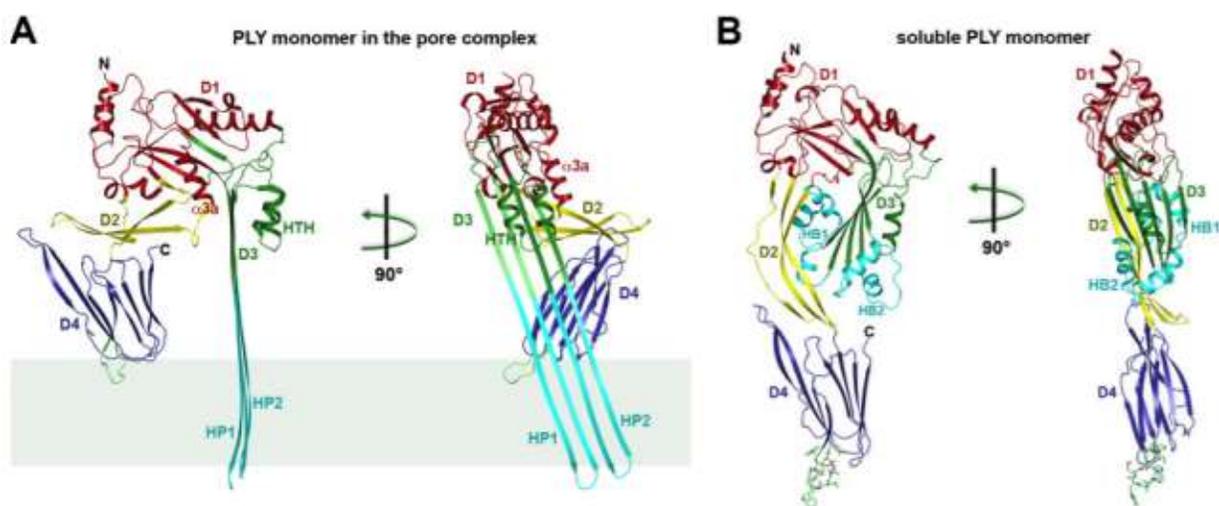
Muitos trabalhos já apontam para o potencial imunogênico da PspA. Experimentos de desafio de animais imunizados com PspA por via intramuscular demonstraram elevada proteção em camundongos (VANDESILHO *et al.*, 2012) e a imunização intramuscular de voluntários humanos com PspA usando hidróxido de alumínio como adjuvante induziu a produção de IgG anti-PspA e o soro dos indivíduos imunizados protegeu camundongos desafiados com pneumococo de diferentes sorotipos em ensaios de imunização passiva (MIYAJI *et al.*, 2013). Vacinas de *Salmonella* recombinante expressando o gene de PspA foram capazes de proteger camundongos desafiados com *S. pneumoniae* e uma vacina de *Salmonella* atenuada recombinante, expressando o gene de PspA, encontra-se em estudos clínicos de fase um (FREY *et al.*, 2013). FERREIRA *et al.*(2013) realizaram a imunização parenteral de camundongos com uma vacina de DNA expressando o gene de PspA3. Esta vacina induziu a produção balanceada de IgG1 e IgG2a, protegeu os camundongos contra desafio peritoneal com pneumococo e protegeu os animais contra a colonização da nasofaringe (FERREIRA *et al.*, 2006; FERREIRA *et al.*, 2010). A imunização nasal de camundongos com PspA recombinante dos clados 1 a 4 mostrou haver reatividade cruzada entre PspA de famílias diferentes na proteção contra colonização por pneumococo (TOSTES, *et al.*, 2017). Já a imunização pulmonar com PspA4Pro foi estudada por Rodrigues *et al.* (2018), que utilizaram nanopartículas carregadas com PspA4Pro para imunizar camundongos. A imunização levou à produção de IgG anti-PspA4Pro e protegeu parcialmente os animais no ensaio de desafio contra pneumococo.

### **2.3.2. Pneumolisina destoxificada**

A pneumolisina (Ply) é uma toxina produzida pelo pneumococo que pertence à família das citolisinas dependentes de colesterol (CDC), toxinas que também são encontradas em outras bactérias Gram-positivas (TYLLEY *et al.*, 2005). Ply possui 53

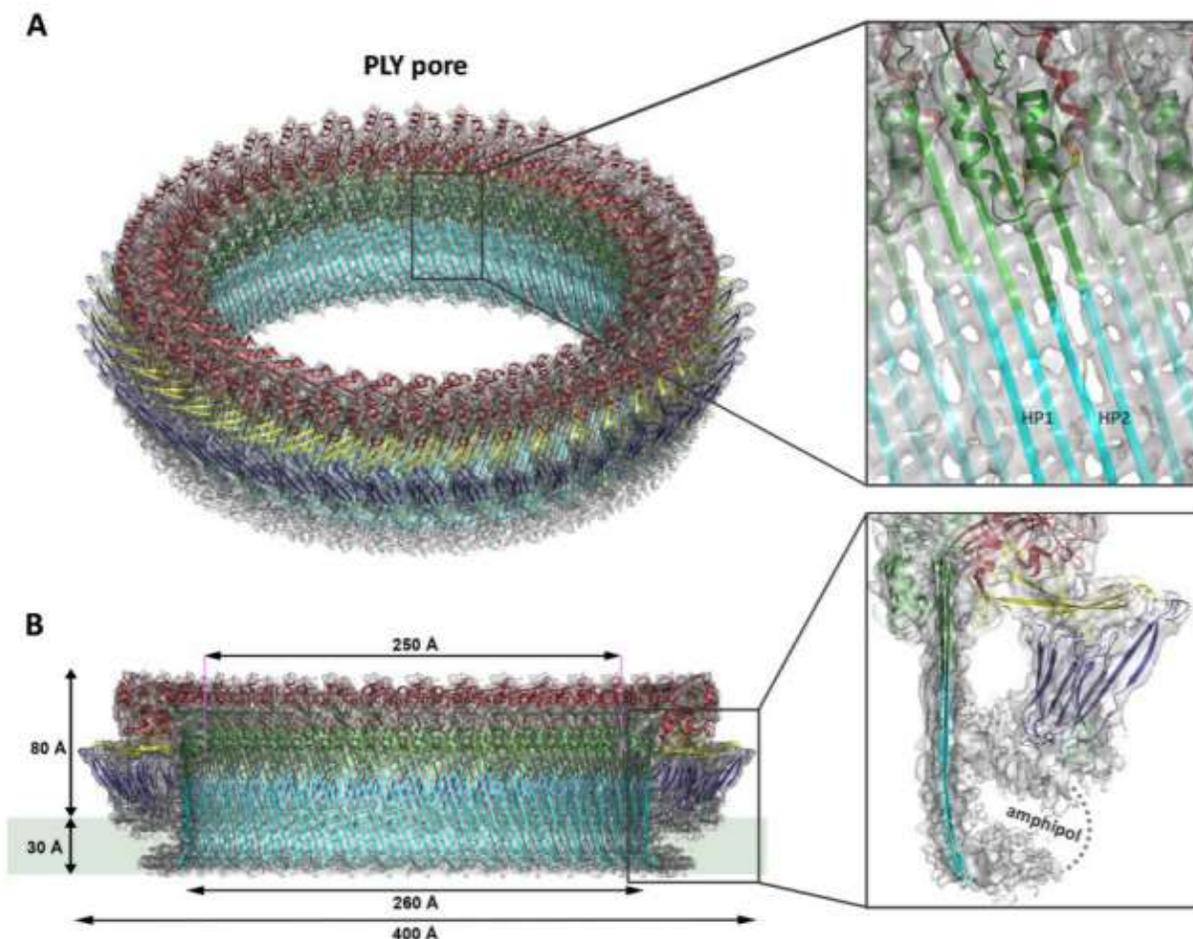
kDa e superfície altamente eletronegativa. No caso do pneumococo, ela é citoplasmática e liberada *in vivo* durante a autólise (ROSSJOHN *et al.*, 1998), formando oligômeros ao ligar-se ao colesterol da membrana plasmática e gerando poros em forma de anel que promovem a lise das células do hospedeiro. Inicialmente os monômeros se ligam à superfície da célula (Figura 2). Ocorre o enovelamento de pares de  $\alpha$ -hélice em pares de  $\beta$ -grampos transmembranas, que formam a parede do pré-poro. Por fim, o pré-poro sofre uma mudança conformacional e se insere na membrana celular, formando o poro maduro (SONNEN; PLITZKO; GILBERT 2014) (Figura 3).

Figura 2: Monômero de Ply solúvel e inserido na membrana. Estrutura de uma subunidade da Ply inserida na membrana (A) e estrutura via raios-X da Ply solúvel (B) vistas de lado (esquerda) e do meio do poro (direita).



Fonte: VAN PEE *et al.*, 2017

Figura 3: Estrutura geral do complexo de poros Ply. (A) Mapa de microscopia crio-eletrônica de partícula única de Ply com resolução de 4,5 Å com modelo ajustado. Os quatro domínios do PLY (D1 – D4) estão coloridos em vermelho (D1), amarelo (D2), verde / ciano D3) e azul (D4). Inserção:  $\beta$ -grampos dobrados (HP1 e HP2) encaixados no mapa. Cadeias- $\beta$  (em ciano) têm reenrolado a partir de feixes de hélice em D3 da forma solúvel. (B) Seção transversal com dimensões gerais do complexo de poros. A barra cinza indica a posição da bicamada lipídica. Inserção: vista lateral do monômero inserido na membrana com densidade toroidal de anfifílicos desordenados (linha tracejada).



Fonte: VAN PEE *et al.*, 2017

Todos os isolados clínicos de pneumococo expressam Ply, que possui uma série de funções que favorecem a colonização e infecção pelo pneumococo. Ply é importante para a colonização da nasofaringe e dos pulmões pelo pneumococo, visto que cepas mutantes Ply deficientes apresentam menor capacidade de colonização do que suas contrapartidas selvagens (KADIOGLU *et al.*, 2002). Ply também influencia na produção de citocinas. Camundongos infectados com pneumococo selvagem apresentaram níveis maiores de interleucina-6 (IL-6) no plasma do que aqueles infectados com

mutante sem Ply. Esta toxina também influencia na produção do fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), uma citocina pró-inflamatória necessária para o controle da carga bacteriana nos pulmões e na corrente sanguínea durante a pneumonia pneumocócica (HIRST *et al.*, 2004). Também foi mostrado que Ply aumenta a chegada de neutrófilos nos pulmões durante a doença pneumocócica invasiva, provavelmente devido ao dano causado ao tecido por sua ação lítica, que induz a produção de citocinas. Apesar de os neutrófilos serem os principais responsáveis pela eliminação do pneumococo nos pulmões, já foi observado que sua ação é inibida por Ply, provavelmente por sua ação citotóxica (HIRST *et al.*, 2004; KADIOGLU *et al.*, 2000). De fato, um estudo anterior *in vitro* já havia mostrado a inibição da ação fagocítica de células imunes na presença de Ply (NANDOSKAR *et al.*, 1986).

Embora seja um antígeno promissor, Ply é muito tóxica para ser utilizada em vacinas humanas. Para contornar este problema, mutações direcionadas têm sido utilizadas para gerar pneumolisinas atóxicas, mas ainda imunogênicas, que são denominadas pneumolisoides. O mutante PlyD1, que difere da pneumolisina selvagem pela substituição de três aminoácidos (T65C, G293C, C428A), foi testado em humanos adultos saudáveis num regime de três doses. Após a última dose não foram observados efeitos adversos e PlyD1 foi capaz de gerar anticorpos antígeno específicos (KAMTCHOUA *et al.*, 2013). PAUKSENS *et al.* (2014) testaram pneumolisina destoxificada livre e conjugada a polissacarídeos de 8 sorotipos diferentes de pneumococo em um ensaio randomizado com indivíduos entre 65 e 85 anos. Tanto Ply livre quanto conjugada se mostraram seguras e capazes de gerar resposta imune. LU *et al.* (2014) verificaram que o mutante Plym2, obtido pela troca dos aminoácidos G428G e W433F, foi capaz de gerar anticorpos neutralizantes contra a toxina nativa, embora não tenha sido capaz de proteger camundongos contra desafio letal com pneumococo. Por fim, vacinas compostas por pneumolisina destoxificada juntamente com a proteína PhtD, sozinhas ou acompanhadas de polissacarídeos, encontram-se em ensaios clínicos de fase I e II (PRYMULA *et al.*, 2014, LEROUX-ROELS *et al.*, 2014, PRYMULA *et al.*, 2017).

O mutante PdT foi produzido pela substituição de 3 aminoácidos: Asp-385 por Asn, Cys-428 por Gly e Trp-433 por Phe. Estas mutações reduziram a atividade hemolítica, a capacidade de ligação com a imunoglobulina G e a ativação do

complemento (BERRY *et al.*, 1995). A imunização subcutânea de camundongos com uma proteína híbrida formada por um fragmento de PspA ligado à PdT e uma cepa de *Bacillus Calmette–Guérin* (BCG) utilizada como adjuvante induziu a produção de anticorpos contra as duas proteínas e protegeu os animais em ensaio de desafio (GOULART *et al.*, 2017). Outro trabalho que investigou a imunização conjunta de Ply com outra proteína foi realizado por DOUCE *et al.* (2010), que realizaram a imunização intranasal com um híbrido de PsaA-Ply. Embora a imunização com este híbrido tenha gerado altos níveis de anticorpos específicos contra esses antígenos, ela não foi capaz de proteger os camundongos contra infecção pelo pneumococo.

## **2.4. Produção de antígenos proteicos**

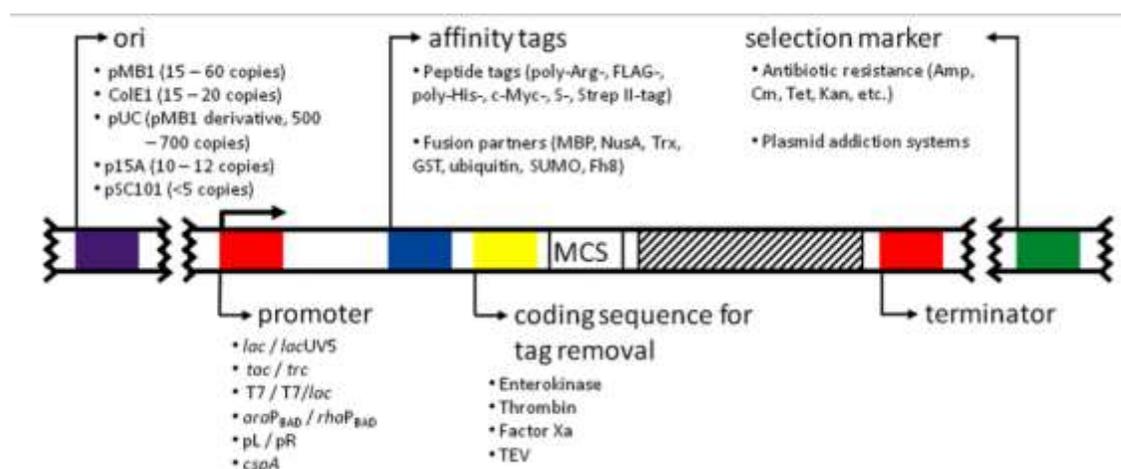
### **2.4.1. Sistemas de clonagem e expressão de genes heterólogos em *E. coli***

A produção de proteínas recombinantes revolucionou a biotecnologia. Antes do aparecimento desta técnica, era comum que quilos de tecido animal ou vegetal fossem necessários para purificar poucos gramas de uma proteína de interesse. Quando o produto de interesse era uma proteína bacteriana, podia-se esperar cultivos longos e de baixo rendimento. Hoje, a capacidade de sintetizar e purificar rapidamente proteínas recombinantes em grande quantidade viabiliza a caracterização e aplicação industrial destas macromoléculas (ROSANO; CECCARELLI 2014).

A produção de uma proteína recombinante depende, essencialmente, de quatro fatores: o gene da proteína de interesse, o vetor de clonagem, o vetor de expressão e o hospedeiro para receber o vetor e produzir a proteína. Os vetores de clonagem e de expressão mais utilizados são os plasmídeos: pequenas moléculas circulares de DNA dupla-fita extracromossomal, que são capazes de invadir bactérias e de se multiplicarem sozinhos, independentemente dos cromossomos. Os vetores de clonagem são utilizados para armazenar e aumentar o número de cópias do gene da proteína de interesse. Estes vetores não são capazes de expressar o gene, que, após ser amplificado, deve ser transferido para o vetor de expressão, que possui maior taxa de tradução da proteína de interesse.

Resumidamente, um vetor de expressão deve possuir um sítio de ligação ao ribossomo, para tornar possível a iniciação da tradução, além de um códon de iniciação e um códon de terminação (que podem estar presentes no vetor ou no próprio inserto), um promotor para transcrição forte e regulável, que deverá manter baixo o nível de tradução até o momento da indução, para conseguir maior produtividade da proteína de interesse (Figura 4).

Figura 4: Representação esquemática de um vetor de expressão. MCS: Multiple cloning site (sítio de múltipla clonagem). Região hachurada: gene da proteína desejada.



Fonte: ROSANO; CECCARELLI 2014

A sequência promotora T7 é muito usada para expressão de genes heterólogos em *Escherichia coli* devido à sua afinidade elevada pela T7 RNA polimerase e elevado nível de expressão. O sistema repressor mais comum é o baseado no operon *lac*, que fica reprimido por LacI e é induzido por lactose ou isopropil- $\beta$ -D-tiogalactosídeo (IPTG). Além disso, o vetor de expressão deve ter um marcador para seleção celular, geralmente um gene que confere resistência a um determinado antibiótico, e um sítio de múltipla clonagem, com diversos sítios de restrição distintos, para tornar possível a inserção do gene no sentido correto (ROSANO; CECCARELLI, 2014). Muitos vetores também possuem sequências que inserem caudas de afinidade para facilitar a purificação, além de sequências de sítios proteolíticos para remover essas fusões quando for necessário.

A escolha do hospedeiro é o que irá nortear todo o processo, definindo o tipo de cultivo a ser realizado, qual meio será utilizado e quais equipamentos serão

necessários. Dentre os microrganismos que podem ser utilizados podemos citar leveduras, fungos filamentosos, bactérias, algas unicelulares, células de animais, plantas ou insetos (DEMAIN *et al.*, 2009). Neste trabalho, a expressão do gene da PdT foi feita em *E. coli*, uma das bactérias melhor estudadas e mais utilizadas na produção de proteínas recombinantes. As principais vantagens obtidas ao escolher *E. coli* para produzir uma proteína recombinante são:

- Rápido crescimento: em condições ideais a quantidade de bactérias pode dobrar a cada 20 minutos;
- Alta produtividade: cultivos de alta densidade celular podem produzir até 200 g/L de massa seca;
- Alta taxa de expressão do gene da proteína de interesse;
- Cultivo fácil e que emprega meios de cultura feitos com reagentes que podem ser facilmente obtidos comercialmente;
- A transformação com DNA exógeno é fácil e rápida.

Apesar de possuir muitas vantagens, algumas desvantagens devem ser levadas em consideração antes da escolha de *E. coli* como hospedeiro. Por ser uma bactéria Gram-negativa, a proteína sempre será obtida juntamente com lipopolissacarídeo (LPS) ou endotoxina. Isso é um problema porque a entrada de endotoxinas na corrente sanguínea causa febre e pode levar o paciente a óbito. Além disso, endotoxinas possuem forte efeito adjuvante e sua presença pode falsear experimentos de imunização com antígenos produzidos em *E. coli* (AKEL 2015). Para eliminar as limitações relativas ao LPS, uma cepa comercial, a *Clear Coli* (Lucigen, Alemanha), foi desenvolvida para produzir um LPS geneticamente modificado para não causar a resposta inflamatória característica do LPS nativo. Além disso, a síntese de proteínas que tenham muitas ligações dissulfeto é difícil nesse hospedeiro e *E. coli* é incapaz de produzir proteínas glicosiladas (DEMAIN *et al.*, 2009). Contudo, isso não representa problema na produção de PspA ou PdT por *E. coli*, já que estas proteínas não são glicosiladas e nem possuem ligações dissulfeto. Apesar de possuir algumas desvantagens, a produção de proteínas em *E. coli* ainda é bastante eficiente, economicamente viável e largamente empregada em escala laboratorial e industrial.

### **2.4.2. Purificação de bioprodutos**

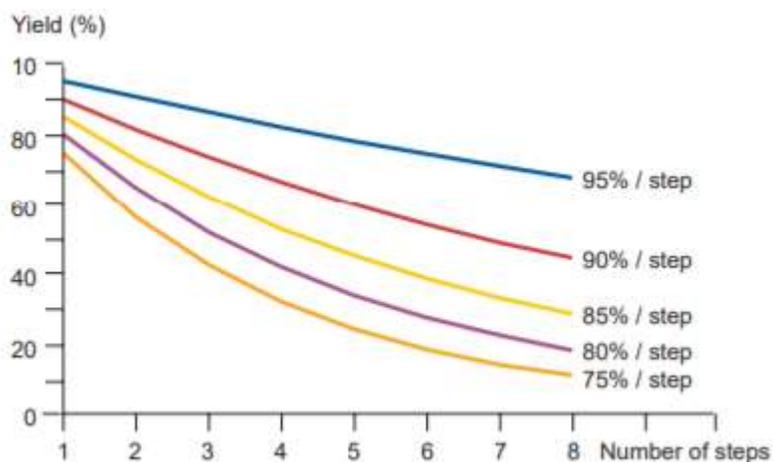
A purificação de um bioproduto envolve uma série de operações sequenciais que se baseiam nas diferenças das propriedades físico-químicas do produto de interesse e das impurezas presentes, que são as moléculas oriundas do hospedeiro, de forma a enriquecer progressivamente o produto e a eliminar os componentes indesejados. A purificação de uma proteína pode ser dividida em etapas distintas (HARRISON 2015):

- Extração da proteína da célula produtora. Esta etapa não é necessária se a célula transportar a proteína para fora do citoplasma durante o cultivo.
- Remoção de material insolúvel, geralmente realizada por centrifugação ou filtração.
- Purificação intermediária. A proteína de interesse é separada das outras proteínas e contaminantes por técnicas diversas como cromatografias (troca iônica, afinidade por metal, hidrofóbica, mista), precipitação seletiva, tratamento enzimático, cristalização, etc. Esta etapa preza por alta resolução e alta capacidade e é nela onde maior parte dos contaminantes é removida.
- Polimento. Nesta etapa é feita a remoção dos contaminantes restantes, aqueles que apresentam características físico-químicas muito parecidas com aquelas da proteína de interesse. Esta etapa preza por alta resolução e alta recuperação. Como normalmente as separações por carga, hidrofobicidade e afinidade já foram executadas, é comum que o polimento se dê por gel filtração.

Quando se planeja um processo de purificação, o primeiro passo é determinar a pureza requerida para o produto. Enzimas para uso industrial, por exemplo, requerem menor grau de pureza do que produtos terapêuticos, que requerem pureza próxima de 100% (HARRISON 2015). Quanto maior a pureza, maior tende a ser o número de etapas do processo. Como em cada etapa do processo ocorre alguma perda de produto (Figura 5), produtos que requerem alta pureza normalmente possuem baixo

rendimento final. Desta forma, o desenvolvimento de um processo de purificação deve buscar reduzir ao máximo o número de etapas, mas sem comprometer a pureza final.

Figura 5: Rendimento de um processo de purificação de acordo com o número de etapas e a recuperação de cada uma delas



Fonte: AMERSHAM BIOSCIENCE, 2018

### **2.4.3. Planejamento experimental**

Estabelecer ou otimizar um processo através de experimentos feitos à base de “tentativas e erros” demanda muito tempo, gasto de material, e nem sempre oferece as respostas desejadas. Dada a necessidade crescente de otimizar processos e produtos, tem sido cada vez mais comum a busca por ferramentas sistemáticas de planejamento de experimentos (RODRIGUES; IEMMA, 2009). A metodologia do planejamento experimental, comumente referida como DOE (da sigla em inglês, Design of Experiments) é uma ferramenta fundamentada na teoria estatística que fornece informações sobre um processo para minimizar o empirismo que envolve técnicas de tentativa e erro.

Dentre as vantagens do planejamento experimental podemos citar:

- a) Redução do número de experimentos ou repetições, bem como melhorar a qualidade das informações obtidas através destes experimentos. Isso permite reduzir a quantidade de trabalho, o tempo despendido e o uso de reagentes.
- b) Análise simultânea de diferentes fatores, verificando a existência de efeitos sinérgicos ou antagônicos.
- c) Permite otimizar mais de uma resposta ao mesmo tempo.

d) Possibilita calcular e avaliar o erro experimental, o que é fundamental para especificar o nível de confiança estatística, com o qual pode-se estimar a reprodutibilidade do resultado esperado. Isso permite avaliar se uma variação no resultado é decorrente da alteração de uma ou mais variáveis ou apenas fruto de erro experimental.

A escolha da melhor estratégia de planejamento experimental depende principalmente do número de variáveis independentes que se deseja estudar e do conhecimento que já se possui do processo. Quando o número de variáveis é muito grande, é recomendado que se execute primeiro uma análise fatorial fracionada de modo a reduzir o número de ensaios. A Tabela 2, abaixo apresenta uma estratégia sequencial comumente utilizada para otimizar um processo.

Tabela 2: Estratégia geral para otimização de um processo através do planejamento de experimentos

Etapa	Objetivo	Situação	Estratégia
Seleção de variáveis	Identificar as variáveis mais importantes	Muitas variáveis e pouco conhecimento do processo	Fatorial fracionado ou Plackett & Burman
Otimização	Construir os modelos preditivos	Poucos fatores já dentro de uma região ótima	Fatorial completo

Fonte: Adaptado de RODRIGUES; IEMMA, 2009

O planejamento experimental pode ser utilizado em diversas etapas da produção de um produto, desde o cultivo do microrganismo, como no trabalho de MARTHOS *et al.* (2015), onde o planejamento experimental foi utilizado na escolha do melhor meio de cultura para produção de polissacarídeo capsular por *S. pneumoniae* do sorotipo 1 em biorreator, passando pela purificação, como no trabalho de TOUEILLE *et al.* (2011), que utilizou esta ferramenta para otimizar a purificação de anticorpos monoclonais, até a formulação do produto final, como nos trabalhos de KUNDA *et al.* (2015) e ALFAGIH *et al.* (2015) que utilizaram desta ferramenta para determinar as condições de preparo de nanopartículas de poli-(glicerol adipato-co- $\omega$ -pentadecalactona) (PGA-co-PDL) que resultassem em nanopartículas com o tamanho desejado.

## 2.5. Vacinação pulmonar

Os pulmões têm sido utilizados como via de entrega de medicamentos há milênios. Registros arqueológicos mostram que aproximadamente 4000 anos atrás, na Índia, indivíduos inalavam folhas de *Atropa belladonna* para tratar a tosse. Bem mais recentemente, nos séculos 19 e 20, pessoas que sofriam com asma fumavam cigarros com tabaco e pó de estramônio para aliviar os sintomas da doença (LABIRIS; DOLOVICH, 2003). Atualmente, vacinação pulmonar tem recebido atenção por permitir a imunização sistêmica e de mucosas. Esta rota é acessível, pouco invasiva, tem elevada área superficial e favorece a estabilidade das vacinas administradas. A vacinação pulmonar evita ainda o uso de agulhas, representando um risco menor para quem administra a vacina e também para quem a recebe.

A maioria das vacinas atualmente em uso é administrada por rota parenteral através de injeção intramuscular ou subcutânea. A administração parenteral possui diversas desvantagens, como risco de ferimentos ao paciente e ao administrador durante a aplicação da vacina, transmissão de doenças caso o material não esteja corretamente esterilizado e produção de resíduos perfurocortantes. Além disso, a maioria das formulações vacinais de administração parenteral disponíveis requer constante armazenamento em baixa temperatura para manter sua integridade, o que dificulta as campanhas de imunização em locais sem distribuição de energia e aumenta o custo do armazenamento das vacinas (CARSTENS, 2009). Desta forma, novas rotas de administração e formulações vacinais mais estáveis têm sido estudadas. A vacinação pulmonar oferece diversas vantagens sobre a vacinação parenteral e sobre outras rotas de imunização de mucosa. O alto título de anticorpos de mucosa produzidos no trato respiratório confere proteção imediata no local de infecção contra patógenos que entram pelos pulmões. Embora a vacinação nasal também induza resposta sistêmica e local, a imunização pulmonar possui a vantagem de gerar diferentes graus de resposta imune de acordo com a região dos pulmões para onde a vacina é dirigida (TONNIS *et al.*, 2012). Além disso, a grande área de superfície, a intensa vascularização e o epitélio fino do tecido pulmonar alveolar facilitam a entrega sistêmica de antígenos, reduzindo a dose necessária para imunização eficaz (SOU *et al.*, 2011). Antígenos inalados de papilomavírus humano e polissacarídeos

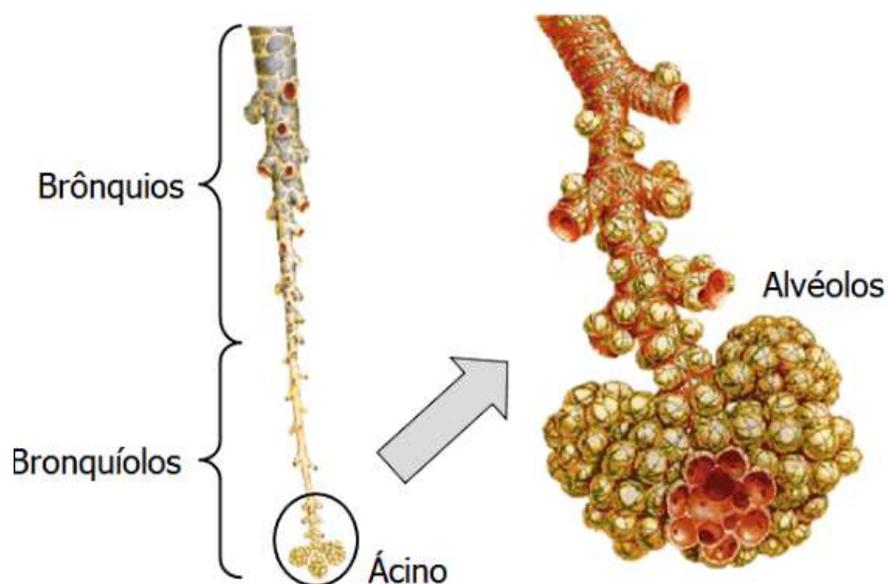
pneumocócicos induziram anticorpos específicos em pacientes e em voluntários humanos saudáveis (NARDELLI-HAEFLIGER *et al.*, 2005; MENZEL *et al.*, 2005). MUFLIAH *et al.* (2018) estudaram o uso de imunização intranasal com vírus da influenza A recombinante contra *M. tuberculosis*. Uma única dose foi capaz de produzir células T-CD4+ específicas contra o epítipo expresso e conferiu proteção contra infecção por *M. tuberculosis* nos pulmões

O sucesso para desenvolver uma vacina pulmonar depende primeiro de conhecer a anatomia e o sistema imune dos pulmões.

### **2.5.1 Anatomia dos pulmões humanos**

Os pulmões humanos são divididos pela membrana pleural em 5 lobos, 3 do lado direito e 2 do lado esquerdo. Uma vez inalado, o ar passa pelo nariz ou pela boca para a faringe, depois para traqueia e para os brônquios principais dos pulmões direito e esquerdo. Os brônquios principais se dividem em brônquios lobares e estes, por sua vez, em brônquios segmentares, cada um distribuído em um segmento do pulmão. Os brônquios segmentares continuam a se dividir, desta vez em bronquíolos (Figura 6). Cada nova divisão é denominada geração. Estima-se que um pulmão médio possua cerca de 300 milhões de alvéolos e uma área superficial de 80 a 90 m<sup>2</sup> (NETTER 2000).

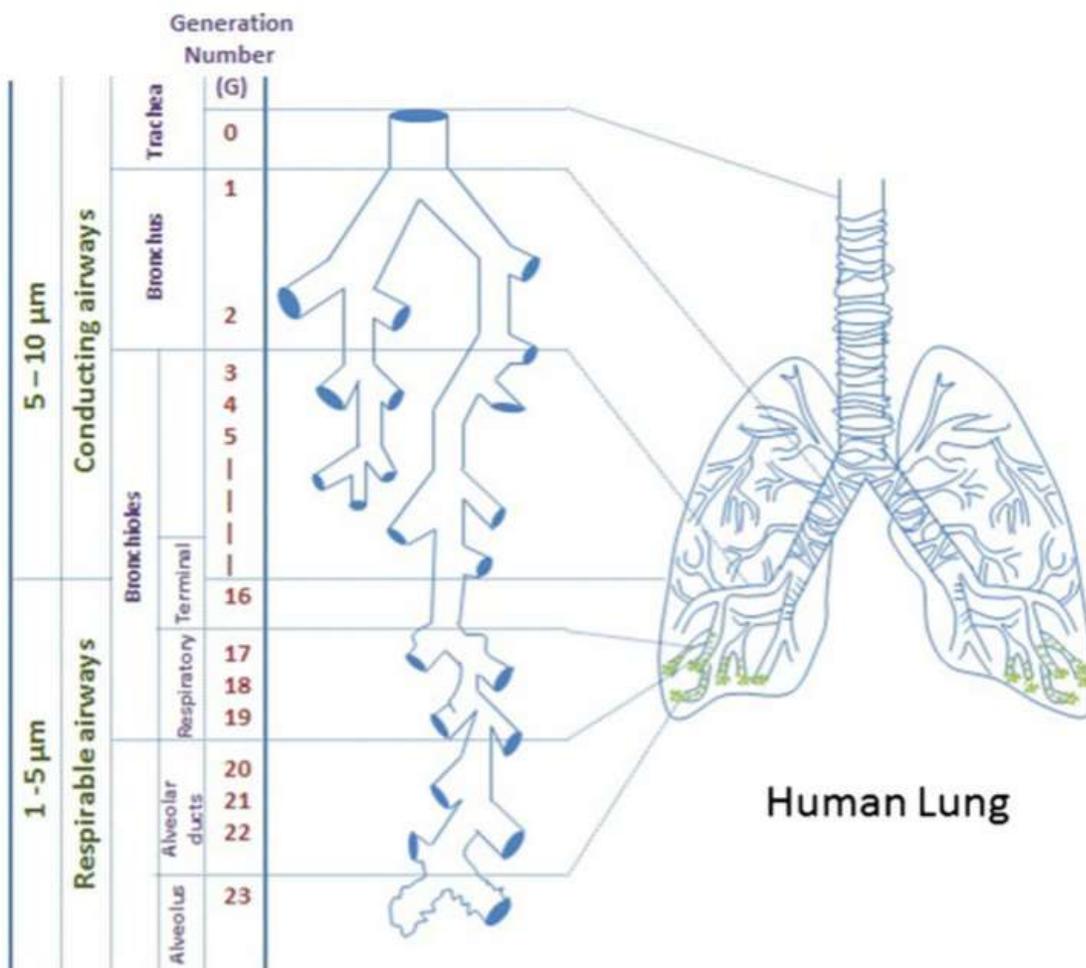
Figura 6: Divisão entre brônquio, bronquíolo e alvéolos.



Fonte: NETTER 2000.

Os alvéolos começam a aparecer nas paredes das vias respiratórias a partir da 17ª geração de bronquíolos, e a partir da 20ª geração, toda a parede é composta por alvéolos. Na 23ª geração os dutos alveolares terminam em pequenos sacos, denominados sacos alveolares (Figura 7).

Figura 7: Representação esquemática do pulmão humano e da divisão de brônquios, bronquíolos e alvéolos.

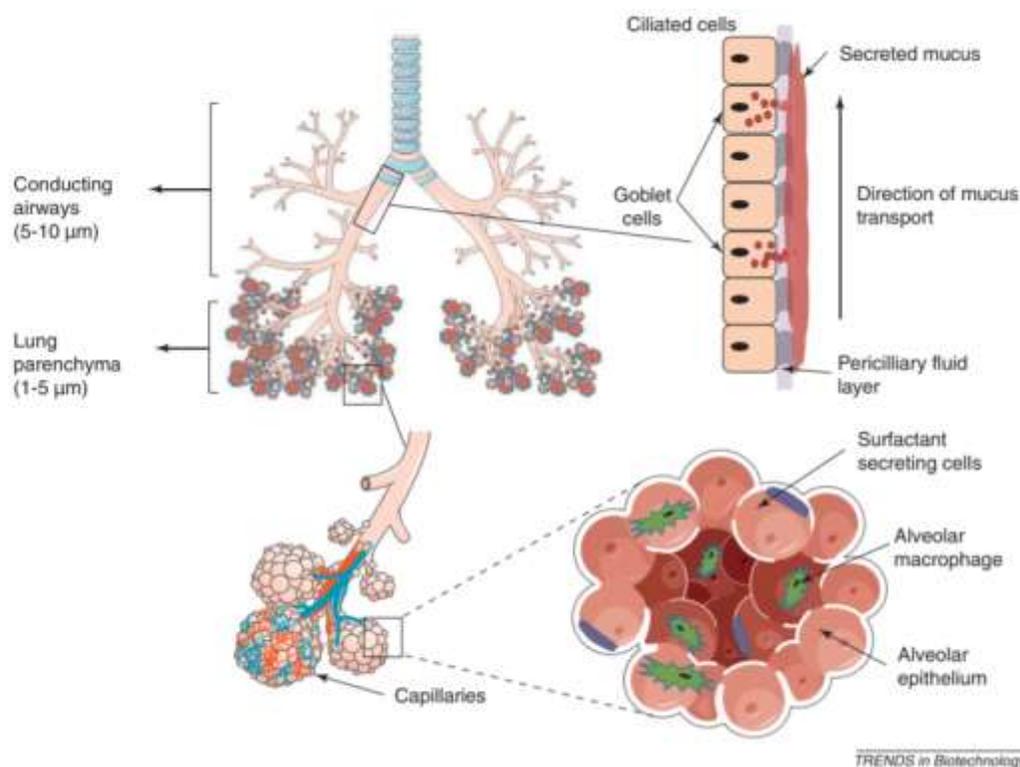


Fonte: KUNDA *et al.*, 2013.

A superfície das vias respiratórias é uma mucosa que consiste de células epiteliais ciliadas intercaladas com células produtoras de muco (Figura 8). Esta superfície suporta a produção local de anticorpos que ocorre na lâmina própria. A camada de muco superficial é a primeira barreira quando se deseja atingir o sistema pulmonar, pois ela captura e remove material particulado e microrganismos. A remoção do muco é feita pelas células ciliadas, que empurram o muco em direção à orofaringe (LOPES; NORONHA; MAFORT, 2010). Contudo, partículas que consigam passar por esta camada de muco e chegar aos alvéolos encontrarão uma camada de células epiteliais coberta por um fino filme aquoso contendo surfactantes, que é ideal para a absorção de drogas. Os alvéolos e os capilares pulmonares, por sua vez, são

separados por uma barreira composta de células endoteliais, espaço intersticial e células pulmonares epiteliais (pneumócitos). Os pneumócitos são divididos em 2 tipos, I e II. Os pneumócitos tipo I são achatados e recobrem a superfície alveolar, enquanto os do tipo II são irregulares e contêm corpos lamelares, que são secretados como surfactantes (EFFROS 2006) (Figura 8).

Figura 8: Diagrama das ramificações dos pulmões e das camadas que formam os tecidos pulmonares. Na direita, acima, estão representadas as células ciliadas e a camada de muco. Abaixo está a representação do epitélio alveolar.



Fonte: SOU *et al.*, 2011

### **2.5.2 Sistema imune pulmonar**

Os sistemas imunes pulmonar, nasal, oral e urogenital correspondem a 80% dos imunócitos humanos, os quais podem se acumular ou transitar entre diversos tecidos linfoides associados a mucosas (TLAM). O sistema imune de mucosas possui três funções principais: 1) proteger as membranas mucosas da colonização e invasão de microrganismos com as quais elas entrem em contato; 2) prevenir a internalização de antígenos não degradados, por exemplo, derivados de alimentos, microrganismos comensais e de material aspirado; 3) prevenir o desenvolvimento de resposta imune

potencialmente perigosa caso estes antígenos atinjam o interior do corpo. O TLAM é composto por compartimentos linfoides anatomicamente bem definidos. Estes compartimentos são povoados por células B e T fenotipicamente e funcionalmente distintas, além de subpopulações de células acessórias. Ele também contém acumulados difusos de células linfoides no parênquima de órgãos mucosos e glândulas exócrinas (HOLMGREN; CZERKINSKY 2005).

A imunização de mucosas é capaz de gerar imunidade de memória através da produção de IgA, anticorpo capaz de cruzar o epitélio e prevenir a entrada de futuros patógenos. Além disso, linfócitos estimulados por antígenos em contato com mucosas são capazes de migrar através de linfonodos regionais e pelo duto torácico para a corrente sanguínea e para outras regiões de mucosa, onde estimulam a produção de IgA, formando o chamado Sistema Imune Comum de Mucosas (MCGHEE *et al.*, 1994).

O epitélio pulmonar representa uma barreira importante na proteção contra patógenos inalados. A camada de muco que recobre o epitélio das vias respiratórias contem quimiocinas, citocinas e agentes antimicrobianos que evitam a colonização de microrganismos. Já macrófagos e células dendríticas (DC, da sigla em inglês) pulmonares desempenham um papel importante na tanto na resposta imune inata como na adaptativa (KUNDA *et al.*, 2013). Macrófagos alveolares estão presentes em grande quantidade na periferia e no interstício dos pulmões, enquanto DC são encontradas no epitélio que cobre as vias aéreas, na submucosa encontrada abaixo deste epitélio, dentro das paredes dos septos alveolares e na superfície dos alvéolos. O tecido linfóide associado aos brônquios (TLAB) é o componente pulmonar do TLAM e se localiza principalmente nas bifurcações dos brônquios. A resposta imune humoral promovida pelo TLAB é composta por IgA secretada tanto localmente quanto por células B derivadas do TLAB e que migraram para mucosas distantes. Resposta de células-T locais também já foi observada. Desta forma, o TLAB pode ser considerado como um análogo funcional aos agregados linfoides presentes nas mucosas do intestino e, portanto, como parte do TLAM (HOLMGREN; CZERKINSKY 2005).

Apesar de a resposta imune humoral adaptativa no TLAM ser mediada principalmente por IgA, IgM e IgG produzidos localmente, no trato respiratório inferior encontra-se também IgG derivada do soro, que migra da corrente sanguínea para os pulmões. De fato, o principal mecanismo da resposta imune induzida por vacinas

injetáveis contra influenza e *S. pneumoniae* é formada por anticorpos no soro, especialmente IgG, que evita estes patógenos se espalhem pelo organismo, além de gerar proteção local na mucosa do trato respiratório inferior (HOLMGREN; CZERKINSKY 2005).

### **2.5.3 Modelos animais para entrega de drogas nos pulmões**

Modelos animais permitem avaliar a eficiência e a segurança de uma grande variedade de vacinas e drogas, algo que não seria viável em voluntários humanos. Camundongos e cobaias são frequentemente utilizados em estudos de entrega de drogas nos pulmões e são bons modelos para diversas doenças respiratórias. O custo destes animais é comparativamente menor do que aquele de animais maiores, o que permite que um número maior seja utilizado por experimento, dando maior robustez à análise estatística dos resultados. A eutanásia destes animais é simples e a remoção de tecidos é fácil, e doses pequenas podem ser capazes de gerar respostas quantificáveis. Cobaias em especial são bons modelos de broncoconstrição e broncodilatação, pois seu trato respiratório é mais parecido com o humano do que o de outros pequenos roedores, particularmente no que diz respeito à resposta inflamatória (CRYAN; SIVADAS; GARCIA-CONTRERAS 2007). Camundongos, embora não tenham pulmões tão parecidos com os humanos quanto cobaias, são utilizados no estudo de uma série de doenças como enfisema (KURAKI *et al* 2002), influenza (HUANG *et al.*, 2004) e fibrose pulmonar (SPOND *et al.*, 2003).

Estudos de vacinação pulmonar em camundongos sugerem que a vacina deva atingir as vias respiratórias inferiores para gerar uma resposta imune robusta, e por isso as diferenças nas divisões das vias respiratórias humana e dos roedores deve ser levada em consideração quando for necessário mudar de um modelo para o outro (SOU 2011). A Tabela 3, abaixo, descreve as principais diferenças entre as vias respiratórias de humanos e de outros animais comumente utilizados em laboratório, enquanto a Figura 9 compara o trato respiratório de humanos e camundongos. Apesar das diferenças com respeito aos humanos, camundongos continuam a ser muito utilizados como modelo para a entrega de drogas nos pulmões (CRYAN; SIVADAS; GARCIA-CONTRERAS 2007).

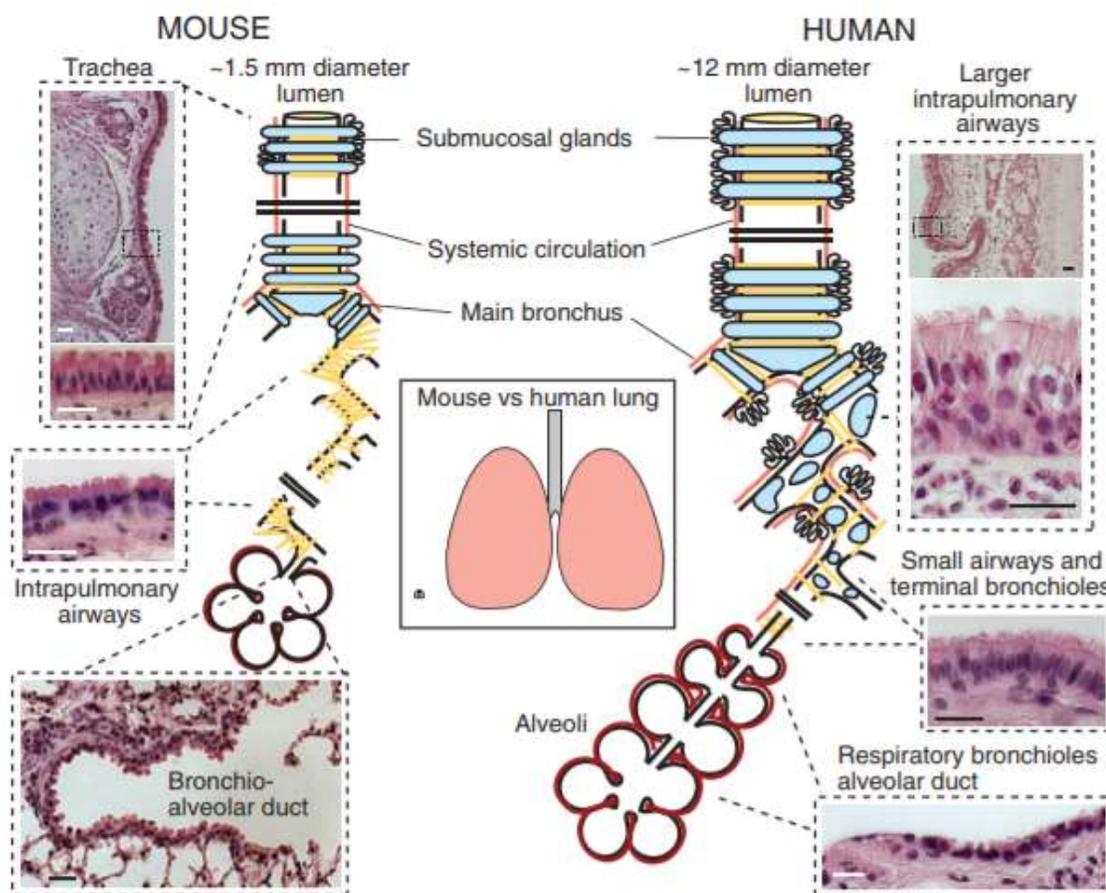
Tabela 3: Comparação entre as vias respiratórias de humanos e outros animais utilizados em laboratório

Animal	Massa corporal média	Ramificação das vias aéreas	Traqueia Largura/Diâmetro (cm)	Brônquios traqueais	Bifurcações principais das vias respiratórias	Vias respiratórias (Razão Largura/diâmetro)
Humano	80 kg	Relativamente simétricas	12 / 2	Muito raros	Afiadas nas primeiras 10 gerações, cegas após isso	2,2
Camundongo	0,3 kg	Fortemente monopodial	2,3 / 0,26	Raros	Muito afiadas e muito altas através dos pulmões	1,5
Cobaia	1 kg	Monopodial	5,7 / 0,4	Ausentes	Muito afiadas e altas	1,7
Coelho	4,5 kg	Fortemente monopodial	6 / 0,5	Ausentes	Afiadas	1,9
Beagle	10 kg	Fortemente monopodial	17 / 1,6	Ausentes	Bifurcações traqueais cegas	1,3
Macaco Rhesus	2 kg	Monopodial	3 / 0,3	Ausentes	Misto entre afiadas e cegas	2,6

Fonte: Adaptado de CRYAN; SIVADAS; GARCIA-CONTRERAS (2007)

Espécies maiores, como coelhos, cães, ovinos e primatas são utilizadas quando é necessário administrar volumes maiores de drogas ou recolher volumes maiores de fluídos durante longos períodos, ou ainda para estudos de cinética de inalação (SAKAGAMI 2006). Dentre exemplos de aplicação desses modelos, pode-se citar o uso de modelos caninos para estudar a entrega de insulina nos pulmões, o uso de macacos e outros primatas não humanos na entrega de vacinas pulmonares e drogas para tratamento de fibrose cística e de ovelhas como modelo para ferimentos nos pulmões (CRYAN; SIVADAS; GARCIA-CONTRERAS 2007).

Figura 9: Comparação entre a estrutura e o epitélio das vias aéreas de camundongos e de humanos



Fonte: ROCK; RANDELL; HOGAN 2010.

## 2.6. Vacinas de nanopartículas

A nanotecnologia permite a produção de nanopartículas de composição, tamanho, forma e propriedades físico-químicas variadas. Por terem tamanho comparável ao de componentes celulares, nanopartículas podem ser internalizadas pelas células utilizando mecanismos celulares de endocitose. O uso de nanopartículas em vacinas terapêuticas e profiláticas tem aumentado nos últimos anos (MAMO; POLAND 2012) como uma forma de proteger e entregar os antígenos a alvos específicos, como células dendríticas pulmonares, e/ou como adjuvantes para aumentar a imunogenicidade dos antígenos, permitindo diminuir sua concentração na vacina (KUNDA *et al.*, 2013). As nanopartículas proporcionam um ambiente estável para os antígenos, protegendo-os de mudanças de temperatura e umidade, o que evita sua degradação durante a armazenagem e a imunização, potencialmente dispensando

o armazenamento a frio e proporcionando rotas alternativas para a imunização que não a parenteral.

### **2.6.1 Nanopartículas poliméricas**

Uma grande variedade de polímeros sintéticos tem sido usada na produção de nanopartículas, como o poli-(d-L-lactídeo-co-glicolídeo) (PLG), ácido poli-(d-L-lático-glicólico) (PLGA), ácido poli-(gama-glutâmico) (g-PGA), polietilenoglicol (PEG) e poliestireno. Nanopartículas de PLG e PLGA têm sido extensamente estudadas devido a sua biocompatibilidade e biodegradabilidade (PEEK; MIDDAUGH; BERKLAND 2008; DANHIER *et al.*, 2012). PLGA foi utilizado na imunização contra *Bacillus anthracis* (MANISH *et al.*, 2013) e vírus da hepatite B (THOMAS *et al.*, 2011). Nanopartículas de poliestireno podem ser conjugadas a uma variedade de antígenos e podem ter sua superfície modificada com diversos grupos funcionais (KALKANIDIS *et al.*, 2006). Nanopartículas de quitosana, por sua biodegradabilidade, atoxicidade, biocompatibilidade e capacidade de ser facilmente modificada têm sido bastante estudadas e usadas na preparação de vacinas diversas, incluindo vacinas contra hepatite B (BORGES *et al.*, 2008) e vacinas de DNA (NANDA *et al.*, 2012; FENG *et al.*, 2013). Dois polímeros foram escolhidos para a produção de nanopartículas carregadas com PspA4Pro para a vacinação pulmonar: poli-(glicerol adipato-co- $\omega$ -pentadecalactona) (PGA-co-PDL) e ácido poli-(d-L-lático-glicólico) (PLGA).

### **2.6.2. Poli-(glicerol adipato-co- $\omega$ -pentadecalactona)**

PGA-co-PDL é um polímero biodegradável, sintetizado pela reação de copolimerização de monômeros ativados de  $\omega$ -pentadecalactona e de glicerol, catalisada por uma lipase de *Candida albicans*. Embora PGA-co-PDL seja um polímero relativamente pouco estudado quando comparado a outros já largamente utilizados na produção de nanopartículas, como o PLGA, ele apresenta vantagens quando empregado na imunização pulmonar.

Nanopartículas de PGA-co-PDL se mostraram carregadoras promissoras para macromoléculas (TAWFEEK *et al.*, 2010), drogas hidrofílicas (PURI *et al.*, 2008) e hidrofóbicas (THOMPSON *et al.*, 2007). Micropartículas de PGA-co-PDL envoltas em L-

leucina foram capazes de entregar a proteína fluoresceína nos pulmões com elevada eficiência de encapsulação, mesmo havendo deposição de micropartículas no inalador e nas vias aéreas superiores, e com citotoxicidade menor do que a de micropartículas compostas de PLGA (TAWFEEK *et al.*, 2011). Em outro trabalho, desta vez envolvendo a produção de nanopartículas de PGA-co-PDL com BSA adsorvida, o tamanho das nanopartículas de PGA-co-PDL variou entre 120 nm e 450 nm, de acordo com as condições de produção, aumentando em até 100 nm após a adsorção da proteína (KUNDA *et al.*, 2015). Uma vez que o tamanho ideal para a captação de nanopartículas pelas células dendríticas dos pulmões varia entre 200 nm e 500 nm, as nanopartículas de PGA-co-PDL seriam uma forma viável de apresentação de antígenos a estas células. Outro estudo mostrou que PspA4Pro liberada de nanopartículas de PGA-co-PDL manteve sua atividade biológica, com retenção de mais de 85% de sua estrutura original, medida via difração circular (KUNDA *et al.*, 2015). Tais resultados, assim como o trabalho de RODRIGUES *et al.* (2018), mostram que as nanopartículas de PGA-co-PDL carregadas com antígenos pneumocócicos poderiam ser empregadas na imunização pulmonar contra *S. pneumoniae*.

### **2.6.3. Ácido poli-(lático-co-ácido glicólico) (PLGA)**

O ácido poli-(lático-co-ácido glicólico) é um polímero largamente utilizado pela indústria farmacêutica por ser biodegradável e biocompatível, já que seu metabolismo leva à formação de ácido lático e ácido glicólico, dois monômeros endógenos e facilmente metabolizados pelo corpo através do ciclo de Krebs, o que confere ao PLGA baixa toxicidade (KUMARI; YADAV; YADAV 2010). O PLGA é sintetizado pela copolimerização de abertura de anéis de monômeros de ácido lático e ácido glicólico. Estes monômeros se ligam por ligações éster, formando um poliéster alifático linear (GENTILE, *et al.*, 2014).

Uma grande vantagem do uso do PLGA é o fato dele já ser aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos e pela European Medicines Agency (EMA) como sistema de entrega de medicamentos em humanos, o que facilita a aprovação de novas vacinas e medicamentos que empreguem este polímero. Por conta disso, ele também é facilmente obtido comercialmente com várias massas

moleculares e composição de copolímeros, diferente do PGA-co-PDL, que teve de ser sintetizado pela equipe do nosso colaborador, Prof. Dr. Imran Saleem, no Departamento de Farmácia da Liverpool John Moores University para ser utilizado neste trabalho.

Diversos trabalhos já descreveram com sucesso a produção de nanopartículas de PLGA contendo antígenos como proteínas, peptídeos, lipopeptídeos e ácidos nucleicos. CLAWSON *et al.* (2010) demonstraram que o peptídeo imunostimulatório Hp91 encapsulado em nanopartículas de PLGA não só foi capaz de ativar células dendríticas humanas e de camundongos, como foi 5 vezes mais potente do que o peptídeo livre. Já TIAN e YU (2011) observaram que nanopartículas de PLGA foram carregadores promissores para vacinas de DNA plasmidial contra doença linfocística em peixes após imunização oral. PRASAD *et al.* (2011) utilizaram uma linhagem de células de carcinoma escamoso de pescoço e cabeça para produzir nanopartículas de PLGA contendo antígenos associados ao tumor. Células dendríticas coletadas do sangue de pacientes foram cultivadas com NP carregadas com antígenos tumorais e utilizadas para estimular células TCD8+, e estas células TCD8+, após o estímulo, apresentaram aumento significativo na produção de IFN- $\gamma$ .

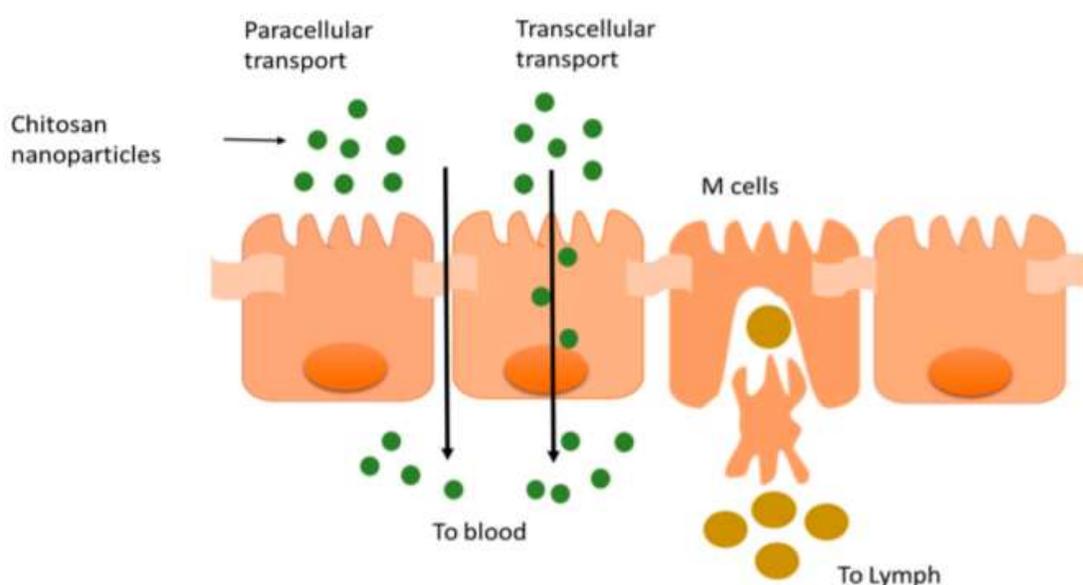
#### **2.6.4. Quitosana**

Quitosana [(1,4)-2-amino-2-deoxi-D-glucana] é um poliaminossacarídeo linear obtido pela desacetilação da quitina, um biopolímero natural encontrado no exoesqueleto de artrópodes, como insetos e crustáceos, na parede celular de fungos e no bico e nas conchas internas de cefalópodes. Na medicina a quitosana tem sido utilizada com sucesso na produção de bandagens para redução de sangramento, pois possui ação coagulante, e como agente antibacteriano (GHADI *et al.*, 2014). Por ser biodegradável e atóxica, a quitosana possui potencial para ser utilizada em sistemas de entregas de drogas e vacinas. Insolúvel em meio neutro e básico, a quitosana adquire carga positiva em meio ácido graças à protonação de grupos amino livres. Por isso, partículas de quitosana, que mantêm sua integridade em meios neutros e básicos, podem ser utilizadas para entregar drogas e antígenos em um ambiente ácido, onde a

partícula se degradaria e liberaria seu conteúdo. Sistemas de entrega de drogas baseados em quitosana incluem esponjas, filmes, microesferas e nanopartículas.

Uma propriedade particularmente útil da quitosana é sua capacidade de facilitar o transporte paracelular e transcelular de drogas, facilitando sua penetração no epitélio (Figura 10). A quitosana interage formando um complexo com o muco através de interações iônicas, de hidrogênio e hidrofóbicas. Por conta disso e por sua baixa toxicidade, nanopartículas de quitosana são veículos promissores para a entrega de drogas através de mucosas (MOHAMMED, *et al.*, 2017).

Figura 10: Representação esquemática de nanopartículas de quitosana atravessando o epitélio via transporte paracelular e transcelular



Fonte: MOHAMMED, *et al.*, 2017

Como exemplos do uso de nanopartículas de quitosana para entrega de medicamentos estão o trabalho de BARBIERI *et al.* (2015), que mostrou que nanopartículas de lecitina-quitosana contendo Tamoxifeno, um medicamento anticâncer, administrado via oral, aumentaram a absorção do medicamento no epitélio intestinal. FENG *et al.* (2013) prepararam nanopartículas de quitosana e de carboximetilquitosana com cloridrato de doxorubicina (DOX), também para administração oral, e observaram que as nanopartículas aumentaram a absorção de DOX no intestino delgado. A biodisponibilidade do DOX entregue pelas nanopartículas

foi de 42%, seis vezes maior do que aquela do medicamento administrado sozinho. WANG *et al.* (2013) prepararam nanopartículas de PLGA e de PLGA com quitosana ligada à superfície, ambas com exedina-4, utilizada no tratamento de diabetes tipo 2. Estas partículas foram avaliadas *in vitro* e *in vivo* para medir a permeabilidade transmembrana. Os estudos *in vitro* mostraram que o coeficiente de permeabilidade das nanopartículas com quitosana foi praticamente o dobro daquele das partículas sem quitosana, enquanto os estudos *in vivo* mostraram níveis mais altos da droga no sangue dos animais que receberam as nanopartículas de PLGA com quitosana do que naqueles que receberam apenas PLGA.

Embora neste trabalho não sejam produzidas nanopartículas feitas inteiramente de quitosana, espera-se que a adição deste polímero às nanopartículas feitas de PLGA e de PGA-co-PDL aumente o efeito adjuvante destas partículas, melhorando a resposta contra a infecção pelo pneumococo.

### 3. OBJETIVOS

Este trabalho se propõe a desenvolver uma nova vacina pneumocócica destinada à imunização pulmonar na forma de micropartículas contendo nanopartículas compostas de polímeros biocompatíveis e biodegradáveis, poli-(glicerol adipato-co-pentadecalactona) (PGA-coPDL), poli-(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA) e quitosana, carregadas com proteínas do pneumococo. Para atingir este objetivo, o projeto foi dividido em três etapas:

1. Obtenção dos antígenos pneumocócicos
  - 1.1. Obter o clone produtor da PdT
  - 1.2. Otimizar a purificação da PspA4Pro
2. Produção e avaliação das nanopartículas e das micropartículas
  - 2.1. Determinar a estrutura das nanopartículas obtidas
  - 2.2. Analisar a integridade do antígeno ligado às nanopartículas
  - 2.3. Avaliar a toxicidade das nanopartículas
3. Avaliação *in vitro* e *in vivo* destas partículas
  - 3.1. Determinar o potencial das micropartículas para estimular células dendríticas
  - 3.2. Avaliar a ação protetora das micropartículas em camundongos

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Clonagem e produção da PdT

#### 4.1.1. Obtenção do gene da PdT por PCR

Para obter o gene da PdT foi realizado um PCR utilizando como molde o plasmídeo pET28+PspA-PdT, construído para a produção do híbrido PspA-PdT (KRASCHOWETZ., 2018. Os *primers* (Tabela 4) foram desenhados com base na sequência da PdT, sem cauda de histidina, incluindo os sítios de restrição para inserção no plasmídeo e o códon de terminação, com a ajuda da calculadora de temperatura de *melting* e *annealing* online da New England Biolabs (NEW ENGLAND BIOLABS, 2014) e confeccionados pela empresa DNA Express Biotecnologia. Ambos os primers possuem aproximadamente 40% GC e temperatura de anelamento de 60°C.

Para a reação de PCR foi utilizada uma polimerase de alta-fidelidade (Platinum Taq DNA polymerase high fidelity, Invitrogen). O gene da PdT foi amplificado em um termociclador nas seguintes condições: 4 min a 94°C, 30 ciclos de 94°C por 1 min, 50°C por 2 min e 68°C por 2 min. Foram testadas duas concentrações de MgSO<sub>4</sub>, 2,0 mM e 3,5 mM. Os produtos de PCR foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 0,8%. As bandas do gel foram purificadas utilizando-se kit de purificação GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare).

Tabela 4: Primers utilizados na amplificação do gene da PdT a partir do plasmídeo pET-28+PspA-PdT

Primer foward	5' TAGCCATGGCAAATAAAGC 3'
Primer Reverso	5' CTCGAGTTAGTCATTTTCTACC 3'

#### 4.1.2. Clonagem do gene da PdT

O produto da reação de PCR foi ligado ao vetor de clonagem pGEM-T easy vector (Promega). Células competentes de *E. coli* DH5α foram transformadas com a reação de ligação de pGEM-T+PdT. Para tanto, foi empregado um tubo com 50 µL de *E. coli* DH5α quimiocompetente armazenado a -80 °C. Adicionou-se ao tubo com as células 5 µL da reação de ligação. O frasco foi encubado por 30 min no gelo e em

seguida aquecido a 42°C por 2 min e, por fim, transferido novamente para o gelo por mais 2 min.

Após o choque térmico, foram adicionados 450 µL de meio LB e incubou-se a 37 °C por 40 min. Então 50 µL da cultura foram plaqueados em placas de LBágar + ampicilina (20 µg/mL) + X-gal, que foram incubadas overnight a 37 °C. As colônias com o inserto foram selecionadas com base em sua cor. A inserção do produto de PCR no pGEM-T easy causa a inativação do gene produtor da beta-galactosidase. Sem esta enzima as colônias apresentam coloração esbranquiçada, enquanto as colônias produtoras da beta-galactosidase são azuladas. Cinco colônias brancas e uma colônia azul foram cultivadas overnight a 37°C em 5 mL de meio LB + ampicilina. Foram feitas minipreparações (minipreps) destes cultivos e os plasmídeos purificados foram submetidos à análise de restrição e aplicados em um gel de agarose 0,8%.

Os plasmídeos com o perfil de restrição correto foram submetidos ao sequenciamento. A miniprep das colônias foi feita com kit de purificação Illustra plasmidPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare). A análise de restrição foi realizada com enzimas *Nco* I e *Xho* I, que cortam o plasmídeo liberando o inserto, e com *Eco* RI, que libera o inserto e ainda possui um sítio interno no gene da PdT.

Confirmada a sequência, o pGEM-T+PdT foi digerido com *Nco* I e *Xho* I e o gene da PdT foi purificado do gel de agarose utilizando o mesmo kit descrito no item 4.1.1. Ao mesmo tempo o plasmídeo pET-28a (Novagen) foi digerido com as enzimas *Nco* I e *Xho* I e também purificado do gel. Por fim, o inserto foi ligado ao pET-28a e a reação de ligação empregada para transformar *E. coli* DH5α, que foi então cultivada overnight, 37°C, em placa de LBágar+canamicina (50 µg/mL). No dia seguinte uma colônia isolada foi cultivada overnight em meio LB+canamicina para realização da miniprep. Por fim, *E. coli* BL21 (DE3) foi transformada com o pET-28a+PdT e cultivada em placa de LBágar+canamicina, overnight, a 37°C. Verificada a presença de colônias, avaliou-se a expressão do gene da PdT em cultivos em frasco.

### **4.1.3. Teste de expressão do gene da PdT**

Quatro clones foram selecionados e cultivados em tubos de 50 mL com 5 mL de meio LB+canamicina. Estes frascos foram incubados em shaker, overnight, a 30°C e 300 rpm. No dia seguinte mediu-se a densidade ótica a 600nm (DO600) de cada tubo.

Em quatro frascos de 300 mL contendo 30 mL de meio LB+canamicina foram adicionados volumes de cada inóculo de modo que cada frasco tivesse DO600 inicial igual a 0,1. Os frascos foram cultivados em shaker a 300 rpm e 37°C. Amostras de 1,0 mL foram retiradas de hora em hora e a indução com IPTG 1,0 mM foi feita quando o cultivo atingiu DO600 próxima a 1,0. O cultivo continuou por 4 h após a indução. As amostras pré e pós-indução foram centrifugadas e o pellet foi separado para verificação da expressão da proteína por SDS-PAGE e densitometria e por *western blot*. Através da porcentagem da banda da PdT no SDS-PAGE, determinada por densitometria, identificou-se qual dos clones produziu maior quantidade de PdT. O clone selecionado foi cultivado em meio LB-canamicina e armazenado em glicerol 30% a -80°C para futuros cultivos.

Para a realização de cada *western blot* foram feitos dois géis SDS-PAGE idênticos: um para prosseguir com a análise e outro utilizado como controle. As proteínas de um dos géis foram transferidas para membrana de nitrocelulose na presença de tampão Bjerrum Schafer-Nielsen (Tris 48mM, glicina 39mM, 20% metanol, pH9,2) em sistema semi-seco por 80 min e 20 V. A membrana foi corada com solução Ponceau para visualização da transferência e indicação com lápis das bandas do padrão de massa molecular. Em seguida a membrana foi incubada em solução de bloqueio (solução salina tamponada com fosfato (PBS) com 5% leite desnatado) *overnight*. A incubação da membrana com anticorpo primário (soro anti-extrato total de pneumococo produzido em coelho diluído na proporção de 1/2000 em PBS com 5% de leite desnatado) foi feita por 90 min e então a membrana foi lavada 3 vezes por 10 min com PBS+Tween20 0,5% (PBS-T). A incubação com anticorpo secundário (anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase, Sigma Aldrich) também foi realizada por 90 min e a membrana foi lavada novamente por 3 vezes, 10 min cada, com solução de bloqueio e uma vez com água destilada. A peroxidase foi revelada utilizando o kit ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Lifescience) e revelado em um Analisador

Luminescente de Imagem (ImageQuant LAS 4000, GE Lifescience). O soro anti-extrato total de pneumococo foi gentilmente cedido pelo Dr. Richard Malley, Boston Children's Hospital, EUA.

#### **4.2. Purificação da PspA4Pro**

A produção da PspA4Pro em biorreatores foi feita pela equipe da Dra. Teresa Cristina Zangirolami, do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos. Os cultivos foram centrifugados e o pellet foi congelado a -80 °C e enviado para o Instituto Butantan nas condições adequadas para a purificação. O processo de purificação foi baseado no trabalho de FIGUEIREDO (2014), que desenvolveu um processo de purificação para PspA4Pro baseado na precipitação de contaminantes com detergente catiônico brometo de cetiltrimetilamonio (CTAB), seguida de etapas de cromatografia de troca iônica. Neste trabalho procurou-se melhorar este processo de purificação utilizando-se a ferramenta de delineamento experimental para otimizar a etapa de clarificação com CTAB, além de realizar algumas alterações nas etapas cromatográficas, visando obter a proteína com alto grau de pureza. Ruptura celular

Como a PspA4Pro foi obtida no citoplasma, a primeira etapa do processo de purificação é a ruptura das células para liberação da proteína. Esta etapa foi feita de acordo com FIGUEIREDO (2014). Resumidamente, 100 g de biomassa congelada foram ressuspensas em 1 L de tampão de lise: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1mM pH6,5 + EDTA 2,5 mM com 0,1%(p/v) do detergente neutro Triton X-100 e 1mM do inibidor de proteases fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), a cerca de 4°C e 11.000 rpm, utilizando um homogeneizador de pás do modelo X-520 (Ingenieurbüro CAT M. Zipperer GmbH), até não haver mais grumos visíveis. A suspensão bacteriana foi colocada em um funil encamisado acoplado ao homogeneizador contínuo de alta pressão (APV GAULIN) com a saída refrigerada por meio de um trocador de calor do tipo casco e tubo. A temperatura do refrigerante ajustada para 4°C, a pressão de trabalho foi de 500 bar com fluxo de amostra de 1 L/min. A amostra foi recirculada em *loop* fechado durante 6 min e ao final foi empurrada com 500 mL de tampão de lise. A fração recolhida do homogeneizador foi nomeada Homogenato.

#### 4.2.1. Delineamento experimental para otimização da etapa de clarificação da PspA4Pro

A fim de melhorar a recuperação e aumentar a remoção de contaminantes durante a etapa de clarificação, realizou-se um delineamento experimental para estudar a influência de diversas variáveis na remoção de proteínas, ácidos nucleicos e polissacarídeos e na recuperação e pureza da PspA4Pro durante esta etapa. Para tal, seis variáveis de interesse foram selecionadas: concentração de CTAB (%v/v), agitação (rpm), temperatura (°C), concentração de biomassa (g/L), concentração salina (mM NaCl) e pH. Com estas seis variáveis foi montada uma matriz Plackett & Burman (PB) de 12 ensaios mais 3 pontos centrais (Tabela 5).

Tabela 5: Descrição das condições dos ensaios da matriz Plackett& Burman de 12 ensaios - PB12

Ensaio	pH	CTAB (%)	[biomassa] (g/L)	[Salina] (mM)	Agitação (rpm)	Temp. (°C)	pH	CTAB(%)	[biomassa] (g/L)	[Salina] (mM)	Agitação (rpm)	Temp. (°C)
1	1	-1	1	-1	-1	-1	7,5	0,08	100	10	75	15
2	1	1	-1	-1	-1	-1	7,5	0,2	30	50	75	15
3	-1	1	1	1	1	-1	6,5	0,2	100	10	175	15
4	1	-1	1	-1	-1	1	7,5	0,08	100	50	75	30
5	1	1	-1	1	1	-1	7,5	0,2	30	50	175	15
6	1	1	1	1	1	1	7,5	0,2	100	10	175	30
7	-1	1	1	-1	-1	1	6,5	0,2	100	50	75	30
8	-1	-1	1	1	1	-1	6,5	0,08	100	50	175	15
9	-1	-1	-1	1	1	1	6,5	0,08	30	50	175	30
10	1	-1	-1	1	1	1	7,5	0,08	30	10	175	30
11	-1	1	-1	-1	-1	1	6,5	0,2	30	10	75	30
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	6,5	0,08	30	10	75	15
Ponto Central	0	0	0	0	0	0	7,0	0,14	65	30	120	22,5

Para este experimento, 100 g de *pellet* congelado de *E. coli* BL21 + pET28PspA4Pro foram ressuspensos em 700 mL de tampão de lise. O homogenato foi obtido como descrito no item 4.2.1 e foi aliqotado em 15 frações que foram

ajustadas de acordo com as condições estabelecidas nos 12 ensaios e nos 3 pontos centrais (Tabela 5). Após incubação por 1 h na temperatura e agitação desejadas, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante quantificado para proteínas totais pelo método de Lowry utilizando o kit de quantificação de proteínas DC Protein Assay (BioRad), a pureza da PspA4Pro foi determinada pela porcentagem da banda da proteína em SDS-PAGE medida por densitometria, ácidos nucleicos foram determinados pela absorvância a 260 nm medida em espectrofotômetro, considerando que  $A_{260nm} = 1,0$  corresponde a 50  $\mu\text{g/mL}$  de ácidos nucleicos, e polissacarídeos totais foram medidos pelo método fenolsulfúrico (DUBOIS et al., 1951). A análise estatística dos resultados foi feita com o programa Protimiza Experimental Design.

Determinadas quais das variáveis iniciais influenciaram significativamente a clarificação ( $p < 0,05$ ), realizou-se um delineamento composto central rotacional (DCCR) com três variáveis em dois níveis ( $2^3$ ) com 6 pontos axiais e 3 pontos centrais, de modo a gerar superfícies de reposta que indicassem os valores ótimos destas variáveis. Os fatores que não influenciaram significativamente na clarificação tiveram os valores fixados. A Tabela 6 descreve a matriz utilizada.

Tabela 6: Descrição das condições dos ensaios da matriz do DCCR 23 com 6 pontos axiais e 3 pontos centrais

Ensaio	CTAB(%)	[biomassa] (g/L)	Agitação (rpm)	CTAB(%)	[biomassa] (g/L)	Agitação (rpm)	[Salina] (mM)	Temp (°C)	pH
1	-1	-1	-1	0,08	44,2	75	10	25	6,5
2	1	-1	-1	0,2	44,2	75	10	25	6,5
3	-1	1	-1	0,08	85,8	75	10	25	6,5
4	1	1	-1	0,2	85,8	75	10	25	6,5
5	-1	-1	1	0,08	44,2	175	10	25	6,5
6	1	-1	1	0,2	44,2	175	10	25	6,5
7	-1	1	1	0,08	85,8	175	10	25	6,5
8	1	1	1	0,2	85,8	175	10	25	6,5
9	-1,68	0	0	0,04	65	125	10	25	6,5
10	1,68	0	0	0,24	65	125	10	25	6,5
11	0	-1,68	0	0,14	30	125	10	25	6,5
12	0	1,68	0	0,14	100	125	10	25	6,5
13	0	0	-1,68	0,14	65	41	10	25	6,5
14	0	0	1,68	0,14	65	209	10	25	6,5
Ponto Central	0	0	0	0,14	65	125	10	25	6,5

A biomassa foi rompida nas mesmas condições do experimento anterior e o homogenato aliquoteado para a realização dos ensaios. A quantificação de proteínas totais, ácidos nucleicos, polissacarídeos totais e pureza da PspA4Pro foram realizadas pelos mesmos métodos do experimento anterior. As superfícies de resposta também foram geradas utilizando o programa Protimiza Experimental Design. Por fim, utilizando os modelos obtidos com o DCCR, foram determinadas quais seriam as condições que resultariam no melhor processo de clarificação possível e essas condições foram avaliadas experimentalmente.

#### **4.2.2. Clarificação**

Foram testadas duas estratégias distintas para a clarificação da PspA4Pro. A primeira clarificação foi feita de acordo com FIGUEIREDO (2014). Nela o Homogenato, com concentração de 100 g/L, foi precipitado com 0,1% (v/v) de CTAB. Na segunda clarificação, foram empregadas as condições determinadas como ótimas pelos resultados do planejamento experimental (item 4.2.2). Em ambos os casos, após a adição do detergente, a mistura permaneceu em agitação por 60 min e em seguida foi centrifugada (17696 g, 90 min, 4 °C). O *pellet* foi descartado e o Clarificado seguiu para as etapas cromatográficas.

#### **4.2.3. Cromatografia de troca aniônica em Q-Sepharose**

As cromatografias de troca aniônica foram realizadas de acordo com FIGUEIREDO (2014), com algumas modificações. Resumidamente, utilizou-se uma resina Q-Sepharose Fast Flow empacotada em coluna XK 50/30 (diâmetro ( $\emptyset$ ) = 50 mm e altura do leito cromatográfico ( $L_c$ ) = 13 cm) acoplada a um cromatógrafo Äkta Avant (GE Lifescience). O volume de coluna (VC) foi de 255 mL e o fluxo de trabalho de 50 mL/min. A resina foi equilibrada com 5 VC de solução de fosfato de sódio 10 mM pH 6,5 (condutividade de 1,2 mS/cm) e reequilibrada com 5 VC da mesma solução após a aplicação da amostra. As amostras aplicadas à resina tiveram o pH ajustado para 6,5 e a condutividade ajustada com água destilada para aproximadamente 1,5 mS/cm. Após a aplicação da amostra e o reequilíbrio realizou-se uma lavagem com fosfato de sódio 10 mM pH 6,5 com 150 mM NaCl. A eluição foi feita com 5 VC de

solução de fosfato de sódio 10 mM pH 6,5 com 300 mM NaCl. Após a eluição foi feita limpeza com fosfato de sódio 10 mM pH 6,5 com 1000 mM NaCl. A resina foi regenerada com 3 VC de solução de NaOH 100 mM.

#### **4.2.4. Crioprecipitação a pH 4,0**

O ponto isoelétrico (pI) teórico da PspA4Pro é igual a 4,8. Desta forma, a proteína recolhida da Q-sepharose em pH 6,5 deve ser acidificada antes de ser aplicada à resina de troca catiônica. Para isso, foi adicionado ácido acético glacial na amostra até pH 4,0. Após a adição do ácido a amostra foi congelada a -20°C durante 24 h. Após o congelamento, a amostra foi descongelada e centrifugada (17696 g, 120 min, 4 °C) para remover o precipitado. O sobrenadante, denominado Crio-pH4,0, foi aplicado na resina SP-Sepharose.

#### **4.2.5. Cromatografia de troca catiônica em SP-Sepharose**

A cromatografia de troca catiônica também foi feita de acordo com FIGUEIREDO (2014). Utilizou-se uma resina SP-Sepharose 6 Fast Flow empacotada em coluna XK 26/20 ( $\varnothing = 26$  mm, Lc= 14 cm) e acoplada em um cromatógrafo Äkta Avant. O VC foi de 75 mL e o fluxo de trabalho utilizado foi de 12 mL/min. A resina foi equilibrada com 5 VC de tampão acetato de sódio 25 mM com 300mM NaCl, pH 4,0 e reequilibrada com 5 VC da mesma solução após a aplicação da amostra. A lavagem foi feita com tampão acetato de sódio pH 4,0 com 500 mM NaCl. A eluição foi feita com tampão acetato de sódio 25 mM pH 4,0 com 850 mM NaCl. A limpeza da resina foi feita com 1000 mM NaCl em acetato-Na 25 mM pH 4,0 e a regeneração com 3 VC de uma solução de NaOH 100 mM.

#### **4.2.6. Parâmetros de avaliação dos processos de purificação da PspA4Pro**

Para avaliar os processos de purificação foram calculados os seguintes parâmetros: quantidade de proteínas totais, pureza da PspA4Pro, quantidade de PspA4Pro, recuperação global e por etapa da PspA4Pro e fator de purificação da PspA4Pro, global e por etapa. A Tabela 7, abaixo, descreve como cada um destes parâmetros foi calculado.

Tabela 7: Parâmetros utilizados para determinar a eficiência do processo de purificação

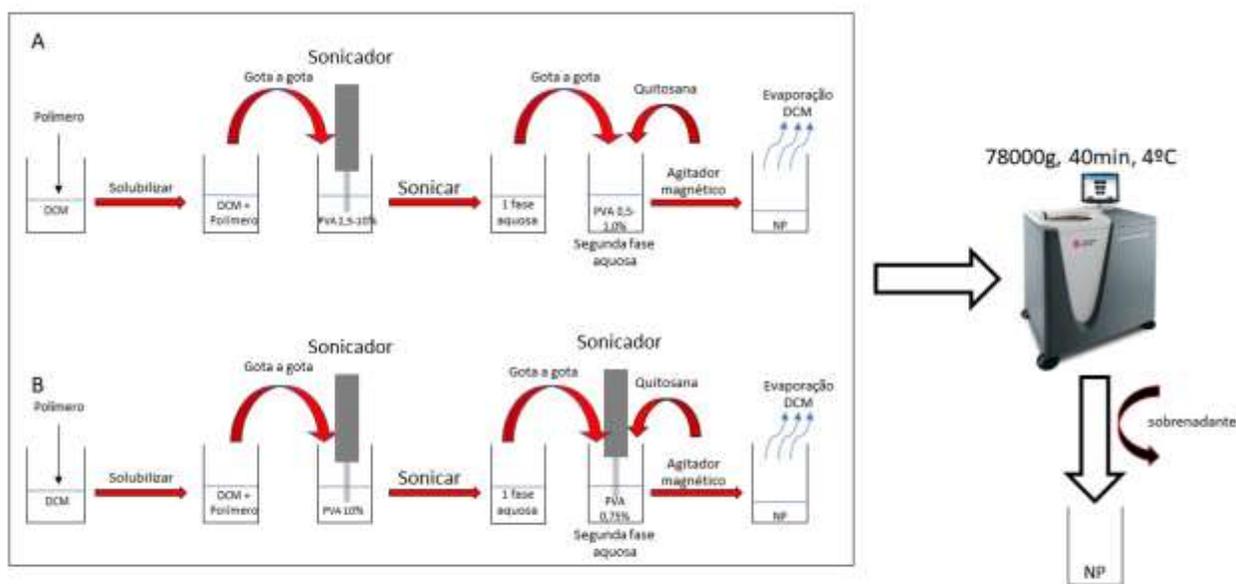
Eq (n)	Parâmetro	Equação	Legenda
1	Proteínas Totais (g)	$C_p \times V$	Cp: Concentração de proteínas (g/mL) V: Volume total da fração (mL)
2	Pureza PspA4Pro (%)	$\frac{A_{PspA4Pro} \times 100}{\sum A_{bandas}}$	A PspA4Pro: área da banda de PspA4Pro A bandas: áreas das demais bandas de proteínas no gel
3	Quantidade de PspA4Pro(g)	$\frac{P(g) \times \text{Pureza PspA4Pro}(\%)}{100}$	P(g): proteínas totais em gramas
4	Recuperação geral de PspA4Pro (%)	$\frac{PspA4Pro(g)_n \times 100}{PspA4Pro(g)_h}$	PspA4Pro(g)n: quantidade de PspA4Pro na etapa (n) PspA4Pro(g)h: quantidade de PspA4Pro no Homogenato
5	Recuperação por etapa de PspA4Pro (%)	$\frac{PspA4Pro(g)_n \times 100}{PspA4Pro(g)_{n-1}}$	PspA4Pro(g)n: quantidade de PspA4Pro na etapa (n) PspA4Pro(g) <sub>n-1</sub> : quantidade de PspA4Pro na etapa anterior
6	Fator de purificação geral	$\frac{PspA4Pro(\%)_n}{PspA4Pro(\%)_h}$	PspA4Pro(%) <sub>n</sub> : pureza da PspA4Pro na etapa em questão PspA4Pro(%) <sub>h</sub> : pureza no Homogenato
7	Fator de purificação por etapa	$\frac{PspA4Pro(\%)_n}{PspA4Pro(\%)_{n-1}}$	PspA4Pro(%) <sub>n</sub> : pureza da PspA4Pro na etapa em questão PspA4Pro(%) <sub>n-1</sub> : pureza da PspA4Pro na etapa anterior

#### 4.3. Preparo das nanopartículas de poli-(glicerol adipato-co- $\omega$ -pentadecalactona) (PGA-co-PDL) e de poli-(ácido láctico-co-ácido glicólico) PLGA

As nanopartículas foram preparadas no laboratório do Prof. Dr. Imran Saleem do Departamento de farmácia da Liverpool John Moores University. Inicialmente as

nanopartículas (NP) de PGA-co-PDL e de PLGA foram preparadas utilizando um método de evaporação de solvente em emulsão simples de óleo em água. Duzentos miligramas do polímero foram dissolvidos no solvente orgânico diclorometano (DCM) e a solução resultante foi adicionada a uma solução de álcool polivinílico (PVA) (fase aquosa) sob sonicação, obtendo-se a primeira solução aquosa. Esta solução foi adicionada, gota a gota, a uma segunda solução de PVA (segunda solução aquosa) sob agitação de 500 rpm por 90 min, à temperatura ambiente, para a evaporação do solvente orgânico. Após a evaporação do solvente, as nanopartículas foram coletadas por ultracentrifugação a 78000 g por 40 min, 4 °C e armazenadas para futuros testes (Figura 11A). Dado que o tamanho das NP é um fator determinante na captação destas pelas células dendríticas, diversas formulações (Tabela 8) foram preparadas buscando obter NP com tamanho aproximado de 100 nm. A escolha destas preparações foi feita com base no delineamento experimental realizado por KUNDA *et al.* (2015), que estudaram a influência de diversos fatores no tamanho de nanopartículas de PGA-co-PDL.

Figura 11: Produção das nanopartículas de PGA-co-PDL e PLGA via emulsão simples (A) e emulsão dupla (B)



DCM: Diclorometano. PVA: Álcool polivinílico. Sonicador (QSonica, EUA)

Formulação	Volume DCM (mL)	Volume PVA (1ª fase aquosa) (mL)	Concentração PVA (1ª fase aquosa) (%)	Amplitude do sonicador (%)	Tempo de sonicação (s)	Concentração PVA (2ª fase aquosa) (%)
1	1,0	4,0	2,5	65	60	1,0
2	1,0	5,0	10,0	45	300	1,0
3	1,5	3,0	2,5	45	120	1,0
4	1,5	3,0	2,5	60	60	1,0
5	1,5	4,0	5,0	65	300	0,5
6	1,5	4,0	5,0	65	300	0,5
7	2,0	4,0	10,0	45	120	1,0
8	2,0	3,0	10,0	65	120	0,5
9	2,0	5,0	10,0	65	300	0,75
10	2,0	5,0	10,0	65	120	0,75

Tabela 8: Condições de preparação das NP por emulsão simples de óleo em água

Diferente das NP preparadas via emulsão simples, onde diversas condições foram testadas, as NP preparadas por emulsão dupla foram feitas de acordo com resultados prévios do laboratório (ALFAGIH *et al.*, 2015). Neste caso, 200 mg de polímero foram dissolvidos em 2 mL de DCM. Esta solução foi gotejada em 1 mL de uma solução de PVA 10%(v/v) sob sonicação durante 30 s com amplitude de 65%. A primeira emulsão foi adicionada em 4 mL de PVA 0,75%(v/v) sob sonicação por 30 s com amplitude de 65%. Após esta segunda sonicação, a solução permaneceu sob agitação de 500 rpm por 90 min, à temperatura ambiente para a evaporação do solvente orgânico. Finalmente, as NP foram ultracentrifugadas a 78000 g por 40 min, o sobrenadante foi descartado e as partículas armazenadas (Figura 11B).

Visando aumentar o potencial adjuvante das NP, dois tipos de quitosana foram incorporadas às partículas: carboximetil quitosana (CM-CS) e cloridrato de quitosana (HCl-CS). Para isso, diferentes concentrações de quitosana, 0,2 a 16,0 mg/mL foram adicionadas à formulação durante a etapa de evaporação do solvente orgânico (Figura 11A), nas NP produzidas via emulsão simples, e durante a segunda sonicação naquelas produzidas por emulsão dupla (Figura 11B). Em seguida foram determinados o tamanho, o potencial zeta e o índice de polidispersão (PDI) das NP.

#### **4.4. Caracterização da NP vazias**

##### **4.4.1. Tamanho, índice de polidispersão e potencial Zeta**

As NP foram analisadas por difração a laser utilizando um Zetasizer Nano ZS (Malven Instruments Ltd., Worcestershire, UK). Para tal, uma alíquota de 100 µL das NP foi ressuspensa em 4 mL de água deionizada, 1 mL foi adicionado a uma cubeta de plástico e as medições foram realizadas em triplicata à temperatura ambiente.

##### **4.4.2. Ensaio de toxicidade das NP**

Células dendríticas (JAWS II, ATCC) foram cultivadas por 48 h, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> em 20 mL de meio RPMI suplementado, contendo 20% de soro fetal bovino, 1% de solução de antibiótico/antimicótico (100 unidades/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina, 0,25 µg/mL amfotericina B, Invitrogen) e L-glutamina 4 mM (RPMI completo) mais 5 ng/mL de GM-CSF. Após 48 h, as células foram centrifugadas a 1000 rpm e 24 °C por 10 min, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 40 mL do mesmo meio e cultivadas, nas mesmas condições anteriores, por 120 h. Após o segundo cultivo, as células foram coletadas e contadas utilizando uma câmara de Neubauer. As células foram centrifugadas e ressuspensas em meio RPMI completo de modo a se obter a concentração de  $2,5 \times 10^5$  células/mL. Em seguida, 100 µL desta suspensão foram adicionados aos poços de uma placa de 96 poços que foi incubada durante 4 h a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub>. As diferentes formulações de NP a serem testadas foram ressuspensas cada uma em meio RPMI completo e diluídas de modo a obter as seguintes concentrações de NP: 2560 µg/mL, 1280 µg/mL, 640 µg/mL, 320 µg/mL, 160 µg/mL, 80 µg/mL, 40 µg/mL, 20 µg/mL e 10 µg/mL. Após incubar as células, 100 µL de cada concentração de NP foram adicionados, em triplicata, na placa. 10% dimetil sulfoxido (DMSO) foi utilizado como controle positivo, representando 100% de toxicidade, e meio RPMI completo sem NP como controle negativo, 0% toxicidade. Após ser incubada por 4 h, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, a placa foi retirada da estufa e 40 µL de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-dimetiltetrazolio (MTT), 5 mg/mL, foram adicionados. Após 2 h, o meio foi removido e substituído por 100 µL de DMSO para dissolver os cristais formados. A absorbância foi medida à 570nm usando um leitor de

placas (Molecular Devices, SpectraMAX 190) e a porcentagem de células viáveis foi calculada pela razão entre a absorbância das células tratadas com NP e as células não tratadas do controle.

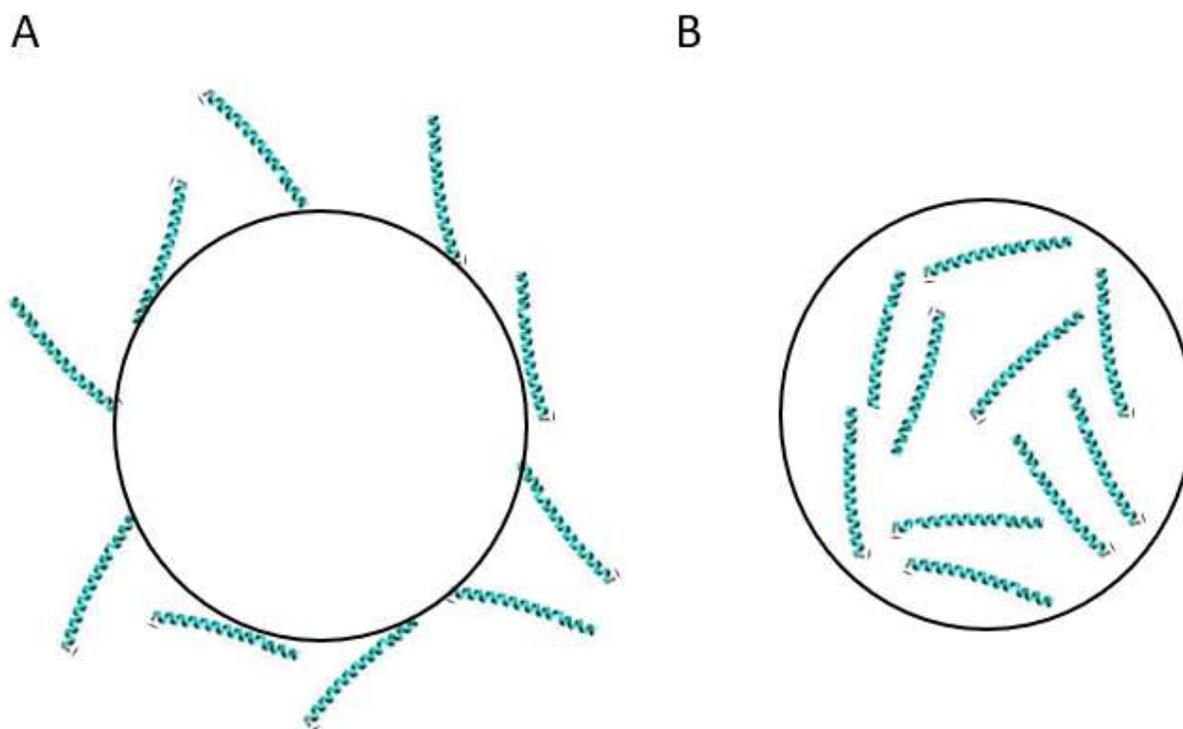
#### **4.5. Ligação da PspA4Pro às NP**

Determinadas as formulações finais das NP com e sem quitosana, a etapa seguinte consistiu da ligação do antígeno pneumocócico, a proteína A de superfície do pneumococo (PspA4Pro), às NP. Duas estratégias de ligação foram testadas, a adsorção da proteína à superfície das NP e o encapsulamento das proteínas dentro das NP (Figura 12). No primeiro caso, após as nanopartículas serem ultracentrifugadas, elas foram ressuspensas em 4 mL de PspA4Pro em pH 4,0 ou pH 7,0, numa proporção 25:1 NP:PspA4Pro (massa:massa). Esta mistura NP/PspA4Pro permaneceu sob agitação em agitador HulaMixer (Life Technology, Invitrogen, Reino Unido) durante 1 h, à temperatura ambiente e 20 rpm. As NP com PspA4Pro foram ultracentrifugadas a 78000 g, 40 min, 4 °C. Para o encapsulamento, adicionou-se a PspA4Pro durante a primeira etapa de sonicação, quando o polímero dissolvido em DCM foi adicionado à solução de PVA 10%+ PspA4Pro, na proporção 10:2 NP:PspA4Pro (massa:massa). Em ambos os casos, para determinar a quantidade de proteína ligada às NP, mediu-se a proteína no sobrenadante após a ultracentrifugação e calculou-se a diferença entre a quantidade de proteína adicionada e aquela obtida após a centrifugação. A quantificação da proteína foi feita por HPLC (Item 4.7) e calculou-se a eficiência de ligação de acordo com a Equação 8.

$$\text{Eficiência} = \frac{(\text{Massa PspA4Pro ligada}) \times 100}{\text{Massa inicial de PspA4Pro}}$$

Eq. 8

Figura 12: PspA4Pro ligada às nanopartículas por adsorção (A) e por encapsulamento (B)



#### 4.6. Liberação da PspA4Pro das NP

Para avaliar a cinética de liberação do antígeno das NP, 20 mg de NP carregadas com a PspA4Pro foram ressuspensas em 5 mL de PBS pH 7,0. Estas amostras foram incubadas a 37°C e deixadas rotacionando por 24 h a 20 rpm em agitador HulaMixer (Invitrogen, Reino Unido). Em intervalos definidos (30 min, 1 h, 2 h, 4 h e 24 h), as NP foram retiradas do agitador e centrifugadas (17000 g, 30 min, 24 °C). O sobrenadante de cada amostra foi recolhido para quantificação da PspA4Pro por HPLC (Item 4.7). As NP foram então ressuspensas e incubadas novamente até a retirada da próxima amostra.

#### 4.7. Quantificação da PspA4Pro ligada às NP por HPLC

A quantificação da PspA4Pro no sobrenadante das NP após a formulação (item 4.5) e da PspA4Pro liberada das NP (item 4.6) foi realizada utilizando um HPLC Agilent

série 1100 (Santa Clara, CA, EUA), equipado com uma coluna Aeris 3,6 $\mu$ m, C4 200A, Wide Pore 4.6 mm i.d. x 150 mm comprimento; fase móvel composta por (A) 0,1% TFA em água e (B) 0,1% TFA em acetonitrila com gradiente de (A) para (B) de 80:20 até 25:65 durante 25 min, post-time de 6 min, fluxo de trabalho de 0,8 mL/min, volume de injeção de 100  $\mu$ L e temperatura da corrida igual a 40 °C. A curva padrão de PspA4Pro foi preparada a partir de diluições da solução estoque de PspA4Pro (1 mg/mL) em PBS, de modo a obter as concentrações: 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0 mg/mL. Todas as soluções foram filtradas através de filtro 0,45  $\mu$ m antes da aplicação. A área dos picos obtidos para cada concentração de PspA4Pro foi utilizada para construir uma curva padrão Área (mAU\*cm) x [PspA4Pro] (mg/mL). Tanto o sobrenadante obtido após a formulação das NP como as amostras recolhidas do ensaio de liberação foram aplicados ao sistema de HPLC, nas condições descritas acima, e o resultado obtido (área do pico), utilizado para determinar a concentração de PspA4Pro na amostra.

#### **4.8. Avaliação da PspA4Pro liberada das NP**

A PspA4Pro liberada das NP (item 4.5) foi avaliada quanto à integridade, à capacidade de se ligar a anticorpos anti-PspA4Pro e à manutenção da atividade biológica.

##### **4.8.1. Integridade**

A integridade da proteína foi avaliada por SDS-PAGE 12%. Para isso, 5  $\mu$ g de PspA4Pro liberada de cada formulação foram adicionados à água destilada até um volume final de 15  $\mu$ L aos quais foram adicionados 5  $\mu$ L de tampão de amostra para SDS-PAGE. Cada amostra foi fervida durante 2 min em banho a 100 °C e aplicada no gel. Após 2 h de corrida a 100 V, o gel foi corado com Comassie-Blue por 4 h, descorado e as bandas da PspA4Pro observadas. Como controle positivo utilizou-se uma amostra de PspA4Pro purificada que não tenha sido ligada à nenhuma NP.

#### **4.8.2. Reconhecimento por anticorpos**

A capacidade de anticorpos reconhecerem a PspA4Pro liberada das NP foi determinada por ELISA. Uma placa de 96 poços com fundo chato foi sensibilizada com 5 µg de PspA4Pro liberada das NP suspensas em 100 µL de tampão carbonato de sódio por poço. Na mesma placa, 5 µg de PspA4Pro não ligada às NP foi utilizado como controle positivo. A placa foi incubada overnight a 4 °C. No dia seguinte, a placa foi lavada três vezes com PBS-T. Todas as lavagens foram feitas desta forma. A placa foi bloqueada com 200 µL de leite desnatado 10% em tampão PBS e incubada por 2 h a 37 °C. Após o bloqueio a placa foi lavada e 100 µL de anticorpo anti-PspA4Pro (monoclonal 22.003, QED Bioscience), diluído entre 1000 e 64000 vezes em PBS + Leite desnatado 5%, foram adicionados em cada poço. A placa foi incubada overnight, a 4 °C, lavada com PBS-T e em cada poço foram adicionados 100 µL de anti-IgG de camundongo conjugado à fosfatase alcalina (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd) diluído em PBS + Leite desnatado 5%. A revelação foi feita utilizando um kit de fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich) e a absorbância lida em no comprimento de onda de 405 nm.

#### **4.8.3. Atividade biológica de PspA4Pro**

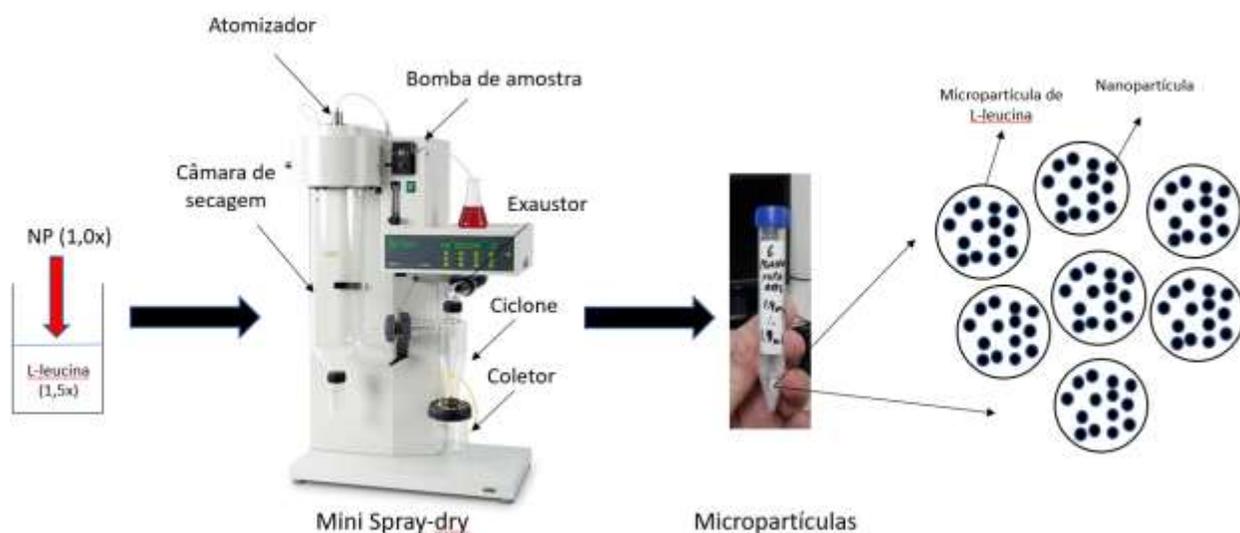
A atividade biológica da PspA4Pro foi determinada pela sua capacidade de se ligar à lactoferrina humana. Uma placa de poliestireno (NUNC) de 96 poços, fundo chato, foi sensibilizada com 10 µg de lactoferrina humana dissolvida em 100 µL de tampão carbonato de sódio por poço. A placa foi incubada overnight a 4 °C. No dia seguinte a placa foi lavada três vezes com PBS-T. Todas as lavagens foram feitas desta forma. A placa foi bloqueada com 200 µL de leite desnatado 10% em tampão PBS e incubada por 2 h a 37 °C. Após o bloqueio, a placa foi lavada e 5 µg de PspA4Pro liberadas de cada formulação de NP foi dissolvido em 100 µL de PBS + Leite desnatado 5% e adicionados em cada poço. PspA4Pro não ligada à NP foi utilizada como controle positivo e PBS + Leite desnatado 5% sem proteínas foi utilizado como controle negativo. A placa foi incubada overnight a 4 °C. No dia seguinte, a placa foi lavada e 100 µL de anti-PspA4Pro (monoclonal 22.003, QED Bioscience) diluído 1:5000 vezes em PBS + Leite desnatado 5% foram adicionados em cada poço. A placa

foi incubada por 2 h a 37 °C. O anticorpo de revelação empregado foi anti-IgG de camundongo conjugado à fosfatase alcalina (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd) e a revelação feita com kit de fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich).

#### 4.9. Preparação das micropartículas nanocompostas (NCMP)

A incorporação das NP às micropartículas nanocompostas deu-se pela técnica de *spray-drying*, utilizando um mini *spray-dry* Büchi B-290 (Büchi Labortechnik Flawil, Suíça) com um atomizador com 0,7 mm de diâmetro e um ciclone de alta performance. As NP carregadas com PspA4Pro foram suspensas em uma solução de L-leucina na proporção de 1:1,5 (m/m). A solução foi bombeada para o equipamento de *spray-dry* numa taxa de alimentação igual a 10%, fluxo de ar de 400 L/h, capacidade do aspirador igual a 100% e temperaturas de entrada e de saída iguais a 100 °C e 45-47 °C, respectivamente. As NCMP foram coletadas em tubos de 50 mL, previamente pesado (Figura 13). O rendimento do *spray-dry* foi determinado pela razão entre a massa de NCMP coletada no tubo e a massa total de NP + L-leucina aplicada no *spray-dry*.

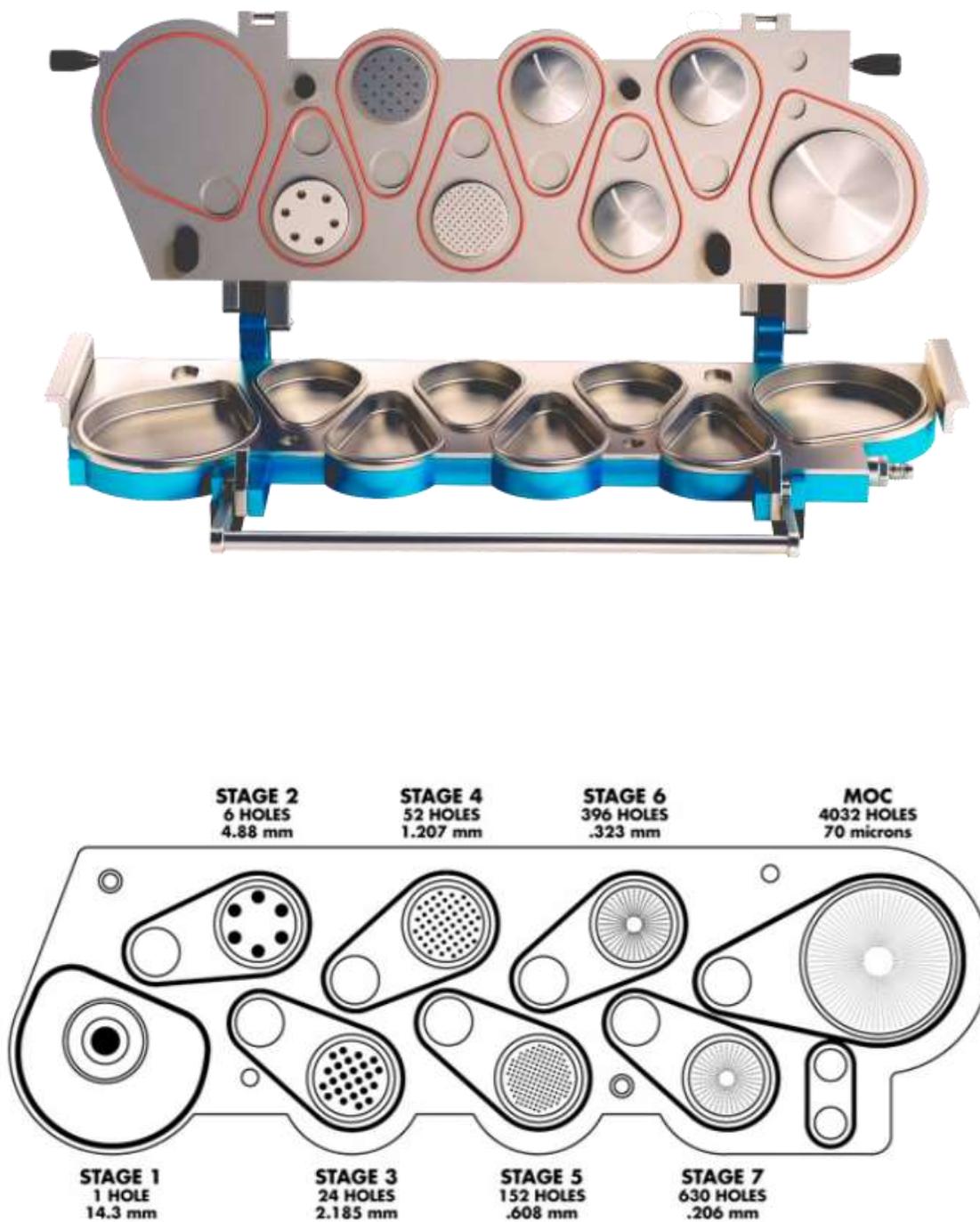
Figura 13: Produção das micropartículas de L-leucina com NP pelo método de *spray-dry*



#### 4.10. Ensaio de aerolização *in vitro* das NCMP

Neste experimento, foram utilizadas NCMP contendo NP de PGA-co-PDL e de PLGA, com e sem quitosana. 10 mg das NCMP foram pesados e adicionados em uma cápsula de hidroxipropil celulose (Hidropromelose, HPMC cápsula de tamanho 3). Quatro cápsulas foram preparadas para cada formulação. As cápsulas foram colocadas em um inalador (Cyclohaler, Teva Pharmaceutical Industries) acoplado a uma bomba (Copley Scientific, Nottingham, Reino Unido), operando em um fluxo de 60 L/min. A bomba foi programada para operar durante 4 s, durante os quais as NCMP foram sugadas para dentro de um Impactador Next Generation Impactor, NGI com 8 estágios (estágios 1 a 7 mais Micro Orifice Colector – MOC), cada um com uma placa coletora (Figura 14). Antes da passagem das NCMP, em cada placa do NGI foi aplicada uma solução de 1% acetona + Tween 80. As placas foram armazenadas a 37 °C até secarem. Em cada uma foi colocado um filtro de papel e as placas com filtro foram pesadas. Após as quatro cápsulas correspondentes a cada formulação de NCMP passarem pelo NGI, as placas foram removidas e pesadas novamente, anotando-se a massa de NCMP depositada em cada uma. Em seguida as placas foram lavadas, tratadas novamente com 1% acetona + Tween 80 e recolocadas para a aerolização da próxima amostra.

Figura 14: Impactador de Última Geração (Next Generation Impactor, NGI)



Fonte: QINSUN, 2019; MARPLE *et al.*, 2003.

A massa de NCMP em cada placa do NGI foi calculada subtraindo-se a massa da placa pós-amostra pela massa pré-amostra. A ferramenta *mmadcalculator* (MMAD CALCULATOR, 2018) foi utilizada para calcular o Diâmetro Mediano Aerodinâmico de Massa (MMAD), que representa o valor do diâmetro da partícula que divide a curva de distribuição de massa em duas áreas iguais, em relação ao diâmetro. Outros parâmetros calculados foram a dose de partículas finas (DPF) e a fração de partículas finas (FPF), de acordo com as Equações 9 e 10 abaixo.

$$DPF = M_2 + M_3 + M_4 + M_5 + M_6 + M_7 \quad \text{Eq. 9}$$

Onde  $M_x$  é igual à massa de NCMP depositada no estágio  $x$  no NGI

$$FPF = \frac{DPF \times 100}{M_t} \quad \text{Eq. 10}$$

Onde  $M_t$  é igual à massa total de NCMP aerolizada.

#### 4.11. Ensaio de ativação de células dendríticas

##### 4.11.1. Extração e cultivo das células dendríticas de camundongos

Doze camundongos fêmeas, linhagem BALB/c, com 7 semanas de idade foram sacrificados com dose letal de anestésico Xilazina/Quetamina (60/300  $\mu\text{g/g}$ ). Verificado o óbito, os animais foram limpos com etanol 70% e fixados em uma mesa cirúrgica. Com uma pinça e uma tesoura removeu-se a pele do animal até a altura do meio do abdômen. O fêmur foi retirado, removendo-se o máximo possível de tecido ao redor do osso, e armazenado em PBS, no gelo, até seu uso.

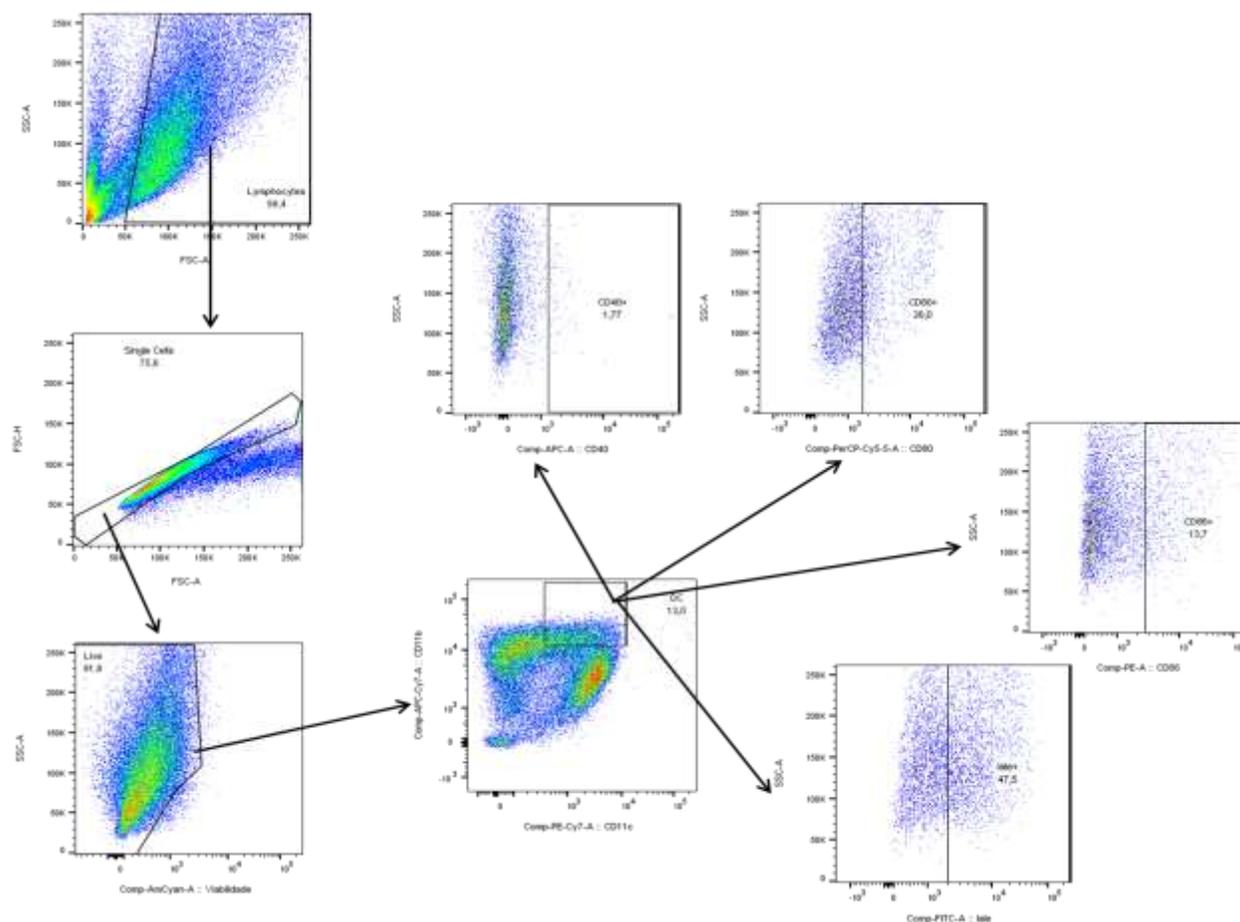
Dentro de uma cabine de fluxo laminar, o fêmur de cada animal foi mergulhado em Etanol 70% e em seguida transferido para uma placa contendo meio RPMI com solução de antibiótico/antimicótico (1000 unidades/mL penicilina, 1000  $\mu\text{g/mL}$  estreptomicina, 2,5  $\mu\text{g/mL}$  anfotericina B, Invitrogen). Com uma tesoura desinfetada, ambas as extremidades do fêmur foram removidas. O interior do fêmur foi lavado com 3 mL de meio RPMI completo + GM-CSF (20 ng/ml, Peprotech) e IL-4 (10 ng/ml, Peprotech). As células foram recolhidas em um tubo de 15 mL. O volume do tubo foi completado para 10 mL utilizando-se o mesmo meio RPMI acima, e dividido em 2

placas de Petri Optilux (100x20mm, Falcon), 5 mL por placa. Em seguida, mais 5 mL do meio RPMI foram adicionados em cada uma das placas, que em seguida foram incubadas em estufa com 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C. Após 3 dias na estufa, outros 10 mL do meio RPMI completo + GM-CSF e IL-4 foram adicionados a cada placa, que foram incubadas, nas mesmas condições anteriores, por mais quatro dias.

#### **4.11.2. Estímulo das células e leitura no citômetro de fluxo**

Após quatro dias na estufa foi feita a contagem das células usando câmara de Neubauer (diluição 1:10 em Trypan Blue) e  $1 \times 10^6$  células foram colocadas em cada um dos poços de uma placa de 24 poços. As formulações de NCMP (PGA-co-PDL e PLGA, com e sem HCl-Quitossana e com e sem PspA4Pro, esta, quando presente, podendo estar encapsulada ou adsorvida), foram adicionadas às células dendríticas em cada poço da placa. LPS foi utilizado como controle positivo e células dendríticas sem estímulo como controle negativo. Células dendríticas sem estímulo e sem marcação foram utilizadas para calibração do citômetro de fluxo (FACS) FACSCanto (BD Biosciences). As células foram incubadas com as NCMP por 24 h a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub>. No dia seguinte, as células foram transferidas para tubos de FACS com 4 mL de PBS. As células foram centrifugadas (10 min, 453 g) e lavadas duas vezes com PBS antes da adição da seguinte mistura de anticorpos em cada tubo: IαeFITC, CD11cPE-Cy7, CD11bAPC-Cy7, CD80PerCP-Cy5.5, CD86PE, CD40APC, FVS BV510. Os tubos foram incubados por 30 min a 4 °C antes de serem analisadas no FACS. Os programas FlowJo (Figura 15) e o GraphPad Prism foram utilizados para a análise dos resultados. As diferenças entre os grupos foram avaliadas por One-way ANOVA com pós-teste de Tukey.

Figura 15: Estratégia de análise no FlowJo. Primeiro, determinou-se a população total de células, seguida pela população de células individuais e de células vivas. As células dendríticas (CD11b+/CD11c+) foram selecionadas dentre as células vivas. Finalmente as populações CD40+, CD80+ CD86+ e lale+ foram medidas em cada amostra.



## 4.12. Desafio letal com *S. pneumoniae*

### 4.12.1. Preparo dos estoques da cepa de *S. pneumoniae*

Para o desafio foi utilizada a cepa de *S. pneumoniae* ATCC6303, sorotipo 3 e que carrega PspA pertencente ao clado 5, família 2. Uma alíquota de ATCC6303 foi cultivada *overnight* em placa de ágar-sangue a 37 °C em recipiente fechado com vela, para remover o máximo possível do O<sub>2</sub>. No dia seguinte, diversas colônias foram coletadas e colocadas em 10 mL de meio THY, de modo a obter uma DO600 inicial de aproximadamente 0,1. As células foram cultivadas a 37°C até atingirem DO600 próxima a 0,4. Atingida a DO600 estipulada, o cultivo foi centrifugado a 2906 g a 20 °C por 20 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi

ressuspendido em 500  $\mu\text{L}$  de THY + 500  $\mu\text{L}$  de glicerol 50%. Alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  foram transferidas para criotubos a serem armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  até seu uso.

Para determinar o volume de estoque a ser utilizado no desafio, um criotubo contendo o estoque de pneumococo foi retirado do freezer e diluído serialmente de  $10^1$  até  $10^8$  vezes. 10  $\mu\text{L}$  de cada diluição foram plaqueados em triplicata em uma placa de ágar-sangue, subsequentemente incubada overnight a  $37^{\circ}\text{C}$  em recipiente fechado com baixa concentração de  $\text{O}_2$ . No dia seguinte foi feita a contagem das unidades formadoras de colônia por mililitro de estoque (UFC/mL).

#### 4.12.2. Imunização dos animais com as NCMP

Foram realizados dois experimentos de desafio, cada um empregando 42 camundongos fêmea, BALB/c com aproximadamente 7 semanas de idade. Em cada experimento os animais foram divididos em 7 grupos com seis animais cada. Cada animal foi anestesiado por via intraperitoneal com Xilazina/Quetamina (20/100  $\mu\text{g/g}$ ) e imunizado de acordo com as Tabelas 9 e 10.

Tabela 9: Esquema de imunização para o desafio com *S. pneumoniae* no experimento 1. As massas de NCMP listadas correspondem à quantidade de NCMP que contêm 2  $\mu\text{g}$  de PspA4Pro

Grupo	Antígeno	Via	Quantidade
1	Salina	Pulmonar	50 $\mu\text{L}$
2	PspA4Pro	Pulmonar	2 $\mu\text{g}$ em 50 $\mu\text{L}$ de salina
3	PspA4Pro	Subcutânea	2 $\mu\text{g}$ em 100 $\mu\text{L}$ de salina
4	PGA-co-PDL vazia	Pulmonar	53,2 $\mu\text{g}$ NCMP em 50 $\mu\text{L}$ de salina
5	PGA-co-PDL + HCl-Quitosana + PspA4Pro adsorvida	Pulmonar	53,2 $\mu\text{g}$ NCMP em 50 $\mu\text{L}$ de salina
6	PLGA vazia	Pulmonar	33,7 $\mu\text{g}$ NCMP em 50 $\mu\text{L}$ de salina
7	PLGA + HCl-Quitosana + PspA4Pro encapsulada	Pulmonar	33,7 $\mu\text{g}$ NCMP em 50 $\mu\text{L}$ de salina

Tabela 10: Esquema de imunização para o desafio com *S. pneumoniae* no experimento 2. As massas de NCMP listadas correspondem à quantidade de NCMP que contêm 6 µg de PspA4Pro

Grupo	Antígeno	Via	Quantidade
1	Salina	Pulmonar	50 µL
2	PspA4Pro	Pulmonar	6 µg em 50 µL de salina
3	PspA4Pro	Subcutânea	6 µg em 100 µL de salina
4	PGA-co-PDL vazia	Pulmonar	159,6 µg NCMP em 50 µL de salina
5	PGA-co-PDL + HCl-Quitosana + PspA4Pro adsorvida	Pulmonar	159,6 µg NCMP em 50 µL de salina
6	PLGA vazia	Pulmonar	101,1 µg NCMP em 50 µL de salina
7	PLGA + HCl-Quitosana + PspA4Pro encapsulada	Pulmonar	101,1 µg NCMP em 50 µL de salina

Para realizar a imunização pulmonar, as NCMP foram pesadas e ressuspensas em solução salina estéril imediatamente antes da imunização. Os animais anestesiados foram posicionados na vertical e 50 µL da suspensão de NCMP em salina foram inoculados rapidamente em uma das narinas do animal, que permaneceu na vertical por mais alguns minutos até ser devolvido à caixa. Após a imunização, foi aplicado colírio nos olhos de cada animal para evitar ressecamento e irritação nos olhos decorrente da anestesia. Treze dias após a imunização foi feita a sangria retroorbital de todos os animais para determinação do título de anticorpos anti-PspA4Pro. Quatorze dias após a imunização foi aplicada uma segunda dose, seguindo o mesmo esquema de imunização prévio. Treze dias após a nova imunização foi feita nova sangria retroorbital e quatorze dias após a segunda dose os animais foram desafiados com *S. pneumococo* ATCC6303 (Tabela 11).

Tabela 11: Cronograma dos experimentos de imunização com as NCMP e desafio letal com cepa virulenta de pneumococo

Dia	Experimento
1	Imunização - 1ª Dose
14	Sangria 1
15	Imunização - 2ª Dose
28	Sangria 2
36	Desafio com pneumococo
50	Fim do experimento – Sacrifício dos animais sobreviventes

#### **4.12.3. Determinação do título de anticorpos anti-PspA4pro no soro dos animais imunizados**

Imediatamente após cada sangria, o sangue coletado foi armazenado a 37°C durante 30 min e depois *overnight* a 4°C. No dia seguinte, os coágulos formados em cada amostra foram retirados e cada tubo foi centrifugado a 453 g por 10 min a 4 °C. O soro de cada amostra foi coletado e congelado a -20°C até seu uso.

O título de IgG anti-PspA4Pro foi determinado por ELISA. Para tal uma placa de 96 poços (NUNC) foi sensibilizada com 0,5 µg de PspA4Pro em 100 µL de tampão carbonato-bicarbonato e incubada *overnight* a 4 °C. No dia seguinte a placa foi lavada três vezes com tampão PBS-T. O bloqueio foi feito com leite desnatado 5% em PBS, 200 µL por poço, e a placa incubada por 1 h a 37 °C. Após o bloqueio, a placa foi lavada três vezes com PBS-T. O soro de cada animal foi diluído, inicialmente 20 vezes, em tampão PBS + 1% BSA e aplicado à placa, 100 µL por poço. Após a diluição seriada das amostras de soro na placa, esta foi incubada por 2 h a 37 °C. A cada ELISA realizado o intervalo de diluição das amostras foi ajustado de acordo com o resultado do ELISA anterior. Após ser incubada com o soro dos animais, a placa foi lavada, como anteriormente, e 100 µL de anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (Sigma-Aldrich), diluído 5000 vezes em PBS + 1% BSA. A placa foi incubada durante 1 h a 37 °C e lavada como anteriormente. O ELISA foi revelado com 100 µL por poço de uma solução de OPD em tampão citrato fosfato + 50 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%(v/v). A reação de revelação ocorreu por 10 min e foi interrompida com 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4 M. As placas foram lidas em um leitor de placas (Thermo Fisher) e os resultados analisados com os softwares Excel e GraphPad Prism. O título foi definido como o inverso da maior diluição com DO492 ≥ 0,1. As diferenças entre os grupos por avaliada por One-way ANOVA com pós-teste de Tukey.

Além do título de IgG total, também foram determinados os títulos de IgG1 e de IgG2 do soro de cada animal, novamente por ELISA. O protocolo foi semelhante ao anterior, mas no lugar de anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase, foi adicionado anti-IgG1 ou anti-IgG2 de camundongo, ambos obtidos em cabra, diluídos 1000 vezes em PBS + 1% BSA. Neste experimento o anticorpo de revelação utilizado

foi anti-IgG de cabra conjugado à peroxidase diluído 20000 vezes em PBS + 1% BSA. A revelação e a leitura da placa foram feitas como anteriormente.

#### **4.12.4. Ensaio de desafio letal com cepa virulenta de pneumococo**

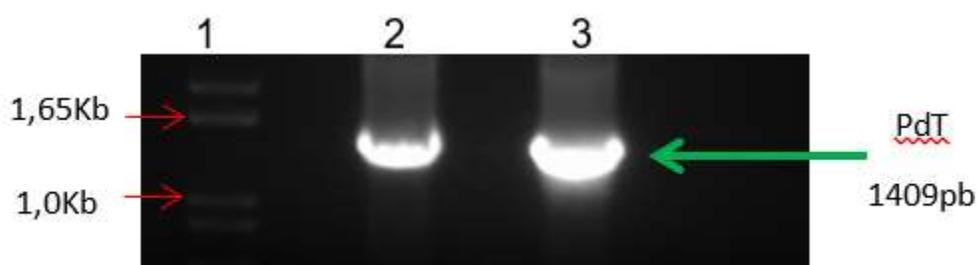
Duas semanas após a segunda dose os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com Xilazina/Quetamina (20/100 µg/g). Com base na UFC/mL previamente determinada (item 4.13.1), um volume do estoque contendo  $3 \times 10^5$  UFC foi adicionado à salina estéril para totalizar o volume final de 50 µL, pipetado em uma das narinas do camundongo anestesiado empregando o mesmo procedimento utilizado para imunização pulmonar. Após o desafio, os animais foram observados durante 10 dias, duas vezes ao dia. Animais letárgicos foram eutanasiados com dose letal de Xilazina/Quetamina (60/300 µg/g). No segundo experimento de desafio realizado, onde a dose de PspA4Pro foi aumentada de 2 µg para 6 µg, os animais foram observados durante 14 dias em vez de 10. Após o término dos experimentos, os animais sobreviventes foram sacrificados com dose letal de anestésico. As diferenças entre os grupos na sobrevivência final foram analisadas pelo Teste Exato de Fisher.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Clonagem PdT

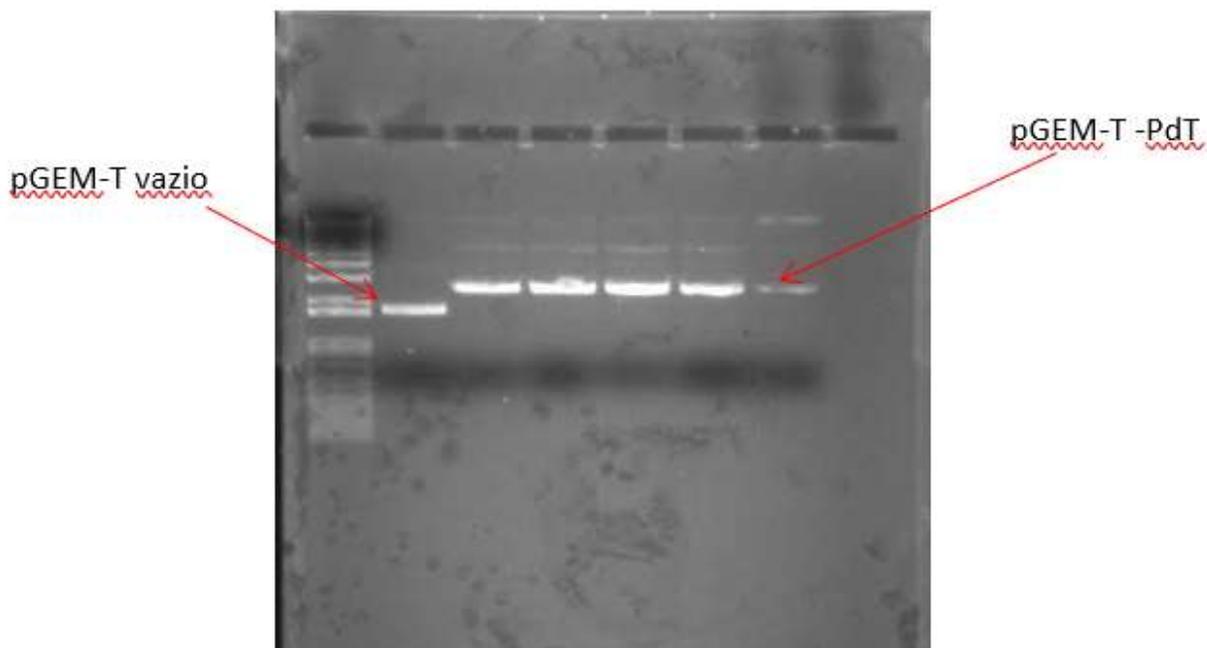
Duas condições foram avaliadas para amplificação do gene de PdT por PCR: 2,0 mM e 3,5 mM de MgSO<sub>4</sub>. O gene foi amplificado nas duas condições e a banda no gel foi mais intensa com a maior concentração de MgSO<sub>4</sub> (Figura 16).

Figura 16: Gel de agarose 0,8% com o gene da PdT amplificado. 1) Padrão, 2) PdT - 2 mM MgSO<sub>4</sub> e 3) PdT - 3,5 mM MgSO<sub>4</sub>



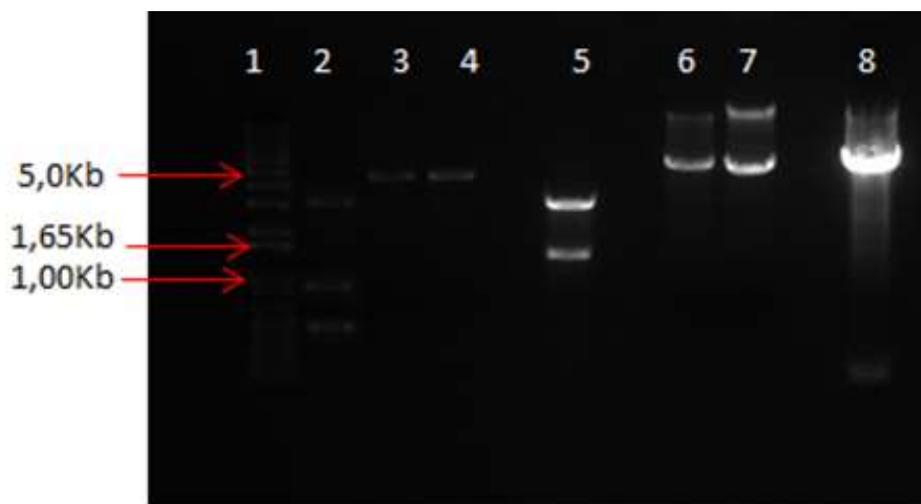
O produto da PCR foi ligado ao plasmídeo pGEM-T. A reação de ligação foi utilizada para transformar *E. coli* DH5 $\alpha$ , que foi cultivada em placa de LBágar + ampicilina + X-gal, tendo sido obtida uma grande quantidade de colônias brancas. Cinco destas colônias foram selecionadas e cultivadas em meio LB + ampicilina para realização da miniprep. O gel de agarose das minipreps dessas cinco colônias de *E. coli* DH5 $\alpha$  transformadas com o pGEM-T-PdT mostrou a diferença de massa molecular entre o plasmídeo com o gene e o controle, pGEM-T vazio (Figura 17).

Figura 17: Gel de agarose 0,8% do pGEM-T vazio e transformado com o gene da PdT



Após a miniprep, foi feita digestão do plasmídeo pGEM-T-PdT com as enzimas *Eco* RI, *Xho* I e *Nco* I. A enzima *Eco* RI libera o inserto de pGEM-T Easy e corta o gene da PdT uma vez na posição 515 (canaleta 2,

Figura 18: Gel de agarose 0,8% mostrando o mapa de restrição do pGEM-T carregando o gene da PdT e do pET-28a. 1) Padrão, 2) Digestão pGEM-T-PdT com *Eco* RI, 3) Digestão pGEM-T-PdT com *Nco* I, 4) Digestão pGEM-T-PdT com *Xho* I, 5) Digestão dupla do pGEM-T-PdT com *Nco* I e com *Xho* I, 6) Digestão pET28 com *Nco* I, 7) Digestão pET28 com *Xho* I, 8) Digestão pET28 com *Nco* I e *Xho* I



Todas as bandas esperadas na digestão do pGEM-T-PdT com a *Eco* RI, a *Nco* I e a *Xho* I foram observadas no gel e a presença dos sítios de restrição para *Nco* I e *Xho* I no pET-28a também foi confirmada. Assim, o pGEM-T-PdT foi empregado para sequenciar o gene da PdT e a sequência obtida correspondeu à sequência do gene da PdT, incluindo as três mutações que destoxificam a pneumolisina (ANEXO I). Assim, o pGEM-T-PdT foi digerido com *Nco* I e *Xho* I, o gene da PdT foi purificado e inserido no pET-28a e o produto da reação de ligação foi usado para transformar *E. coli* DH5 $\alpha$ . Das colônias que cresceram na placa de LBágar + canamicina, seis foram selecionadas e cultivadas em meio líquido. Feita a miniprep o plasmídeo pET-28a-PdT foi inserido na *E. coli* BL21(DE3) e as colônias obtidas na placa de LBágar + canamicina foram testadas para a expressão do gene da PdT.

## 5.2. Teste de expressão do gene da PdT

Após obter colônias isoladas de *E. coli* BL21(DE3) pET-28a-PdT em placa de LBágar + canamicina, 4 colônias foram selecionadas para realização do teste de expressão. Os quatro clones tiveram perfis de crescimento muito semelhantes (Figura 19). Desta forma, amostras pré e pós-indução, retiradas às 2 h e 5 h de cultivo, respectivamente, dos quatro clones foram aplicadas ao SDS-PAGE (Figura 20).

Figura 19: Crescimento celular dos clones selecionados de *E. coli* BL21(DE3) pET28-PdT para avaliar a produção de PdT

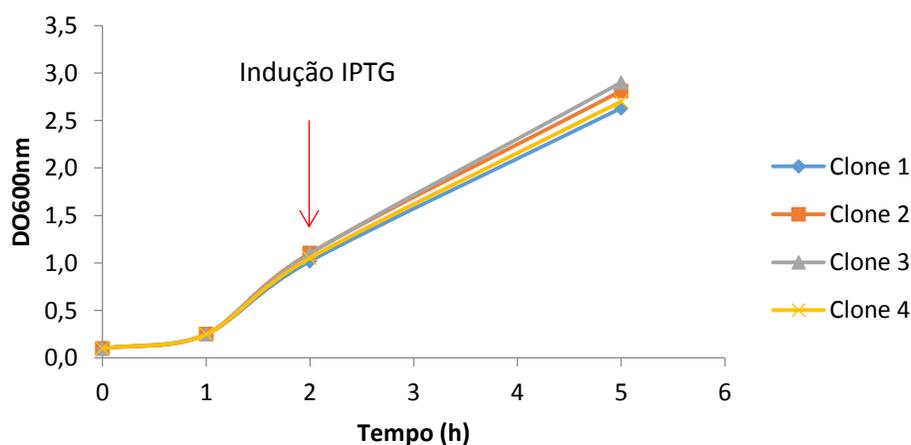
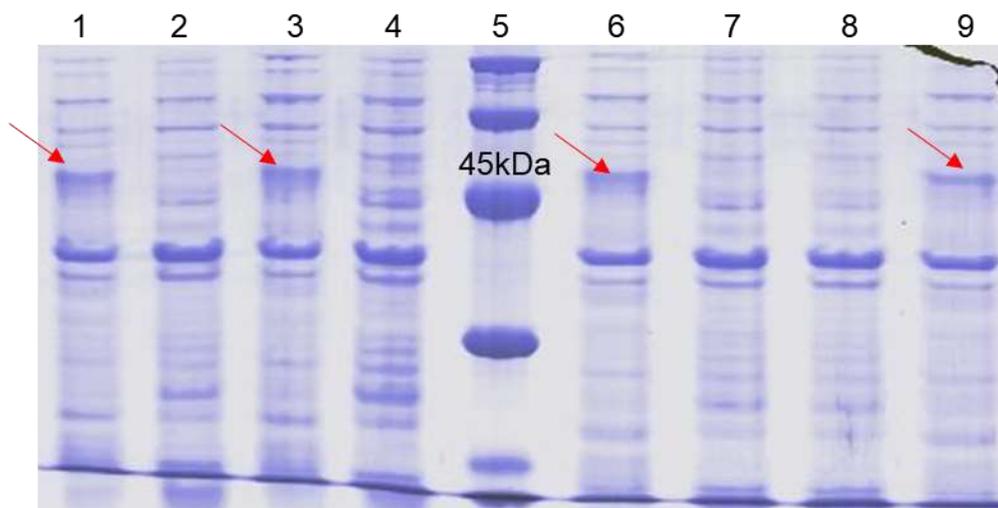


Figura 20: SDS-PAGE 12% das amostras dos cultivos para escolha do clone produtor de PdT em *E. coli* BL21(DE3). 1: Clone 1 Induzido; 2: clone 1 não-induzido; 3: clone 2 induzido; 4: clone 2 não-induzido; 5:

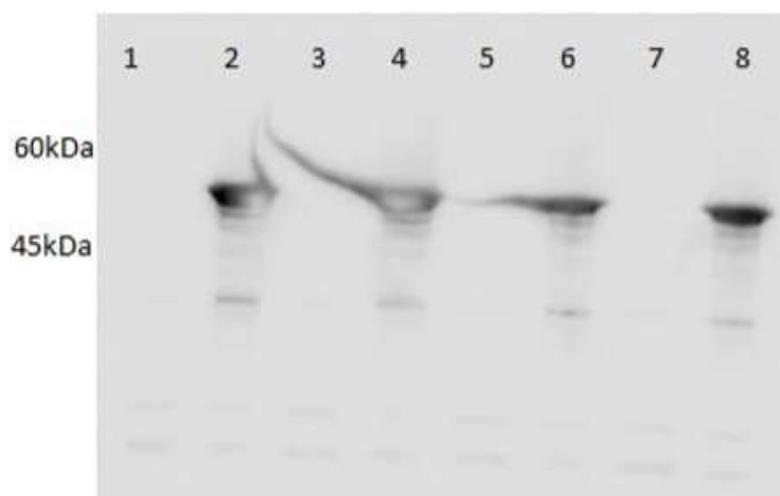
padrão de massa molecular; 6: clone 3 induzido; 7: clone 3 não-induzido; 8: clone 4 não-induzido; 9: clone 4 induzido. As flechas indicam a banda correspondente à PdT.



Nos 4 clones induzidos pode ser vista uma banda entre 45 kDa e 60 kDa, intervalo que compreende a massa predita da PdT (52,8 kDa), que não está presente na amostra pré-indução. Para confirmar a produção da PdT foi realizado o *western blot* das amostras pré e pós-indução dos quatro clones (

Figura 21).

Figura 21: *Western blot* das amostras dos cultivos para escolha do clone produtor de PdT em *E. coli* BL21(DE3). 1: clone 1 não-induzido; 2: clone 1 induzido; 3: clone 2 não-induzido; 4: clone 2 induzido; 5: clone 3 não induzido; 6: clone 3 induzido; 7: clone 4 não-induzido; 8: clone 4 induzido.



As bandas abaixo da PdT podem significar tanto a degradação de parte da proteína como reatividade inespecífica com o anticorpo utilizado, anti-extrato total de pneumococo. Ainda assim o *western blot* confirmou que todos os clones produziram a PdT após a indução com IPTG. Confirmada a produção da PdT, a densitometria das bandas do SDS-PAGE mostrou que o clone 4 produziu a maior quantidade de PdT em relação ao total de bandas de proteínas presentes no gel. Assim este clone foi escolhido para produção do estoque congelado e para futuros cultivos de PdT.

### 5.3. Purificação PspA4Pro

#### 5.3.1. Delineamento experimental para otimização da etapa de clarificação da PspA4Pro

A seleção das variáveis que influenciam significativamente a etapa de clarificação da PspA4Pro foi feita por um delineamento experimental de Plackett & Burman. As seguintes variáveis foram avaliadas: concentração de CTAB, concentração da biomassa, velocidade de agitação, temperatura, concentração salina e pH (

Tabela 5). A maioria dos ensaios teve recuperação total da PspA4Pro e redução de mais de 90% do total de ácidos nucleicos, pureza entre 54% e 79% e uma grande diferença na redução de polissacarídeos totais entre os diferentes ensaios (entre 1,6 e 72%), além de boa reprodutibilidade dos pontos centrais (Tabela 12).

Tabela 12: Resultados da etapa de clarificação obtidos para os 12 ensaios (PB1-12) e os 3 pontos centrais (PC1-3) realizados de acordo com as condições definidas na matriz PB12 mostrada na Tabela 5

Amostra	Pureza PspA4Pro (%) <sup>*</sup>	Recuperação PspA4Pro (%)	Redução Ac, Nucleicos (%)	Redução Polissacarídeos (%)
PB1	54,4	100,0	81,9	28,2
PB2	58,9	66,9	57,1	50,9
PB3	57,5	100,0	92,5	33,2
PB4	54,7	100,0	85,4	72,8
PB5	76,1	100,0	97,3	48,0
PB6	59,2	100,0	91,1	6,6
PB7	63,2	100,0	90,3	37,9
PB8	51,1	100,0	85,3	1,6
PB9	61,7	57,1	93,5	23,4

PB10	70,9	100,0	92,9	26,8
PB11	79,8	100,0	98,3	56,2
PB12	62,6	100,0	93,4	41,6
PC1	59,3	86,5	93,0	35,9
PC2	59,8	82,1	93,7	39,7
PC3	56,1	95,3	93,2	38,6

\*Pureza inicial da PspA4Pro = 45%; PC = Ponto central

Das 6 variáveis testadas, somente a concentração de CTAB, a concentração de biomassa úmida e a velocidade de agitação influenciaram de forma significativa o processo de clarificação (Figura 22). Portanto, essas 3 variáveis foram empregadas para construir a matriz do delineamento central composto rotacional  $2^3$  com 6 pontos axiais e 3 pontos centrais (Tabela 13).

Figura 22: Gráficos de Pareto mostrando a influência de cada variável nos diferentes parâmetros da etapa de clarificação da PspA4Pro. A) Remoção de proteínas totais, B) Remoção de polissacarídeos; C) Remoção de ácidos nucleicos; D) Recuperação da PspA4Pro; E) Pureza da PspA4Pro

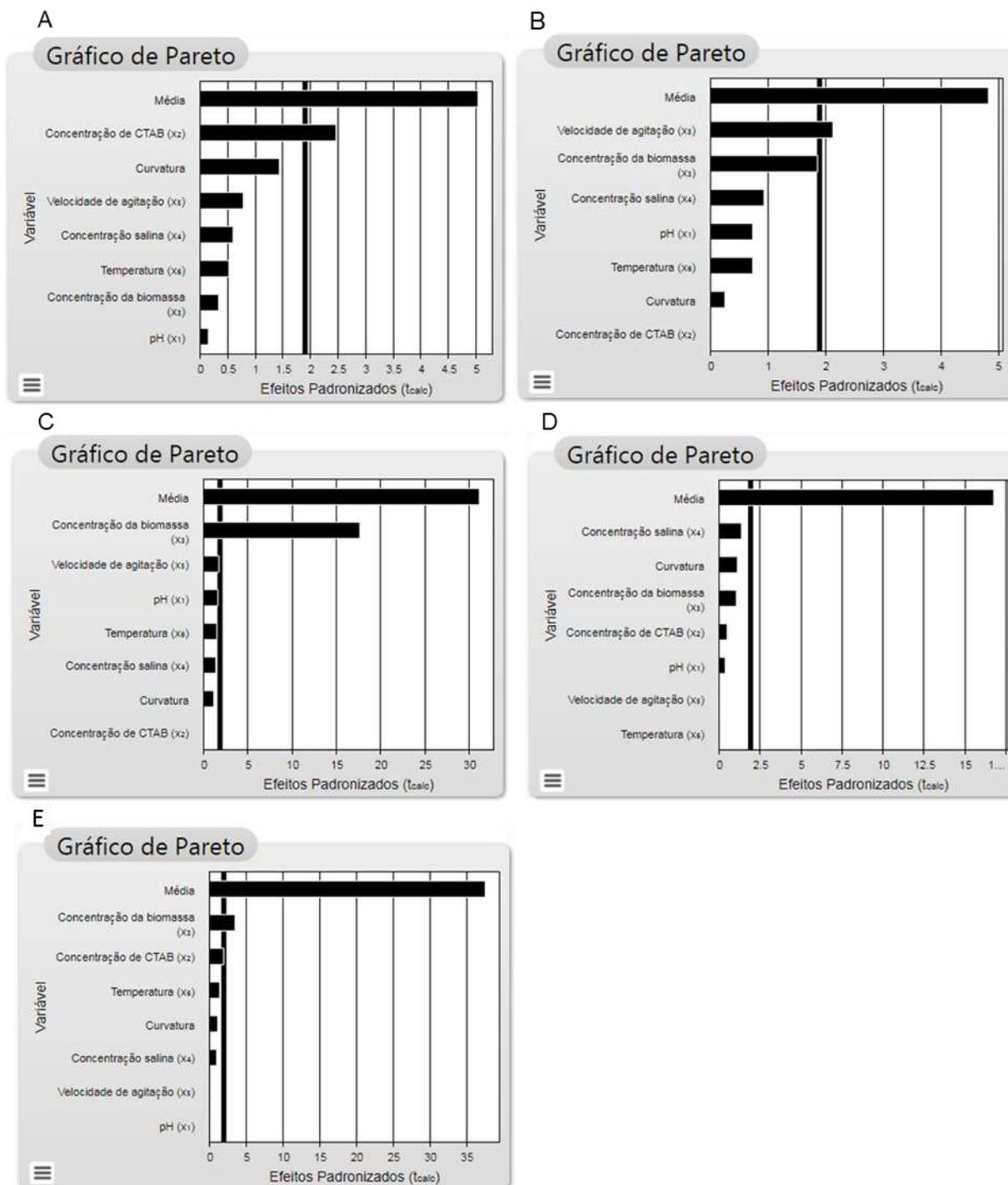


Tabela 13: Resultados da etapa de clarificação obtidos nos ensaios do DCCR 23 com 6 pontos axiais e 3 pontos centrais realizados de acordo com as condições mostradas na Tabela 6.

Amostra	Pureza PspA4Pro* (%)	Recuperação PspA4Pro (%)	Redução Ac. Nucleicos (%)	Redução Polissacarídeos (%)
DCCR1	73,7	81,6	26,2	21,7
DCCR2	75,2	58,3	81,2	57,0
DCCR3	67,4	99,4	32,3	4,6
DCCR4	73,8	85,9	55,3	42,7
DCCR5	70,8	83,2	17,8	21,7
DCCR6	79,2	64,7	83,6	58,0
DCCR7	65,7	85,6	32,4	7,7
DCCR8	75,5	84,4	60,1	50,6
DCCR9	70,6	100,0	19,5	0,0
DCCR10	85,0	82,5	79,2	56,3
DCCR11	77,7	64,1	83,2	58,0
DCCR12	65,9	100,0	20,6	28,6
DCCR13	58,9	59,9	45,6	26,8
DCCR14	60,0	54,6	42,5	48,1
PC1	53,5	58,7	41,4	25,4
PC2	52,4	56,7	38,8	25,5
PC3	53,1	58,0	38,4	23,1

\*Pureza inicial da PspA4Pro = 38,8%; PC = Ponto central

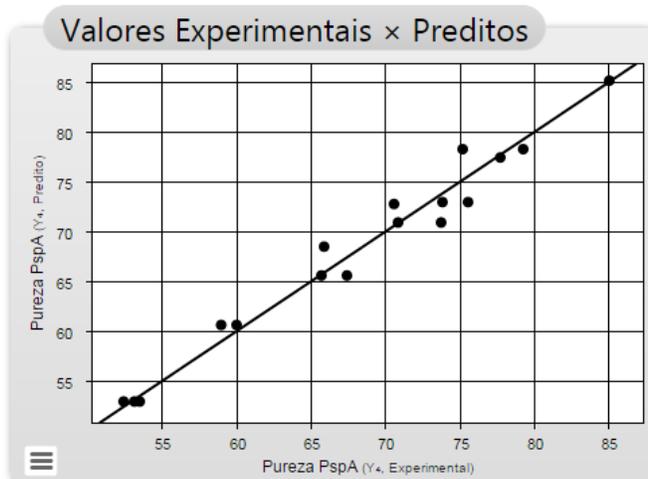
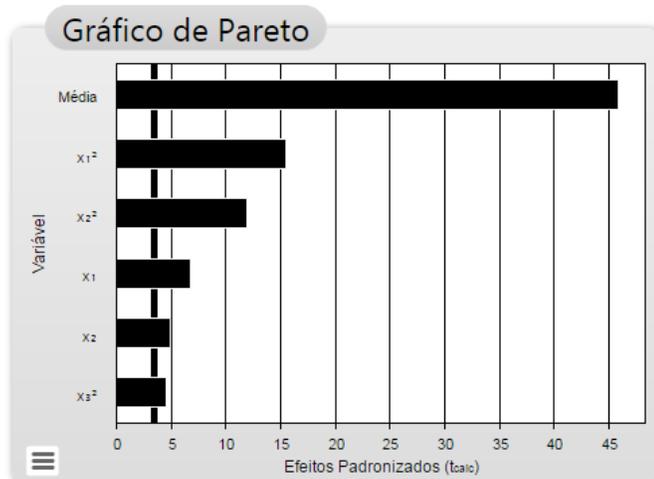
Observa-se no gráfico de Pareto (Figura 23) que a concentração de CTAB foi a variável que mais influenciou no aumento da pureza de PspA4Pro, seguida pela concentração da biomassa e pela agitação, sendo a influência de cada variável independente uma da outra. Os efeitos quadráticos da concentração de CTAB, concentração de biomassa e agitação mostram que estas três variáveis estão associadas à pureza de forma não linear, gerando a superfície curva que pode ser observada na Figura 24. A Tabela 14, abaixo, apresenta os resultados da regressão e da ANOVA calculados. Com base na regressão e no gráfico de Pareto, após eliminar os fatores não significativos, pode-se determinar um modelo empírico para a influência destas variáveis na pureza da PspA4Pro (Eq. 11).

Tabela 14: Cálculo de regressão e teste Anova para determinar a influência das variáveis concentração de CTAB, concentração de biomassa e agitação na pureza da PspA4Pro após a etapa de Clarificação.

Pureza PspA4Pro					
Regressão					
Variável	Coefficiente	Erro padrão	T calculado	p-valor	
Média	52,87	1,15	45,89	0,0000	
[CTAB]	3,68	0,54	6,81	0,0000	
[CTAB] <sup>2</sup>	9,2	0,6	15,46	0,0000	
[Biomassa]	-2,66	0,54	-4,92	0,0005	
[Biomassa] <sup>2</sup>	7,08	0,6	11,89	0,0000	
Agitação <sup>2</sup>	2,72	0,6	4,56	0,0008	
Anova					
Fonte de variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F calculado	p-valor
Regressão	1485,5	5	297,1	74,3	0,00000
Resíduos	44	11	4		
Falta de ajuste	43,3	9	4,8	15,5	0,06189
Erro puro	0,6	2	0,3		
Total	1529,5	16			
R <sup>2</sup>	97,12%				

Figura 23: Gráfico de Pareto e correlação entre valores preditos e experimentais dos ensaios do DCCR para a pureza da PspA4Pro. X1 corresponde à concentração de CTAB, X2 à concentração da biomassa e X3 à agitação.

Nível de significância:  $\alpha=0,5\%$

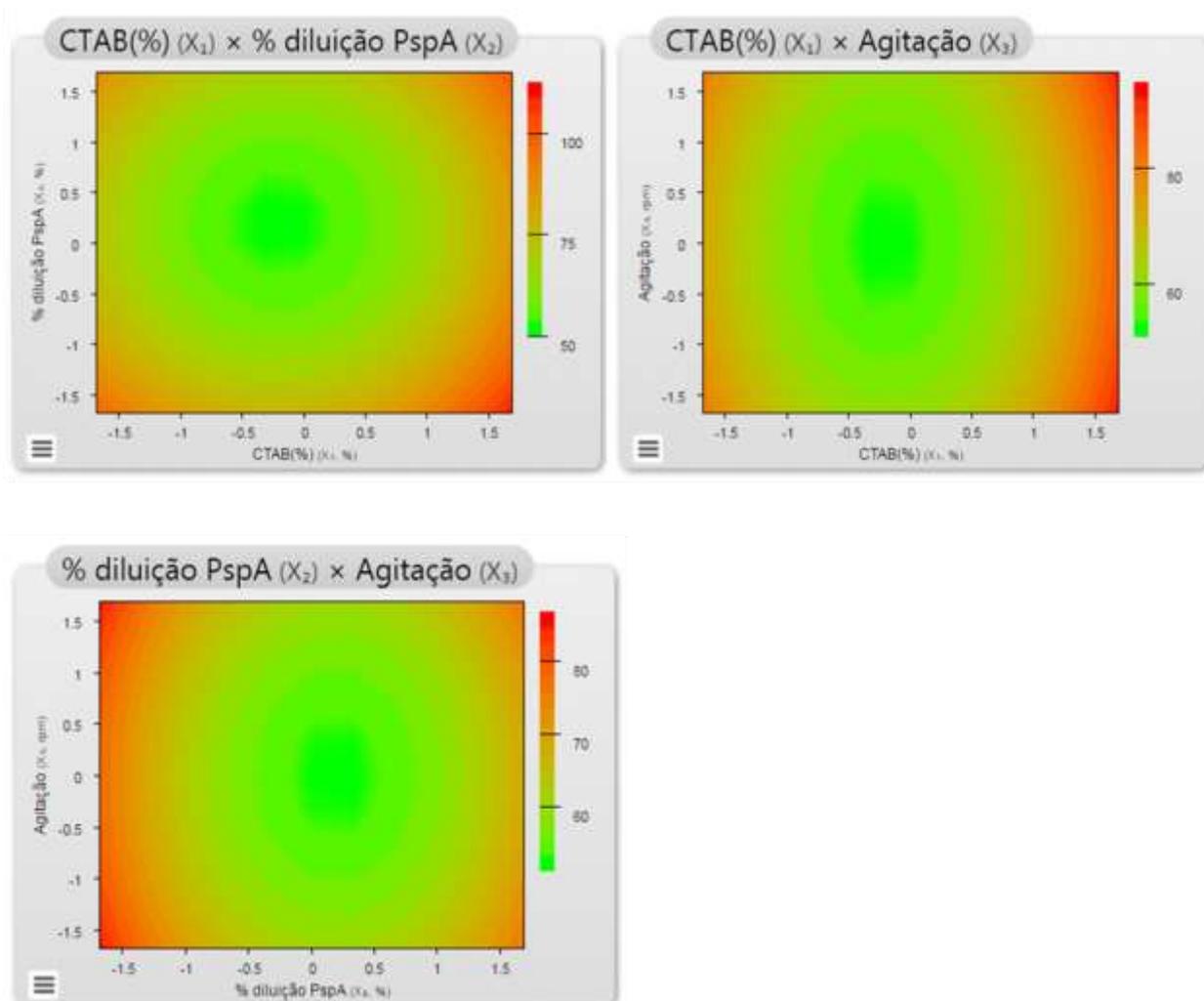


$$P = 52,9 + 3,68 \times [C] + 9,2 \times [C]^2 - 2,66 \times [CB] + 7,1 \times [CB]^2 + 2,72 \times [A]^2 \quad \text{Eq. 11}$$

Sendo P = Pureza PspA4Pro, [C] = concentração de CTAB, [CB] = concentração da biomassa e [A] = agitação

Observa-se também que os valores experimentais acompanharam os valores preditos pelo modelo por todo o intervalo, com  $R^2$  superior a 97%, isto é, o modelo empírico está representando bem os dados experimentais. Com base neste modelo foram geradas superfícies de resposta descrevendo como cada variável influencia na pureza da PspA4Pro (Figura 24/Figura 24).

Figura 24: Superfícies de resposta da pureza da PspA4Pro em função de: concentração de CTAB ( $X_1$ ) x concentração de biomassa úmida ( $X_2$ ); concentração de CTAB x agitação ( $X_3$ ) e concentração da biomassa úmida x agitação. A cor laranja representa a maior pureza



Foi observada uma relação positiva entre o aumento da concentração de CTAB e da agitação com o aumento da pureza, enquanto a redução da concentração da biomassa úmida, ou seja, aumento da diluição, teve relação negativa. De acordo com as superfícies, os maiores valores de pureza seriam alcançados nas condições extremas (-1/+1) destas variáveis, enquanto os piores resultados seriam obtidos próximo ao ponto central. A maior agitação favoreceria o encontro das moléculas do detergente com os contaminantes, enquanto a menor concentração de biomassa teria efeito oposto.

O gráfico de Pareto (Figura 25) e a Tabela 15 mostram que a concentração de CTAB e de biomassa são os fatores que mais influenciam na recuperação da PspA4Pro, de forma independente e associadas entre si. A agitação influencia somente quando associada à concentração de biomassa. O modelo da influência destas variáveis na recuperação da PspA4Pro está descrito pela Equação 12.

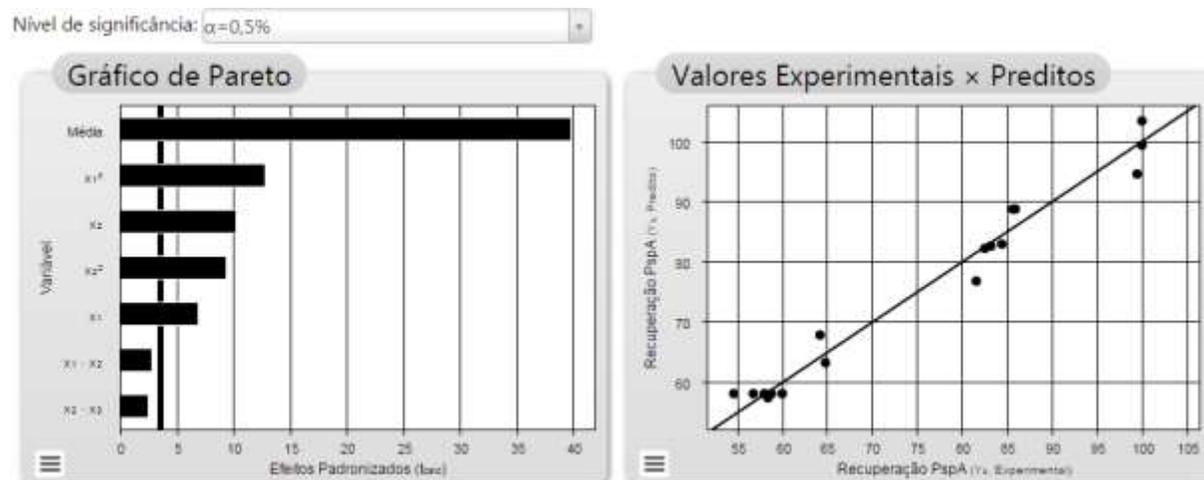
Tabela 15: Cálculo de regressão e teste Anova para determinar a influência das variáveis concentração de CTAB, concentração de biomassa e agitação na recuperação da PspA4Pro após a etapa de Clarificação.

Recuperação PspA4Pro					
Regressão					
Variável	Coefficiente	Erro padrão	T calculado	p-valor	
Média	58,07	1,46	39,81	0,0000	
[CTAB]	-6,29	0,91	-6,9	0,0000	
[CTAB] <sup>2</sup>	12,26	0,96	12,77	0,0000	
[Biomassa]	9,36	0,91	10,26	0,0000	
[Biomassa] <sup>2</sup>	9	0,96	9,38	0,0000	
[CTAB]x[Biomassa]	3,39	1,19	2,84	0,0175	
[Biomassa]xAgitação	-2,91	1,19	-2,44	0,0347	
Anova					
Fonte de variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F calculado	p-valor
Regressão	4255,4	6	709,2	62,4	0,00000
Resíduos	113,7	10	11,4		
Falta de ajuste	111,7	8	14	13,6	0,07052
Erro puro	2,1	2	1		
Total	4369,1	16			
R <sup>2</sup>	97,40%				

$$R = 58,7 - 6,29 \times [C] + 12,26 \times [C]^2 + 9,4 \times [CB] + 9 \times [CB]^2 + 3,39 \times [C] \times [CB] - 2,9 \times [CB] \times [A] \quad \text{Eq.12}$$

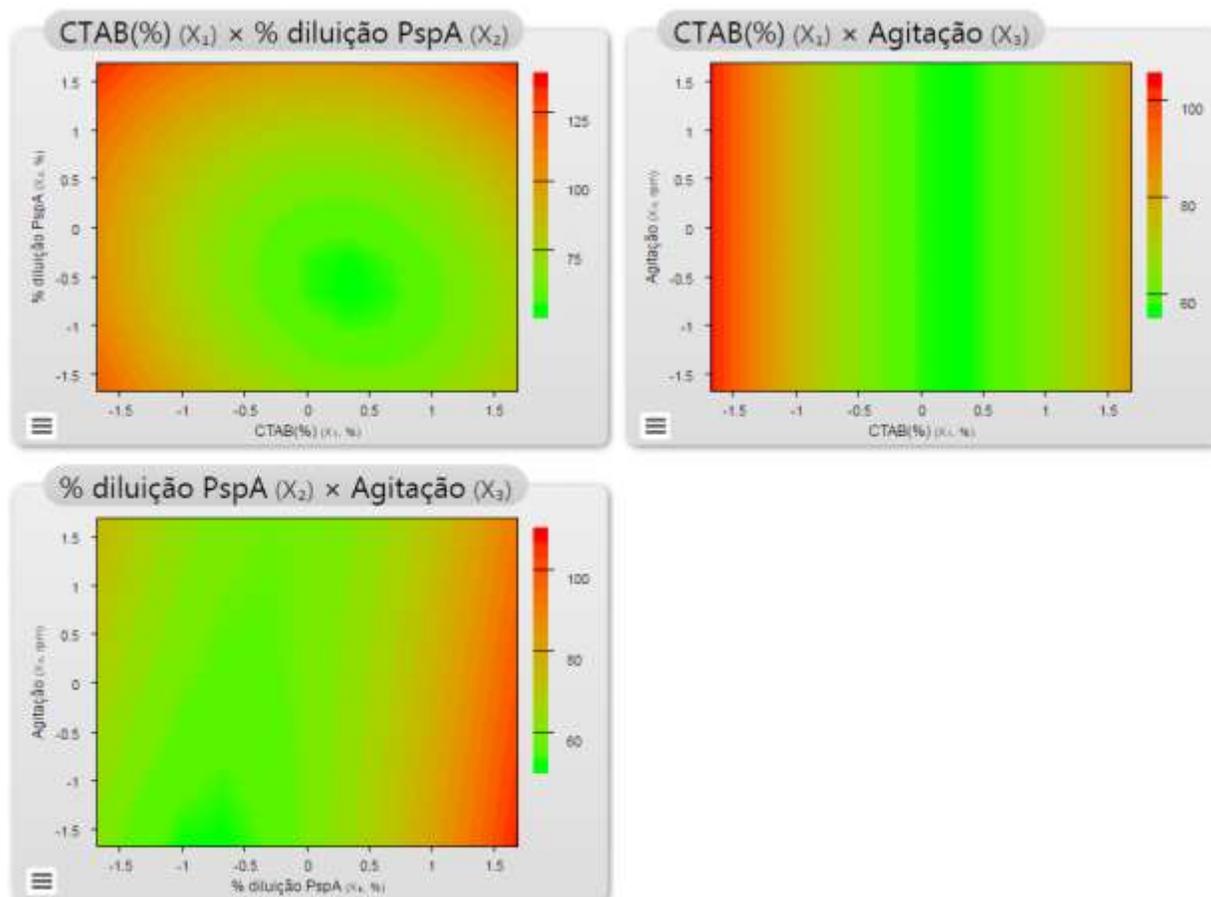
Sendo R = recuperação de PspA4Pro, [C] = concentração de CTAB, [CB] = concentração da biomassa e [A] = agitação

Figura 25: Gráfico de Pareto e correlação entre valores preditos e experimentais dos ensaios do rotacional para a recuperação da PspA4Pro. X1 corresponde à concentração de CTAB, X2 à concentração da biomassa úmida e X3 à agitação



As superfícies de resposta obtidas mostram que a menor concentração da biomassa úmida influenciou positivamente a recuperação de PspA4Pro independente da concentração de CTAB e da agitação (Figura 26). Por outro lado, a biomassa mais concentrada só levou ao aumento da recuperação quando acompanhada da redução da concentração de CTAB. De fato, o aumento da concentração de CTAB reduziu a recuperação. Experimentos anteriores revelaram que o CTAB não se liga à PspA4Pro, mesmo quando o pH do meio está acima do seu ponto isoelétrico (FIGUEIREDO, 2014). Desta forma, sugerimos que a perda de PspA4Pro com o aumento da concentração de CTAB se deva ao arraste desta proteína juntamente com o precipitado formado pela interação do CTAB com moléculas do hospedeiro. Uma suspensão de biomassa mais diluída levaria a menor arraste da PspA4Pro mesmo com o aumento da concentração de CTAB, situação observada na superfície CTAB x diluição. Menor agitação favoreceu a recuperação quando a biomassa está mais diluída, porém das três variáveis a agitação foi a que menos influenciou a recuperação da PspA4Pro.

Figura 26: Superfície de resposta do aumento da recuperação da PspA4Pro em função de: concentração de CTAB ( $X_1$ ) x concentração de biomassa úmida ( $X_2$ ); concentração de CTAB x agitação ( $X_3$ ) e concentração de biomassa úmida x agitação



Diferente do que foi observado para a recuperação e a pureza, a agitação não influenciou significativamente na remoção de ácidos nucleicos. Como pode ser visto na Tabela 16 e nos gráficos de Pareto (Figura 27) e de superfície (Figura 28), a concentração de CTAB influenciou positivamente na remoção destes contaminantes, enquanto menor concentração de biomassa teve efeito contrário. Por se ligar a moléculas grandes com carga negativa, o CTAB é comumente utilizado na remoção de ácidos nucleicos e purificação de plasmídeos, o que está de acordo com o resultado observado. Este modelo não apresenta efeitos quadráticos e está descrito pela Equação 13. O  $R^2$  abaixo de 90% indica que este modelo não representou tão bem os dados experimentais como os anteriores, indicando que este modelo precisaria ser ajustado ou que outras variáveis não analisadas estariam influenciando o resultado.

Tabela 16: Cálculo de regressão e teste Anova para determinar a influência das variáveis: concentração de CTAB e concentração de biomassa na remoção de ácidos nucleicos após a etapa de Clarificação

Remoção de ácidos nucleicos					
Regressão					
Variável	Coefficiente	Erro padrão	T calculado	p-valor	
Média	46,94	2,25	20,88	0,0000	
[CTAB]	19,93	2,51	7,94	0,0000	
[Biomassa]	-9,8	2,51	-3,91	0,0018	
[CTAB]x[Biomassa]	-8,75	3,28	-2,67	0,0193	
Anova					
Fonte de variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F calculado	p-valor
Regressão	7346,8	3	2448,9	28,5	0,00001
Resíduos	1117,3	13	85,9		
Falta de ajuste	1111,8	11	101,1	36,4	0,02702
Erro puro	5,6	2	2,8		
Total	8464,1	16			
R <sup>2</sup>	86,80%				

$$R_{an} = 46,94 + 19,93 \times [C] - 9,80 \times [CB] = 8,75 \times [C] \times [CB] \quad \text{Eq. 13}$$

Sendo  $R_{an}$  = remoção de ácidos nucleicos,  $[C]$  = concentração de CTAB e  $[CB]$  = concentração da biomassa

Figura 27: Gráfico de Pareto e correlação entre valores preditos e experimentais dos ensaios do rotacional para a redução de ácidos nucleicos. X1 corresponde à concentração de CTAB e X2 à concentração da biomassa.

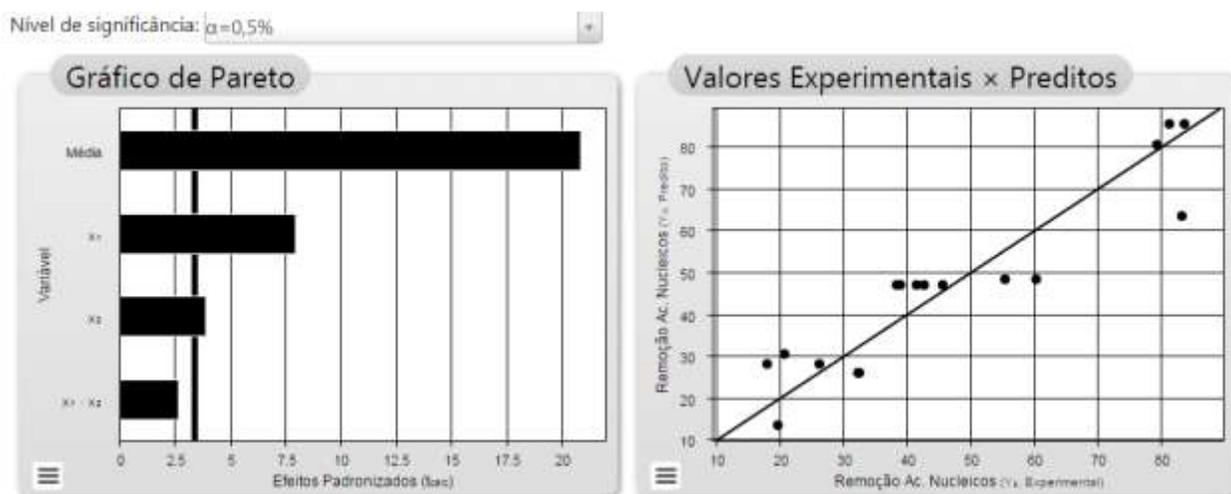
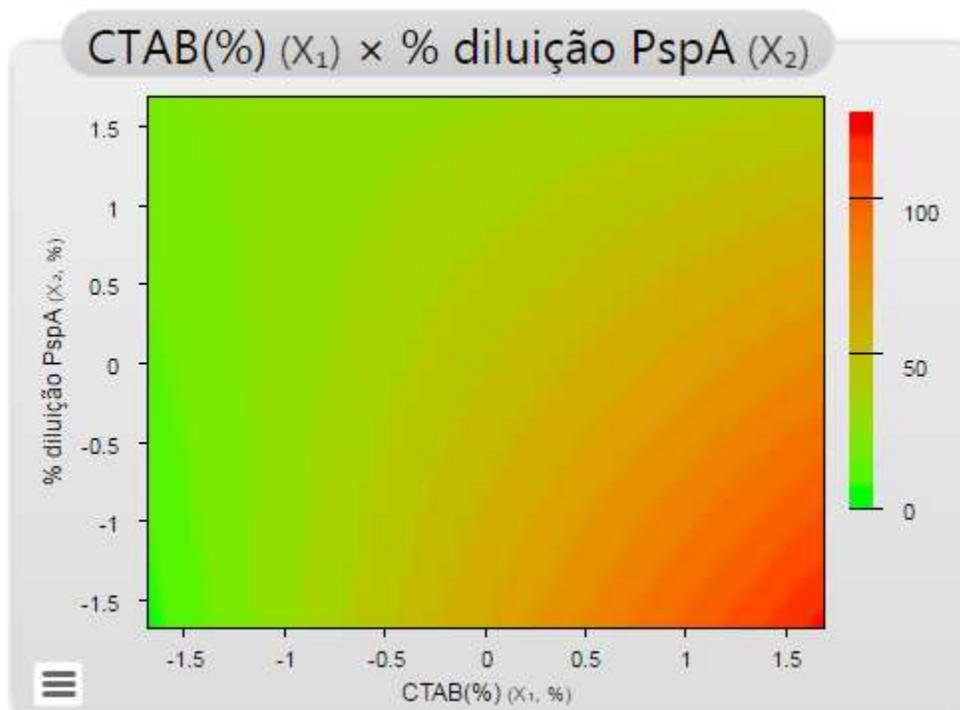


Figura 28: Superfície de resposta do aumento da redução de Ácidos Nucleicos em função da concentração de CTAB x concentração da amostra.



A Tabela 17 e o gráfico de Pareto (Figura 29) mostram que, assim como foi observado para o aumento da pureza da PspA4Pro, o aumento da concentração de CTAB e da agitação tiveram influência positiva na remoção de polissacarídeos, enquanto a menor concentração da amostra teve influência negativa. A concentração de CTAB foi o fator que mais influenciou na remoção deste contaminante e, neste modelo, atua somente de forma linear (Equação 14 e Figura 30).

Tabela 17: Cálculo da regressão e teste Anova para determinar a influência das variáveis concentração de CTAB, concentração de biomassa e agitação na remoção de polissacarídeos após a etapa de Clarificação.

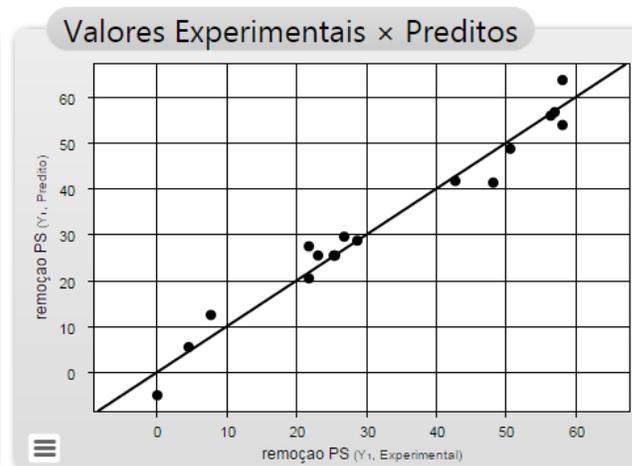
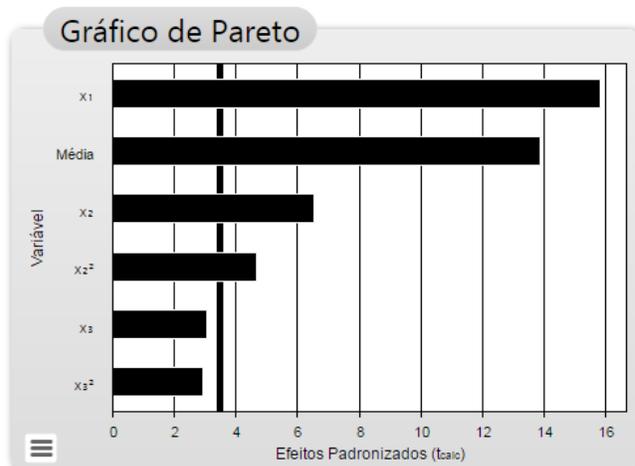
Pureza PspA4Pro					
Regressão					
Variável	Coefficiente	Erro padrão	T calculado	p-valor	
Média	25,36	1,83	13,88	0,0000	
[CTAB]	18,11	1,14	15,84	0,0000	
[Biomassa]	-7,49	1,14	-6,55	0,0000	
[Biomassa] <sup>2</sup>	5,6	1,2	4,66	0,0007	
Agitação	3,5	1,14	3,06	0,0108	
Agitação <sup>2</sup>	3,53	1,2	2,94	0,0136	

Anova					
Fonte de variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F calculado	p-valor
Regressão	5869,6	5	1172,7	65,7	0,00000
Resíduos	196,4	11	17,9		
Falta de ajuste	192,7	9	21,4	11,6	0,08175
Erro puro	3,7	2	1,8		
Total	6060	16			
R <sup>2</sup>	96,76%				

Figura 29: Gráfico de Pareto e correlação entre valores preditos e experimentais dos ensaios do rotacional para a redução de polissacarídeos totais. X1 corresponde à concentração de CTAB, X2 à concentração da biomassa e X3 à agitação.

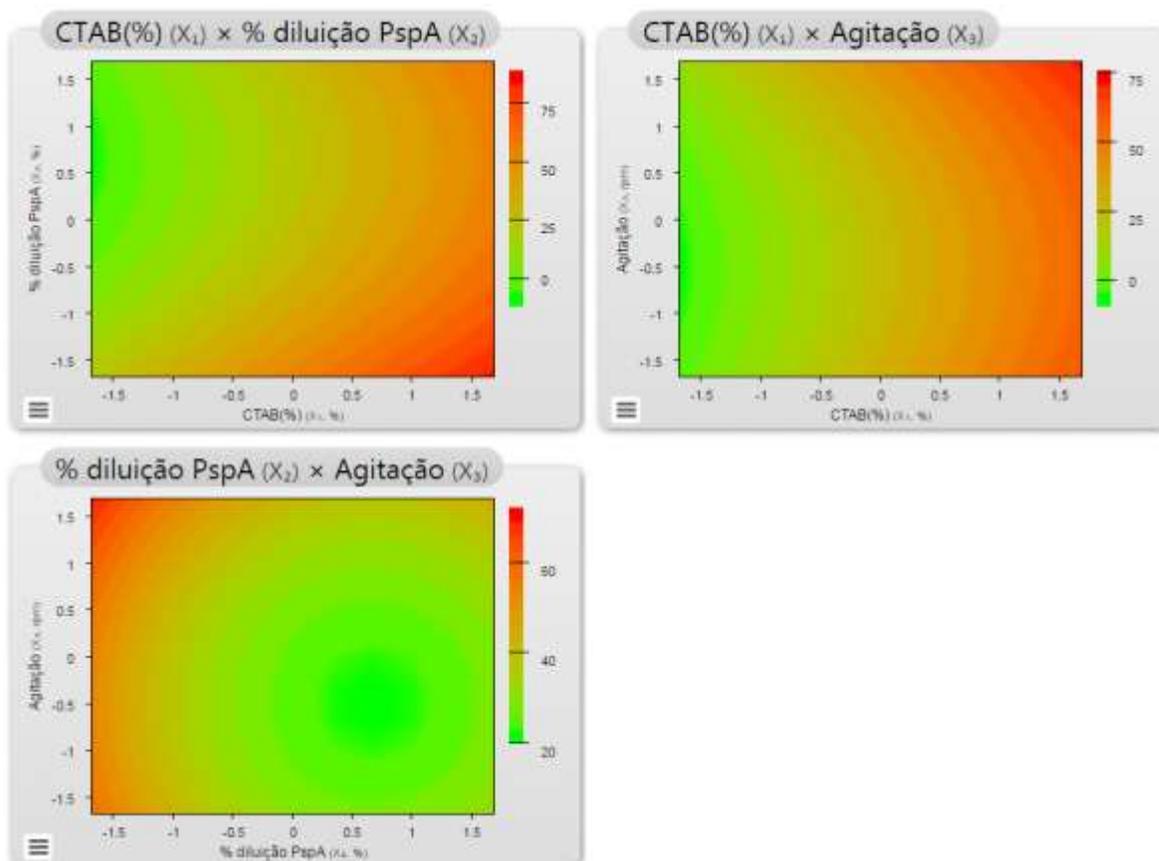
Nível de significância:  $\alpha=0,5\%$



$$PS = 25.4 + 18,1 \times [C] - 7,49 \times [CB] + 5,6 \times [CB]^2 + 3,5 \times [A] + 3,5 \times [A]^2 \quad \text{Eq. 14}$$

Sendo PS = eliminação de polissacarídeos, [C] = concentração de CTAB, [CB] = concentração da biomassa e [A] = agitação

Figura 30: Superfície de resposta do aumento da recuperação da PspA4Pro em função de: concentração de CTAB x concentração da amostra; concentração de CTAB x agitação e concentração da amostra x agitação.



Com base nos modelos obtidos acima, foram determinadas quatro condições de clarificação que resultariam nas maiores pureza e recuperação da PspA4Pro com elevada remoção dos contaminantes (Tabela 18). Os resultados dos ensaios descritos na Tabela 18 são apresentados na Tabela 19.

Tabela 18: Condições simuladas para otimização da clarificação com base nas equações geradas pelo modelo do DCCR

Ensaio	CTAB (%)	[Biomassa úmida] (g/L)	Agitação (rpm)	[Salina] (mM)	Temp. °C	pH
1	0,26	23,4	175	10	25	6,5
2	0,24	23,4	209	10	25	6,5
3	0,26	33,8	209	10	25	6,5
4	0,26	23,4	125	10	25	6,5

Tabela 19: Resultados experimentais dos ensaios realizados de acordo com as condições preditas como ótimas pelo modelo obtido do DCCR

Ensaio	Pureza PspA4Pro (%)	Recuperação PspA4Pro (%)	Redução Ac. Nucleicos (%)	Redução Polissacarídeos (%)
1	72.7	97.7	77.6	74.2
2	73.8	100.0	75.9	66.8
3	68.4	96.1	61.9	65.8
4	68.0	95.6	78.0	83.4

A purificação de proteínas recombinantes é um processo complexo e dificilmente é possível atingir 100% de pureza em somente uma etapa de purificação, especialmente quando esta etapa é pouco específica, como a precipitação. Desta forma, embora o modelo teórico tenha determinado quais condições de clarificação levariam à quase total remoção de contaminantes com recuperação total da proteína, era esperado que tais valores não fossem atingidos. Mesmo assim, comparando os resultados da Tabela 19 com aqueles da Tabela 13, observamos que os ensaios otimizados 1 a 4 são os que melhor aliam a remoção dos contaminantes com a recuperação da PspA4Pro. Todos os ensaios otimizados tiveram recuperação superior a 95% e pureza próxima à 70% e, embora alguns ensaios do DCCR tenham atingido valores semelhantes de pureza e recuperação (Ensaio 3, 9 e 12, Tabela 13), os ensaios otimizados apresentaram remoção de ácidos nucleicos e polissacarídeos muito maior. Das 4 condições otimizadas escolhemos a condição 1 para ser aplicada a um processo de purificação completo da PspA4Pro, afim de compará-lo com o processo de purificação utilizado no laboratório até o momento, que emprega 0,1% de CTAB e 100 g/L de biomassa úmida. Escolhemos esta condição porque embora a condição 2 tenha

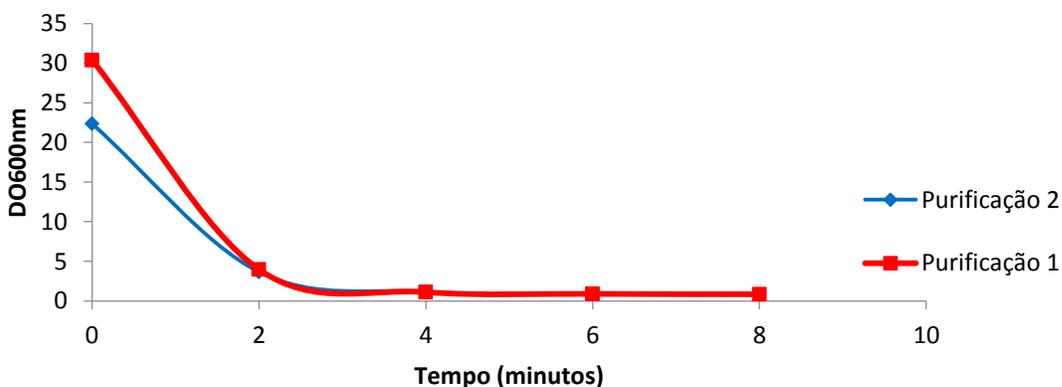
pureza e recuperação um pouco maiores, a condição 1 teve maior redução de ácidos nucleicos.

### **5.3.2. Comparação entre a purificação da PspA4Pro empregando a clarificação otimizada e a clarificação com 0,1% CTAB**

Dois processos de purificação foram comparados, no primeiro foi feita a clarificação com 100 g/L de biomassa úmida, agitação 100 rpm e 0,1% CTAB (Purificação 1), e no segundo a clarificação foi feita de acordo a condição 1 (Tabela 18), determinada como ótima pelo planejamento experimental, ou seja, concentração de biomassa úmida 23,4 g/L, agitação 175 rpm e 0,26% CTAB (Purificação 2).

Em ambos os processos de ruptura celular, a maior parte da biomassa foi rompida nos dois primeiros minutos de circulação no homogeneizador de alta pressão (Figura 31). Após 4 min praticamente não houve mais queda na DO600, indicando que o tempo de ruptura poderia ser reduzido.

Figura 31: Ruptura celular das biomassas produtoras de PspA4Pro



Era esperado que as condições de clarificação determinadas pelo modelo resultassem em maior pureza e recuperação de PspA4Pro ao final desta etapa, mas o que se observou não foi isso. Não só a clarificação da purificação 2 teve menor recuperação, 69,9% contra 100% na purificação 1, como também menor fator de purificação, 1,4 contra 1,5 (Tabelas 20 e 21). Entretanto, o menor fator de purificação pode ser explicado pela maior pureza inicial da amostra, o que é comum mesmo quando se trabalha com porções diferentes da biomassa de um mesmo cultivo. Quanto

maior a pureza inicial da amostra, menor tende a ser o aumento da pureza após uma etapa de purificação. Assim, após a clarificação da purificação 2, a pureza de PspA4Pro passou de 51,9% para 72,6% (Tabela 21), um valor elevado após apenas uma etapa de purificação e superior à pureza da fração eluída da Q-Sepharose na purificação 1, que foi de 64,5% (Tabela 20).

Tabela 20: Tabela de purificação PspA4Pro empregando a clarificação com 0,1%CTAB e 100 g/L biomassa úmida (Purificação 1)

Fração	Pureza PspA4Pro (%)	PspA4 total (g)	Recuperação geral PspA4Pro (%)	Recuperação por etapa PspA4Pro (%)	Fator de Purificação geral (Vezes)	Fator de Purificação por etapa (Vezes)
Homogenato	37,5	4,8	100,0	100,0	1,0	1,0
Clarificado CTAB 0,1%	58,1	4,8	100,0	100,0	1,5	1,5
Q300	64,5	2,9	61,1	61,1	1,7	1,1
Crio + pH4,0	97,6	2,5	52,8	86,4	2,6	1,5
SP850	98,2	1,6	34,2	64,7	2,6	1,0

Tabela 21: Tabela de purificação PspA4Pro empregando a clarificação com 0,26%CTAB e 23,4 g/L biomassa úmida (Purificação 2)

Fração	Pureza PspA4Pro (%)	PspA4 total (g)	Recuperação geral PspA4Pro (%)	Recuperação por etapa PspA4Pro (%)	Fator de Purificação geral (Vezes)	Fator de Purificação por etapa (Vezes)
Homogenato	51,9	4,7	100,0	100,0	1,0	1,0
Clarificado CTAB 0,26%	72,6	3,3	69,9	69,9	1,4	1,4
Q-Não adsorvida	78,9	3,3	69,9	100,0	1,5	1,1
Crio + pH4,0	82,6	3,2	68,5	98,0	1,6	1,1
SP850	98,4	1,3	27,7	40,4	1,9	1,2

A menor recuperação obtida na purificação 2 (Tabela 21) em relação ao experimento de validação do DCCR (ensaio 1, Tabela 19) pode ser resultado dos diferentes modos de agitação empregados. Embora tenha sido mostrado que maior agitação favoreceu a recuperação da PspA4Pro (Figura 26), não foi estudada a

influência do recipiente e do tipo de agitador. Por conta do menor volume, os testes do delineamento experimental foram realizados em erlenmeyres de 500 mL agitados em shaker, portanto com agitação orbital. Já a clarificação foi feita em uma proveta de 4 L e a suspensão agitada com uma barra magnética. O ajuste da velocidade de agitação no shaker é mais preciso do que no agitador magnético e a diferença no formato dos frascos pode ter interferido no tempo de mistura, afetando a recuperação.

Também se observou que na purificação 2 a PspA4Pro não se ligou à resina de troca aniônica, apesar do pH da solução estar acima do pI da proteína (Tabela 21, fração Q-não adsorvida). Embora a maior concentração de detergente aumente também a força iônica da solução, o que dificultaria a ligação da proteína, a amostra foi diluída, de modo a ajustar a força iônica para o mesmo valor do tampão de equilíbrio, logo este não deveria ser um fator a interferir na ligação com a resina. Uma explicação poderia ser de que as moléculas de CTAB livres, de carga positiva, tenham envolvido a PspA4Pro, com carga negativa, isolando a proteína e impedindo que ela se ligasse à resina.

Durante a crioprecipitação em pH 4,0 observou-se grande aumento da pureza na purificação 1, acompanhado de perda de cerca de 14% da PspA4Pro. Em contrapartida, a mesma etapa na purificação 2 mostrou quase 100% de recuperação, mas um fator de purificação muito menor. Novamente, isso era esperado já que a amostra foi crioprecipitada com uma pureza maior na purificação 2 e muitas das proteínas que teriam precipitado nesta etapa já haviam sido removidas durante a clarificação. Outra diferença importante é que, após a crioprecipitação, a pureza de PspA4Pro foi superior a 97% na purificação 1 (Tabela 20), enquanto na purificação 2 este valor foi de apenas 82% (Tabela 21), sendo necessária a aplicação na SP-Sephrose para atingir a pureza final desejada, que era superior a 95%, o que acarretou em perdas adicionais de PspA4Pro, levando à recuperação geral de 27,7% (Tabela 21), enquanto na purificação 1 obteve-se 34,2% (Tabela 20).

Estes resultados mostram que abordagens diferentes poderiam ser adotadas de acordo com as condições de clarificação escolhidas. Na purificação 1, a pureza desejada foi atingida antes da cromatografia de troca catiônica, indicando que esta etapa poderia ser removida do processo, o que aumentaria a recuperação de PspA4Pro para mais de 50%. Já na purificação 2, a cromatografia de troca catiônica se

mostrou necessária para atingir a pureza requerida. Contudo, neste processo a cromatografia de troca aniônica teve baixo fator de purificação e diluiu mais de quatro vezes a proteína, já que esta foi recolhida na fração não adsorvida. Como a pureza do clarificado já estava acima de 70%, a proteína poderia ser acidificada e congelada com pouca perda de PspA4Pro, observada quando a crioprecipitação em pH4,0 é feita em amostras com pureza >60% (FIGUEIREDO, 2014). Assim, um processo de purificação sem a etapa de cromatografia de troca catiônica utilizando as condições de clarificação determinadas pelo DOE poderia ser avaliado no futuro.

#### **5.4. Nanopartículas poliméricas**

##### **5.4.1. Caracterização das nanopartículas**

As nanopartículas de PGA-co-PDL produzidas pelo método de emulsão simples apresentaram tamanhos entre 449 nm e 124 nm, um pouco menores do que as nanopartículas de PLGA, que variaram entre 459 nm e 143 nm. Descontando a formulação 1, a única a produzir nanopartículas maiores do que 400 nm dos dois polímeros, os tamanhos máximos atingidos foram de 221nm e 230 nm para PGA-co-PDL e PLGA, respectivamente (Tabela 22). As partículas dos dois polímeros apresentaram carga negativa, sendo a PLGA mais negativa do que a PGA-co-PDL em todas as formulações.

Tabela 21: Características das NP obtidas pelo método de emulsão simples a partir de cada formulação produzida

Formulação	PGA-co-PDL			PLGA		
	Tamanho (nm)	Carga (mV)	PDI	Tamanho (nm)	Carga (mV)	PDI
1	449±65,8	-14,9±1,3	0,244±0,01	459±71,2	-24,4±0,7	0,249±0,02
2	140,7±6,4	-13,9±1,2	0,090±0,03	147,4±7,1	-21,9±1,0	0,094±0,02
3	210,4±18,1	-11,5±1,0	0,117±0,04	216,9±10,3	-22,8±0,4	0,105±0,03
4	130,8±5,5	-11,9±0,2	0,087±0,03	146,6±4,0	-21,5±0,9	0,09±0,02
5	207,5±48,7	-14,1±2,2	0,125±0,06	215,2±50,0	-22,9±0,5	0,130±0,06
6	218,4±18,9	-14,3±1,8	0,115±0,01	215,8±43,3	-22,6±1,0	0,113±0,01
7	148,0±5,3	-13,7±0,09	0,075±0,01	154±3,4	-23,2±0,09	0,112±0,02
8	192,9±9,4	-15,1±2,0	0,08±0,01	143,4±7,7	-23,1±0,08	0,10±0,02
9	221,8±11,0	-15,3±1,5	0,150±0,04	230±13,4	-22,0±1,4	0,159±0,05
10	124,1±6,7	-12,8±0,7	0,082±0,02	160,1±7,4	-20,9±1,1	0,09±0,01

As formulações que produziram NP < 200 nm foram aquelas que, na maior parte das vezes, apresentaram maior volume de DCM, maior concentração de PVA nas duas fases aquosas, maior amplitude do sonicador e tempo de sonicação intermediário (formulações 2, 4, 7, 8 e 10, Tabela 8). Estas NP também apresentam baixa polidispersão ( $PDI \leq 0,1$ ), indicando que as a variação entre o tamanho das NP é baixa. Estes resultados sugerem que aumentar o volume de DCM e a concentração de PVA nas duas fases aquosas leva à formação de NP menores. Contrastando com isso, a formulação 1, a única que produziu partículas > 400 nm, foi aquela que combinou os menores valores para de DCM (2 mL) e PVA (5 mL para PGA-co-PDL e 3 mL para PLGA). Aumentar a amplitude do sonicador e sonicar as partículas por até 2 min também parece favorecer a produção de NP menores. As diferenças nas formulações não causaram alterações radicais na carga das NP, e observou-se que, na maioria dos casos, NP de PLGA foram um pouco maiores do que as de PGA-co-PDL para as mesmas formulações, além de serem mais negativas. Dentre as formulações avaliadas, aquelas que resultaram nas menores NP foram escolhidas para a produção das NP carregando PspA4Pro, ou seja, a formulação 10 (DCM 2 mL, PVA10% 5 mL, amplitude 65%, tempo de sonicação 120 s e PVA 0,75%) para PGA-co-PDL e

formulação 8 (DCM 2 mL, PVA 10% 3 mL, amplitude 65%, tempo de sonicação 120 s e PVA 0,50%) para PLGA.

O tamanho, carga e PDI das NP produzidas por emulsão dupla foram de  $205,6 \pm 4,0$  nm,  $-15,3 \pm 1,2$  mV e  $0,134 \pm 0,04$  para NP de PGA-co-PDL e  $220,3 \pm 6,5$  nm,  $-22,1 \pm 0,3$  mV e  $0,1 \pm 0,03$  para as NP de PLGA. Embora maiores do que as partículas produzidas via emulsão simples, estas partículas ainda estão na faixa de tamanho favorável à captação pelas células dendríticas.

Determinadas as formulações das partículas para ambos os polímeros, diversos lotes de NP foram produzidos, por emulsão simples, para os experimentos de incorporação de cloridrato de quitosana (HCl-CS) ou carboximetil quitosana (CM-CS). Diferentes concentrações de quitosana foram testadas e as características das NP obtidas são apresentadas nas Tabelas 23 e 24.

Tabela 22: Características das NP produzidas por emulsão simples com diferentes concentrações de HCl-CS

Concentração (mg/mL)	PGA-co-PDL			PLGA		
	Tamanho (nm)	Carga (mV)	PDI	Tamanho (nm)	Carga (mV)	PDI
0,2	$171,1 \pm 1,0$	$11,6 \pm 0,3$	$0,07 \pm 0,01$	$182,1 \pm 1,3$	$13,6 \pm 0,2$	$0,06 \pm 0,01$
0,5	$217,03 \pm 2,5$	$15,6 \pm 0,5$	$0,08 \pm 0,02$	$152,2 \pm 3,5$	$16,6 \pm 0,5$	$0,08 \pm 0,03$
1	$149,9 \pm 1,2$	$15,5 \pm 0,6$	$0,07 \pm 0,04$	$141,6 \pm 1,5$	$19,6 \pm 0,4$	$0,07 \pm 0,03$
2	$148,1 \pm 2,8$	$18,2 \pm 0,8$	$0,08 \pm 0,02$	$152,1 \pm 3,0$	$18,8 \pm 0,6$	$0,09 \pm 0,02$
4	$184,9 \pm 6,0$	$18,1 \pm 0,1$	$0,09 \pm 0,01$	$190,9 \pm 5,2$	$17,1 \pm 0,1$	$0,09 \pm 0,01$
6	$180,1 \pm 1,2$	$14,8 \pm 0,4$	$0,07 \pm 0,02$	$201,1 \pm 2,0$	$12,8 \pm 0,7$	$0,08 \pm 0,05$
8	$256,5 \pm 3,1$	$13,4 \pm 0,9$	$0,08 \pm 0,03$	$267,1 \pm 6,1$	$12,2 \pm 1,0$	$0,08 \pm 0,03$

Tabela 23: Características das NP produzidas por emulsão simples com diferentes concentrações de CM-CS

Concentração (mg/mL)	Tamanho (nm)	PGA-co-PDL		PLGA		
		Carga (mV)	PDI	Tamanho (nm)	Carga (mV)	PDI
0,2	126,6±0,8	-25,2±0,1	0,09±0,01	139,2±1,3	-30,3±0,3	0,06±0,08
0,5	125,1±1,2	-25,6±0,3	0,07±0,03	137,1±0,9	-32,2±0,8	0,08±0,02
1	121,7±1,0	-26,6±0,6	0,07±0,03	150,5±2,1	-31,1±0,7	0,07±0,04
2	179,8±0,3	25,1±1,3	0,08±0,04	198,2±1,5	-34,3±0,9	0,09±0,01
4	303,1±1,1	-38,5±1,4	0,13±0,03	311,8±3,6	-40,5±1,0	0,11±0,01
6	349,5±3,3	-41,7±0,5	0,12±0,01	357,3±6,6	-47,8±0,6	0,10±0,09
8	344,9±2,4	-42,5±0,3	0,12±0,04	366,9±10,1	-48,1±0,4	0,11±0,09

Ainda buscando obter as partículas com menor tamanho, as concentrações de quitosana escolhidas para NP de PGA-co-PDL foram: HCl-CS: 1,0 mg/mL e CM-CS: 1,0 mg/mL. Para NP de PLGA as concentrações escolhidas foram: HCl-CS: 1,0 mg/mL e CM-CS: 0,5 mg/mL. Observou-se que as partículas de HCl-CS mudaram a carga das NP de negativa para positiva, enquanto as partículas de CM-CS tornaram as partículas ainda mais negativas. Os efeitos desta mudança na carga foram bem observados na ligação e liberação das PspA4Pro às NP, como se mostrará adiante. As mesmas concentrações de quitosana foram incorporadas nas NP produzidas por emulsão dupla. As características destas partículas são apresentadas na Tabela 25.

Tabela 24: Características das NP produzidas por emulsão dupla quando HCl-CS e CM-CS são adicionadas às formulações

PGA-co-PDL			PLGA		
HCl-CS (1,0 mg/mL)			HCl-CS (1,0 mg/mL)		
Tamanho (nm)	Carga (mV)	PDI	Tamanho (nm)	Carga (mV)	PDI
291,0±9,2	17,4±1,0	0,09±0,04	310,2±600	13,2±0,8	0,1±0,03
CM-CS (1 mg/mL)			CM-CS (0,5 mg/mL)		
Tamanho (nm)	Carga (mV)	PDI	Tamanho (nm)	Carga (mV)	PDI
280,5±8,8	-20,1±1,5	0,13±0,02	299,4±7,1	-40,5±0,9	0,9±0,07

Observou-se aumento significativo no tamanho das NP após a adição de ambos os tipos de quitosana, mas não foram feitos novos experimentos para determinar se diferentes concentrações de quitosana poderiam reduzir o tamanho das NP. Como todas as partículas apresentaram tamanho < 500nm, prosseguiu-se para a ligação da PspA4Pro das NP.

#### **5.4.2. Ligação da PspA4Pro às NP**

Duas estratégias para a ligação da PspA4Pro às NP foram utilizadas. A primeira foi a adsorção da proteína na superfície das partículas. Enquanto a segunda foi o encapsulamento da proteína no interior das NP. A adsorção foi testada nas NP produzidas por emulsão simples, enquanto o encapsulamento foi utilizado para as partículas produzidas por emulsão dupla. Estes dois métodos, combinados com a ausência, ou presença, de quitosana, levaram a variações na capacidade da proteína se ligar às NP, como pode ser observado na Tabela 26.

Tabela 25: Adsorção e encapsulamento da PspA4Pro nas NP

PGA-co-PDL – Adsorção		
Formulação	PspA( $\mu$ g)/NP(mg)	Eficiência da ligação (%)*
NP sem quitosana pH 7,0	25,57 $\pm$ 8,13	63,94 $\pm$ 20,33
NP sem quitosana pH 4,0	9,31 $\pm$ 4,34	23,26 $\pm$ 10,85
NP HCl-CS pH 7,0	36,49 $\pm$ 1,15	91,23 $\pm$ 2,87
NP CM-CS pH 7,0	15,41 $\pm$ 2,48	38,52 $\pm$ 6,21
NP CM-CS pH 4,0	11,39 $\pm$ 4,13	28,49 $\pm$ 10,33
PLGA – Adsorção		
Formulação	PspA( $\mu$ g)/NP(mg)	Eficiência da ligação (%)
NP sem quitosana pH 7,0	8,24 $\pm$ 6,28	20,60 $\pm$ 15,7
NP sem quitosana pH 4,0	36,28 $\pm$ 0,23	90,69 $\pm$ 0,57
NP HCl-CS pH 7,0	37,59 $\pm$ 1,94	93,97 $\pm$ 4,84
NP CM-CS pH 7,0	10,55 $\pm$ 5,10	26,40 $\pm$ 12,62
NP CM-CS pH 4,0	29,62 $\pm$ 7,80	74,04 $\pm$ 19,48
PGA-co-PDL – Encapsulamento		
Formulação	PspA( $\mu$ g)/NP(mg)	Eficiência da ligação (%)
NP sem quitosada pH7,0	4,14 $\pm$ 0,22	2,07 $\pm$ 0,80
NP HCl-CS pH7,0	22,88 $\pm$ 2,65	11,44 $\pm$ 6,62
NP CM-CS pH7,0	7,86 $\pm$ 1,83	3,93 $\pm$ 6,71
PLGA – Encapsulamento		
Formulação	PspA( $\mu$ g)/NP(mg)	Eficiência da ligação (%)
NP sem quitosada pH7,0	29,57 $\pm$ 4,9	14,78 $\pm$ 7,36
NP HCl-CS pH7,0	59,33 $\pm$ 1,32	29,66 $\pm$ 4,65
NP CM-CS pH7,0	11,88 $\pm$ 4,15	5,94 $\pm$ 1,7

NP: nanopartícula, HCl-CS: cloridrato de quitosana, CM-CS: carboximetil quitosana, eficiência de ligação calculada de acordo com a Eq. 1

Inicialmente todos os experimentos de adsorção da PspA4Pro foram realizados em pH 7,0. Nesta condição observou-se que a adsorção da PspA4Pro nas partículas com HCl-CS foi muito superior à das demais partículas. Atribuiu-se isso ao fato de esta ser a única formulação com carga positiva, uma vez que, em pH 7,0, a PspA4Pro possui carga negativa ( $pI=4,8$ ), levando à interação iônica entre ambas. No caso das NP sem quitosana e com CM-CS, as principais forças de interação com a proteína seriam interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio. Desta forma, decidiu-se repetir

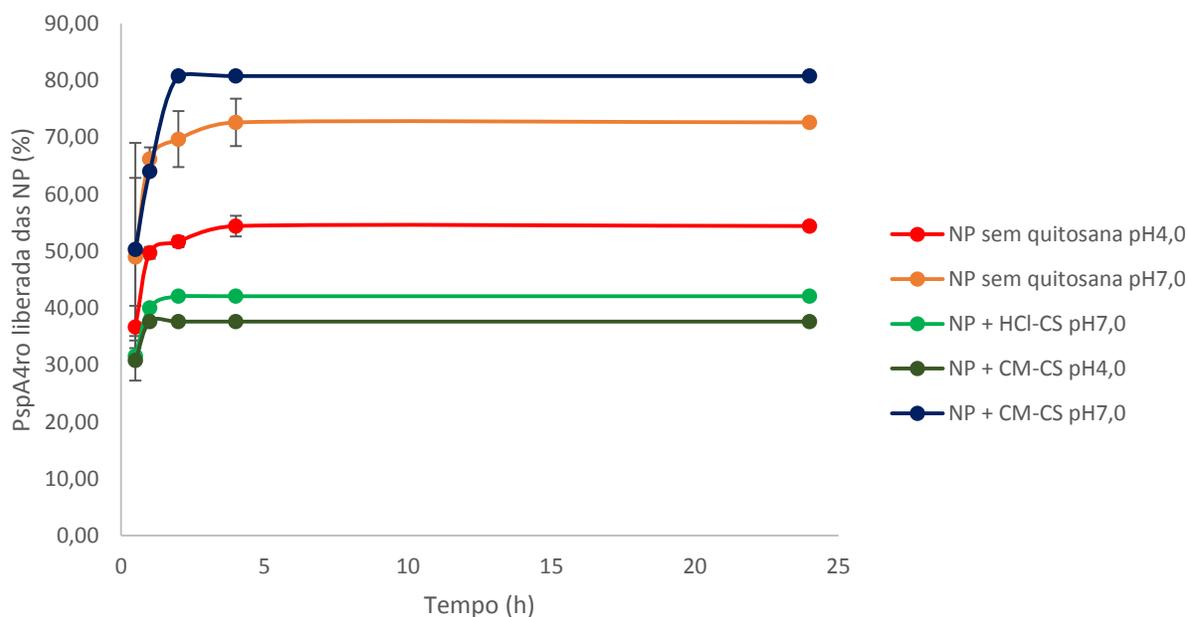
a adsorção nas NP sem quitosana e com CM-CS em pH 4,0, pH no qual a PspA4Pro tem carga positiva, enquanto as NP formuladas têm carga negativa. Em pH 4,0 a adsorção foi favorecida apenas nas formulações com PLGA, aumentando mais de 4x nas NP sem quitosana e quase 3x nas NP com CM-CS. Ao contrário do esperado, nas NP formuladas com PGA-co-PDL a adsorção de PspA4Pro foi menor em pH 4,0 do que em pH 7,0. Experimentos anteriores realizados em nosso laboratório (FIGUEIREDO *et al.*, 2017) mostraram, através do dicroísmo circular de PspA4Pro purificada, que esta proteína perde parte da sua estrutura terciária em pH 4,0, o que poderia então estar relacionado à menor adsorção em PGA-co-PDL. Embora a PspA4Pro volte a estrutura nativa com o aumento do pH, é possível que esta perda, nas condições de adsorção testadas, desfavoreça a ligação da proteína nas NP de PGA-co-PDL. Se este for o caso, o tamanho maior das NP de PLGA e o fato de serem mais negativas favoreceriam a ligação com a proteína, o que poderia compensar a perda de estrutura da PspA4Pro

Não foi testado o encapsulamento em pH ácido, pois como o encapsulamento ocorre durante a formação das NP, a mudança de pH poderia afetar ou até impedir a formação das partículas. Observou-se que o encapsulamento foi menos eficiente do que a adsorção em todas as formulações. Determinadas as condições de ligação da PspA4Pro às NP, ou seja, adsorção em pH 7,0 para PGA-co-PDL sem quitosana e PGA-co-PDL CM-CS, adsorção em pH 4,0 para PLGA sem quitosana e PLGA CM-CS e adsorção em pH 7,0 para PGA-co-PDL HCl-CS e PLGA HCl-CS, as NP passaram a ser caracterizadas quanto à liberação de PspA4Pro.

#### **5.4.3. Caracterização da PspA4Pro liberada das NP**

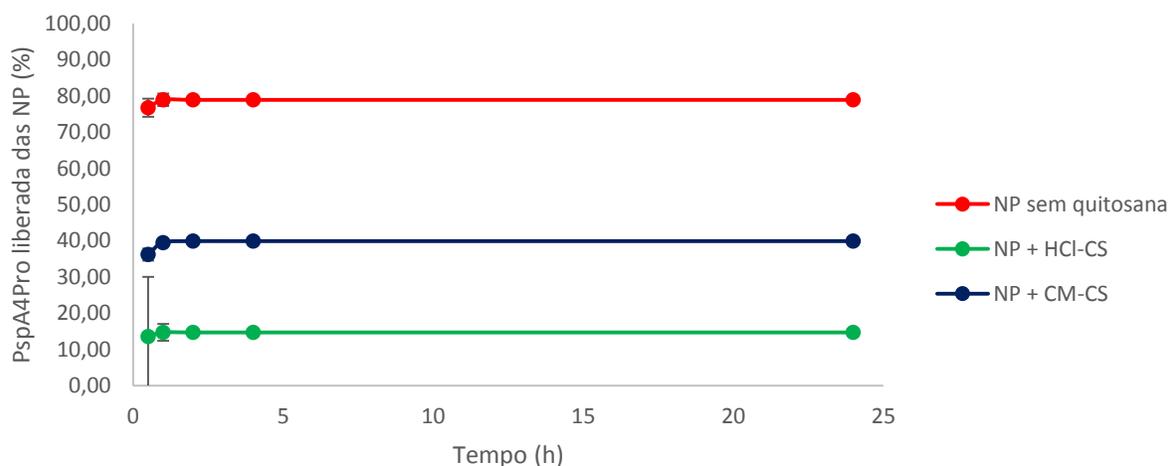
As formulações de PGA-co-PDL onde a PspA4Pro foi adsorvida com carga oposta à da NP, ou seja, à pH 4,0 para CM-CS e sem quitosana e pH 7,0 para HCl-CS, foram aquelas onde ocorreu menor liberação de proteína em 24 h ( $\leq 50\%$ ), enquanto nas formulações onde proteína e NP tinham as mesmas cargas (pH 7,0 para CM-CS e sem quitosana) a liberação variou entre 70% e 80% da PspA4Pro durante 24 h. Em todas as formulações a maior parte da liberação de PspA4Pro ocorreu rapidamente, atingindo um platô após 2 h do início do experimento (Figura 32).

Figura 32: Liberação da PspA4Pro adsorvida nas NP de PGA-co-PDL durante 24 h



No caso das formulações encapsuladas, menos de 15% da PspA4Pro foi liberada das partículas de PGA-co-PDL com HCl-CS durante o ensaio, enquanto as partículas com CM-CS liberaram 40% e as sem quitosana 80% (Figura 33). Diferente das proteínas adsorvidas, as proteínas encapsuladas não estão em contato direto com o tampão e sua liberação depende da degradação das NP. Assim, a menor liberação de PspA4Pro das partículas com quitosana pode sugerir que a presença desta contribui para a manutenção da integridade das NP. Assim como nas partículas com PspA4Pro adsorvida, toda a liberação das NP com PspA4Pro encapsulada ocorreu nas primeiras horas do ensaio. Como dito anteriormente, a internalização de partículas pelas células dendríticas ocorre rapidamente. Isso significa que a administração de uma vacina sem quitosana levaria à internalização principalmente de PspA4Pro livre e de partículas degradadas, o que poderia comprometer sua ação adjuvante. Já uma vacina de NP com quitosana seria internalizada íntegra pelas células dendríticas.

Figura 33: Liberação da PspA4Pro encapsulada nas NP de PGA-co-PDL durante 24 h



Tal qual nas NP de PGA-co-PDL, a liberação de PspA4Pro das NP de PLGA ocorreu nas primeiras horas do ensaio. As NP com HCl-CS e sem quitosana formuladas a pH 4,0 com PspA4Pro adsorvida liberaram respectivamente 100% e 90% da proteína após 1 h (Figura 34). A liberação da proteína das NP com CM-CS foi particularmente baixa, atingindo apenas 31% para PspA4Pro adsorvida em pH 4,0, 4,9% para a adsorvida em pH 7,0 e 1,37% para a encapsulada. Nenhuma formulação de PLGA com PspA4Pro encapsulada apresentou liberação superior a 10% (Figura 35).

Figura 34: Liberação da PspA4Pro adsorvida nas NP de PLGA durante 24 h

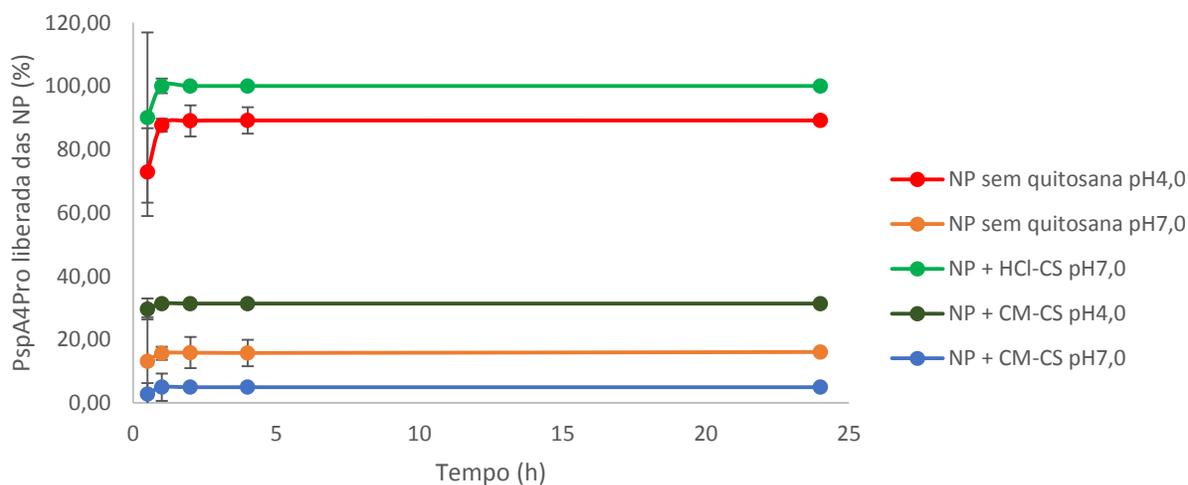
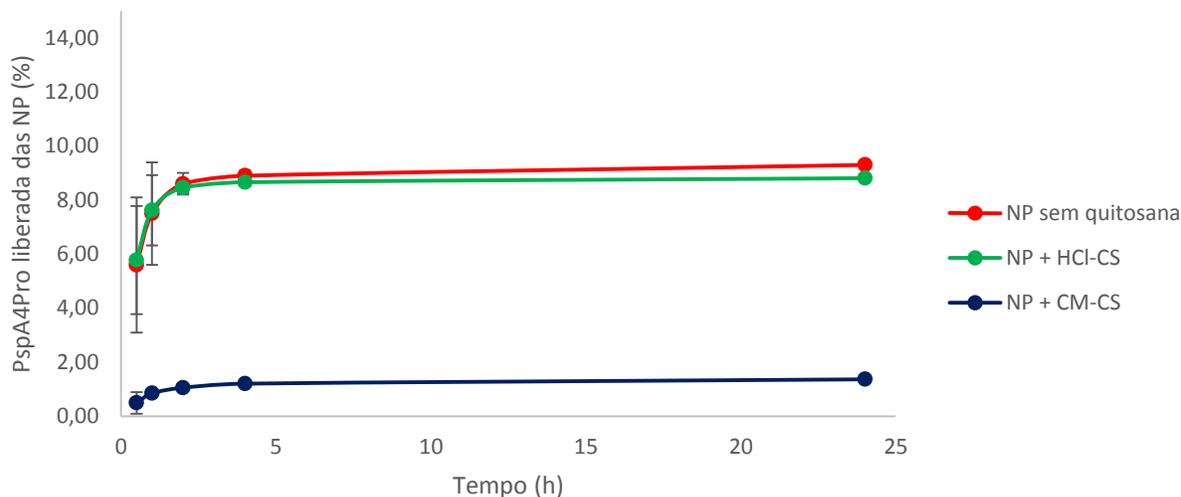


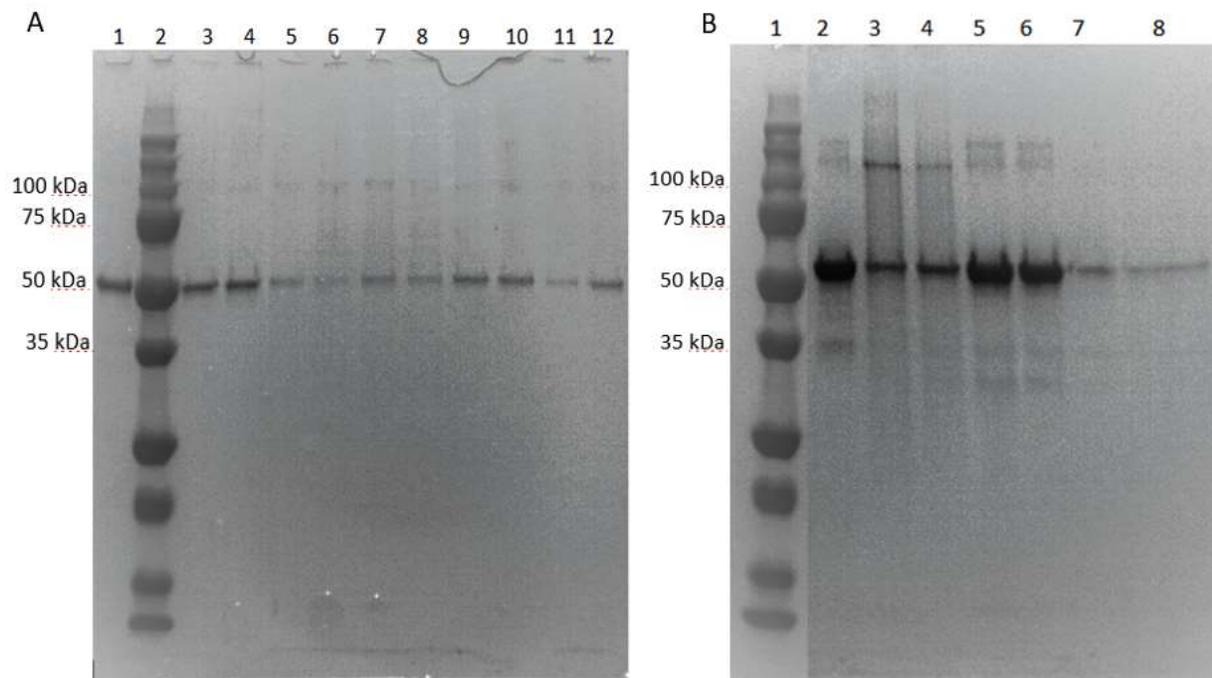
Figura 35: Liberação da PspA4Pro encapsuladas nas NP de PLGA durante 24 h



#### 5.4.4. Integridade da PspA4Pro liberada das NP

Em todas as amostras de PspA4Pro liberada das NP é possível observar uma banda no SDS-PAGE com o mesmo tamanho da PspA4Pro controle (Figura 36). Não foi observada degradação da proteína, que seria caracterizada pela presença de bandas de menor massa molecular ou, em caso de total degradação, pela ausência da banda da PspA4Pro. Podem ser observadas bandas acima da PspA4Pro em ambas formulações, tanto com proteína adsorvida como encapsulada, de forma mais pronunciada nas amostras provenientes das partículas com CM-CS e PspA4Pro encapsulada (Figura 36B, canaletas 3 e 4). Estas bandas, com aproximadamente 100 kDa poderiam decorrer da formação de dímeros da proteína. A presença em todas as amostras de uma banda de mesmo tamanho que a do controle positivo de PspA4Pro demonstra que a ligação desta proteína às NP, nas condições descritas, não comprometeu a integridade da proteína. Isso é especialmente importante para as NP onde a PspA4Pro foi encapsulada, pois neste caso ela esteve em contato direto com o solvente orgânico, DCM, durante mais tempo, o que poderia comprometer sua integridade. Resultados semelhantes aos da Figura 36 foram observados nas amostras de PspA4Pro liberada das NP de PLGA, tanto para a proteína adsorvida como para a encapsulada.

Figura 36: SDS-PAGE 12% da PspA4Pro liberada das NP de PGA-co-PDL. A) PspA4Pro adsorvida. 1: PspA4pro controle; 2: Padrão de peso molecular; 3 e 4: NP com HCl-CS pH 7,0; 5 e 6: NP com CM-CS pH 4,0; 7 e 8: NP com CMC-CS pH 7,0; 9 e 10: NP sem quitosana pH 7,0; 11 e 12: NP sem quitosana pH 7,0. B) PspA4Pro encapsulada. 1: Padrão de peso molecular; 2: PspA4Pro controle; 3 e 4: NP com CM-CS; 5 e 6: NP com HCl-CS; 7 e 8: NP sem quitosana



#### 5.4.5. Reconhecimento da proteína liberada das NP por anticorpos anti-PspA4Pro

Epítomos bem conservados se ligam avidamente aos anticorpos, o que, na reação de ELISA, resulta em elevada absorvância. Por isso, amostras onde a proteína conservou seus epítomos podem ser diluídas extensivamente e continuar com absorvância maior do que a do branco no ELISA. A PspA4Pro liberada das NP de PGA-co-PDL (Figura 37) e PLGA (Figura 38), sem quitosana e com HCl-CS foi capaz de se ligar aos anticorpos monoclonais anti-PspA4Pro de forma muito semelhante à PspA4Pro controle, indicando manutenção de epítomos importantes nas proteínas liberadas das NP. Já no caso da PspA4Pro liberada das NP com CM-CS foi observada uma queda significativa na capacidade ligação ao anticorpo anti-PspA4Pro. Assim, se considerarmos a maior diluição detectável de anticorpo aquela onde a  $Abs_{504nm}=0,1$ , a PspA4Pro liberada de todas as amostras sem quitosana, com HCl-CS e o controle foi

detectada com diluição >64000, enquanto nenhuma proteína proveniente de NP com CM-CS foi detectada em diluições superiores à 8000 (Figura 37 e 38).

Figura 37: Reconhecimento da PspA4Pro liberada das NP de PGA-co-PDL com proteínas adsorvidas (A) e encapsuladas (B) por anticorpos anti-PspA4Pro

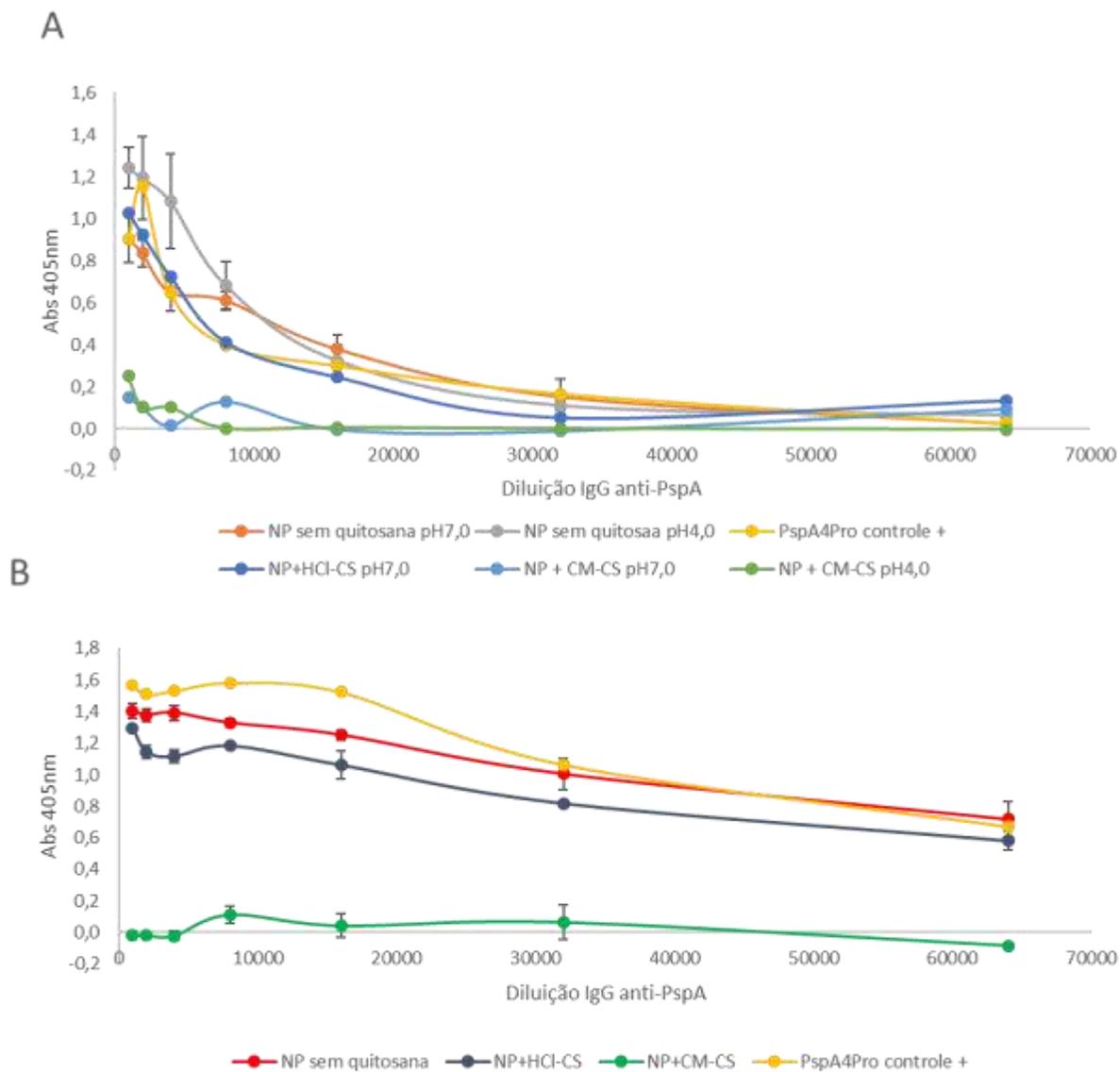
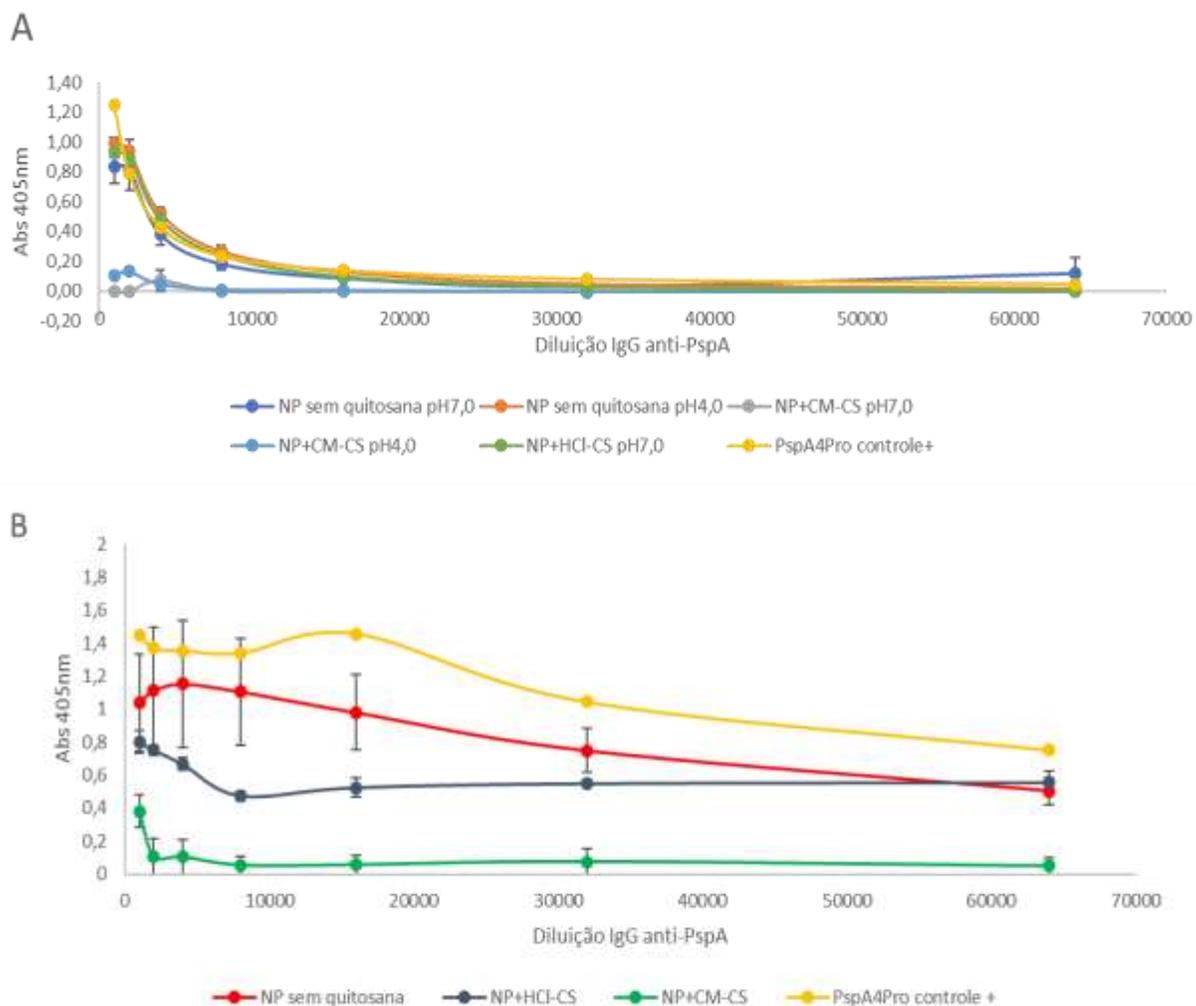


Figura 38: Reconhecimento da PspA4Pro liberada das NP de PLGA com proteínas adsorvidas (A) e encapsuladas (B) por anticorpos anti-PspA4Pro



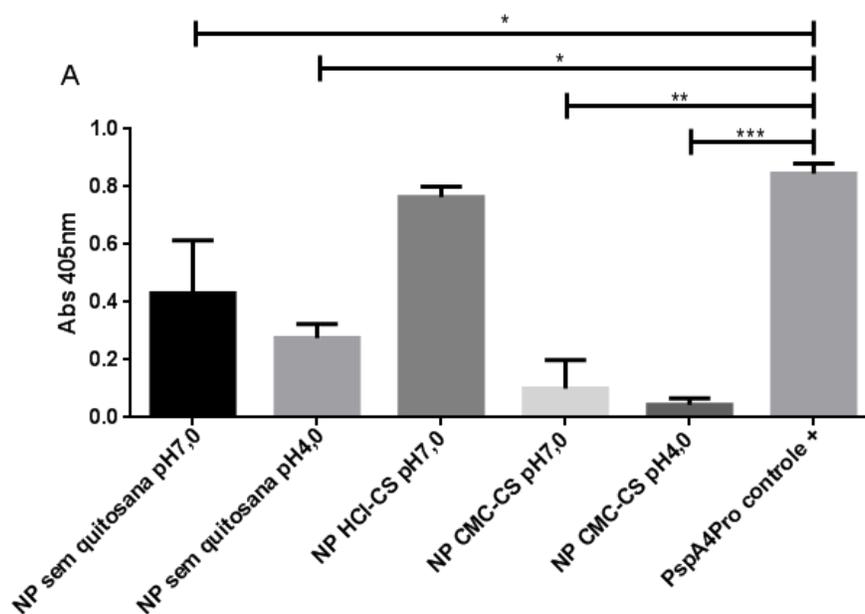
#### 5.4.6. Atividade biológica

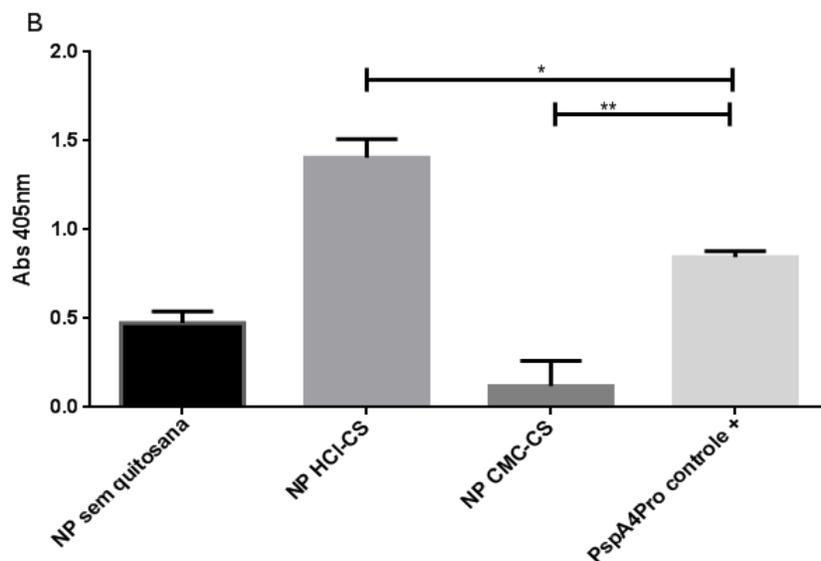
Os resultados do ensaio de ligação da PspA4Pro à lactoferrina humana mostraram que nas NP de PGA-co-PDL sem quitosana observou-se redução entre 35% e 50% na ligação à lactoferrina (Figura 39) e nas NP de PLGA sem quitosana observou-se redução entre 50% e 70% (Figura 40). Embora este experimento tenha mostrado que as proteínas liberadas das NP com CM-CS tenham perdido entre 80% e 99% da sua capacidade de se ligar à lactoferrina humana (Figuras 40 e 41), é importante observar que este ensaio foi feito com o mesmo anticorpo monoclonal que o ELISA. Portanto, a baixa ligação à lactoferrina observada poderia ser decorrente do

fato de o anticorpo não ter sido capaz de reconhecer a PspA4Pro liberada das NP formuladas com CM-CS, mesmo que esta estivesse ligada à lactoferrina da placa. Por outro lado, o ensaio realizado mostrou retenção total da atividade biológica da PspA4Pro liberada das NP com HCl-CS e parcial das NP sem quitosana (Figura 39e 40).

No corpo humano, a lactoferrina é uma defesa importante contra a invasão pelo pneumococo, pois sequestra íons ferro necessários para o crescimento bacteriano. A capacidade da PspA ligar-se à lactoferrina humana é uma forma de defesa importante do microrganismo, pois a lactoferrina ligada à PspA é incapaz de se ligar aos íons ferro, que permanecem disponíveis para a bactéria. O fato da pspA4Pro liberada das nanopartículas continuar sendo capaz de se ligar à lactoferrina humana indica manutenção da estrutura secundária da proteína, que é importante para gerar anticorpos capazes de reconhecer as PspA do pneumococo.

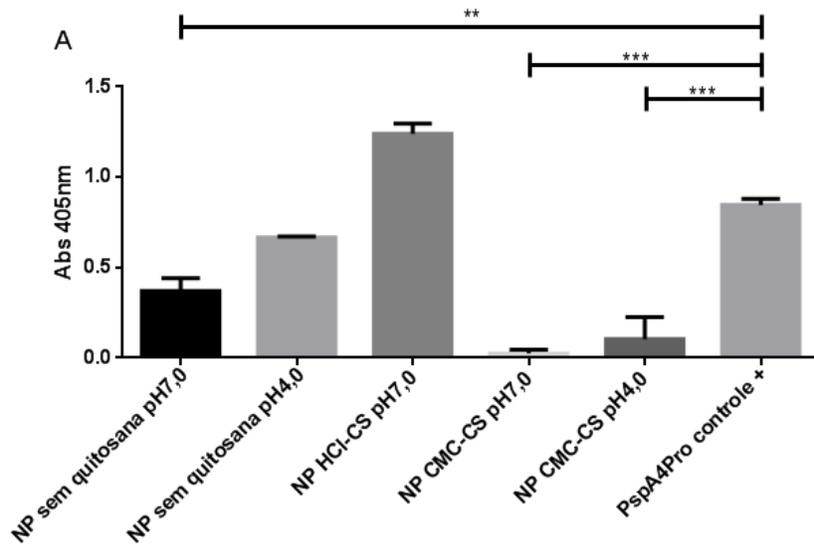
Figura 39: Ensaio de ligação à lactoferrina da PspA4Pro liberada das NP de PGA-co-PDL com proteína adsorvida (A) ou encapsulada (B)

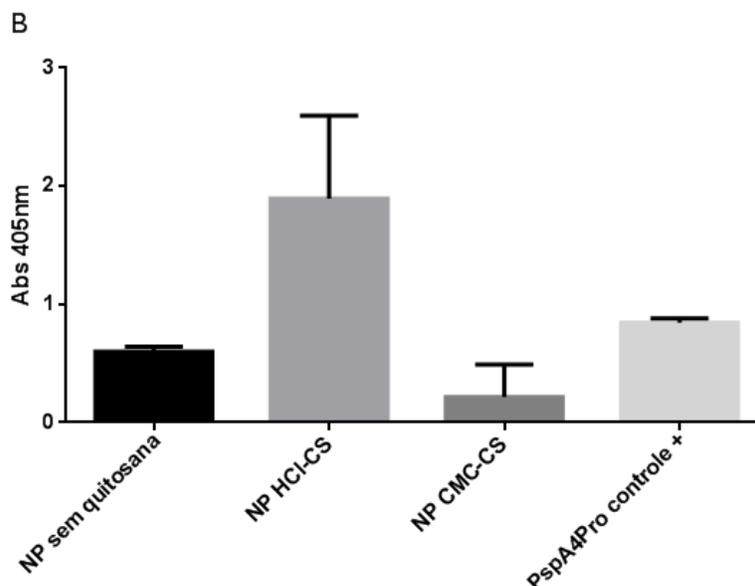




Análise estatística ANOVA , \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

Figura 40: Ensaio de ligação à lactoferrina da PspA4Pro liberada das NP de PLGA com proteína adsorvida (A) ou encapsulada (B)





Análise estatística ANOVA , \* p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001

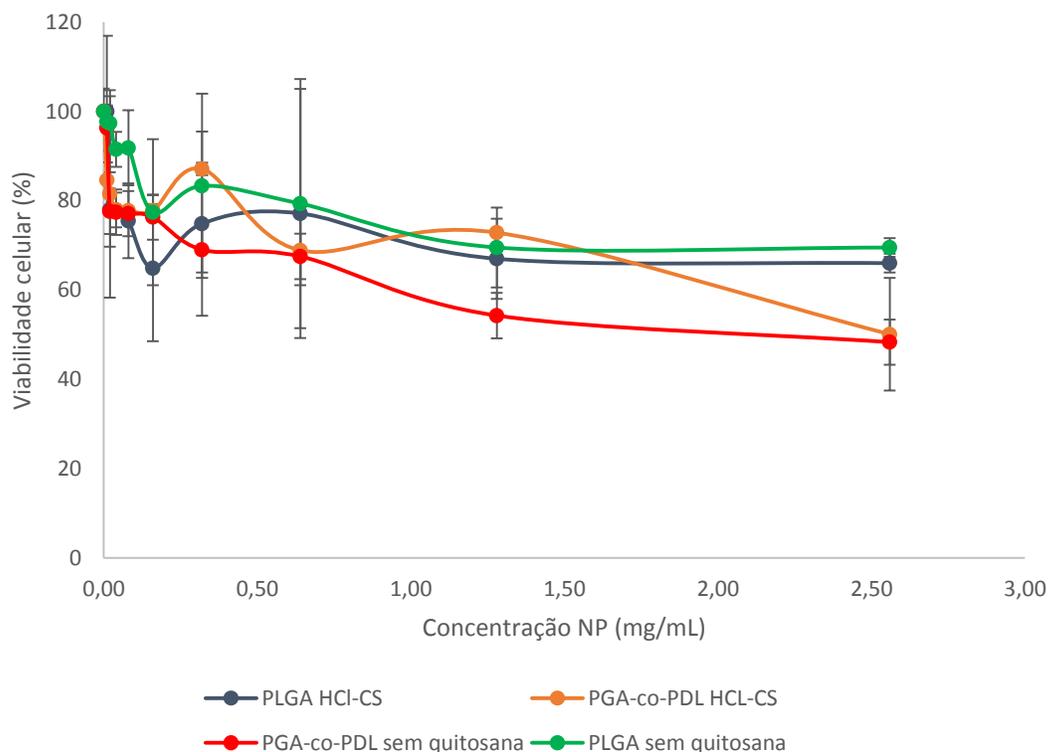
Os ensaios de ligação a anticorpos anti-PspA4Pro e de atividade biológica mostraram que as proteínas liberadas das NP sem quitosana e com HCl-CS conservaram epítomos importantes, além do sítio de ligação à lactoferrina, indicando que não houve comprometimento da estrutura da proteína. O mesmo não pode ser dito da PspA4Pro liberada das NP com CM-CS. Foi observado que a incorporação da CM-CS às NP reduziu a carga das NP, tornando-as ainda mais negativas do que aquelas sem quitosana. Uma vez que o *pI* da PspA4Pro é igual a 4,8, esta proteína possui carga negativa em pH 7,0, que foi o pH do tampão no ensaio de liberação da PspA4Pro. Nestas condições espera-se uma maior repulsão entre a proteína e a partícula com CM-CS do que entre a proteína e partícula sem quitosana. Esta repulsão poderia levar à agregação da PspA4Pro, o que poderia explicar a presença de uma banda próxima a 100 kDa observada das amostras de PGA-co-PDL+CM-CS com PspA4Pro encapsulada (Figura 36B), e à perda de estrutura da proteína. Por conta dos resultados do ELISA e da ligação à lactoferrina, decidiu-se abandonar as formulações com CM-CS. Assim, os ensaios de toxicidade, *spray-dry* e outros experimentos foram feitos somente com as formulações sem quitosana e com HCl-CS.

### 5.4.7. Toxicidade das NP

A toxicidade das partículas de PGA-co-PDL e de PLGA, ambas com e sem HCl-CS, foi determinada através do ensaio de captação de corante brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT), que mede a atividade mitocondrial de células viáveis através da metabolização de sais de tetrazólio (ABREU 2008).

O ensaio mostrou aumento da morte celular com o aumento da concentração de NP (Figura 41). As NP de PGA-co-PDL se mostraram mais tóxicas do que as de PLGA em concentrações superiores a 1,2 mg/mL, e não houve diferença significativa entre a toxicidade das NP contendo HCl-CS e NP sem quitosana (Figura 41).

Figura 41: Viabilidade de células dendríticas JAWS II na presença de concentrações crescentes de NP de PLGA e de PGA-co-PDL



### 5.4.8. Produção das NCMP e ensaio de aerolização

Partículas menores do que 1  $\mu\text{m}$  tendem a ser exaladas e dificilmente chegam à região alveolar, por isso a técnica de *spray-dry* foi empregada para envolver as NP em micropartículas de L-leucina capazes de chegar às vias respiratórias e à periferia dos

pulmões, onde as NP devem ser liberadas. A Tabela 27 abaixo apresenta a recuperação do processo de *spray-dry*. Além das formulações definidas pelos experimentos anteriores, foram produzidas NP sem PspA4Pro (chamadas de vazias) que servirão de controle negativo para os experimentos de imunização em animais.

Tabela 26: Recuperação das NCMP produzidas por *spray-dry*

Formulação	Recuperação (%)
PGA-co-PDL sem quitosana (Vazia)	40,9
PGA-co-PDL + HCl-CS (Vazia)	86,4
PLGA sem quitosana (Vazia)	46,5
PLGA + HCl-CS (Vazia)	80,9
PGA-co-PDL sem quitosana (PspA4Pro adsorvida)	39,3
PGA-co-PDL + HCl-CS (PspA4Pro adsorvida)	53,0
PLGA sem quitosana (PspA4Pro adsorvida)	64,5
PLGA + HCl-CS (PspA4Pro adsorvida)	59,4
PGA-co-PDL sem quitosana (PspA4Pro encapsulada)	33,6
PGA-co-PDL + HCl-CS (PspA4Pro encapsulada)	50,3
PLGA sem quitosana (PspA4Pro encapsulada)	84,3
PLGA + HCl-CS (PspA4Pro encapsulada)	71,9

Todas as formulações contendo HCl-CS tiveram recuperação superior a 50%, enquanto, com exceção da PLGA sem quitosana e PspA4Pro encapsulada, as formulações sem quitosana tiveram recuperação entre 30% e 40%. Após cada *spray dry*, foi observada a deposição de MCMP na saída do equipamento, após nebulizador. Não foi possível recuperar estas partículas, o que explica a baixa recuperação de algumas das formulações.

O ensaio de aerolização *in vitro* das NCMP permitiu calcular a porcentagem de deposição das micropartículas (PDM), a fração de partículas finas (FPF) e o diâmetro mediano aerodinâmico de massa (DMAM), parâmetros que nos permitem determinar em que região das vias respiratórias as NCMP se depositariam. Para a deposição nos pulmões é ideal que o DMAM seja superior a 1,0  $\mu\text{m}$ . Isso significa que, das formulações testadas, é esperado que haja alguma perda no ar exalado de micropartículas contendo NP de PGA-co-PDL e PLGA com HCl-CS (Tabela 28). Como

este parâmetro representa um valor médio, ainda deve ocorrer deposição destas partículas nos pulmões.

A quantidade de NCMP aplicada ao impactador foi de 40 mg, desse montante, somente entre 27,55% e 48,75% atingiu os estágios 1 a 8 do impactador (FPF, Tabela 27 e Figura 42e 43), portanto a maior parte das NCMP ficou no inalador, ou seja, nas vias aéreas superiores. Da fração que atingiu o impactador, de 8,9  $\mu\text{g}$  a 15,75  $\mu\text{g}$  se depositaram nos estágios 2 a 7 (PDM, Tabela 28) e a maior quantidade se depositou no último estágio (Figura 42e 43), demonstrando que as NCMP produzidas devem ser capazes de atingir a região bronco-alveolar, entregando as NP na região desejada.

Tabela 27: Aerolização in vitro das NCMP

Formulação	PDM ( $\mu\text{g}$ )	FPF %	DMAM ( $\mu\text{m}$ )
PGA-co-PDL sem quitosana	14,42	43,21	1,48
PGA-co-PDL HCl-CS	8,9	27,55	0,81
PLGA sem quitosana	12,1	36,26	2,23
PLGA HCl-CS	15,75	48,75	1,00

PDM: porcentagem de deposição das micropartículas; FPF: fração de partículas finas; DMAM: diâmetro mediano aerodinâmico de massa

Figura 42: Deposição das NCMP de PGA-co-PDL nas placas do NGI. A) PGA-co-PDL sem quitosana, B) PGA-co-PDL HCl-CS

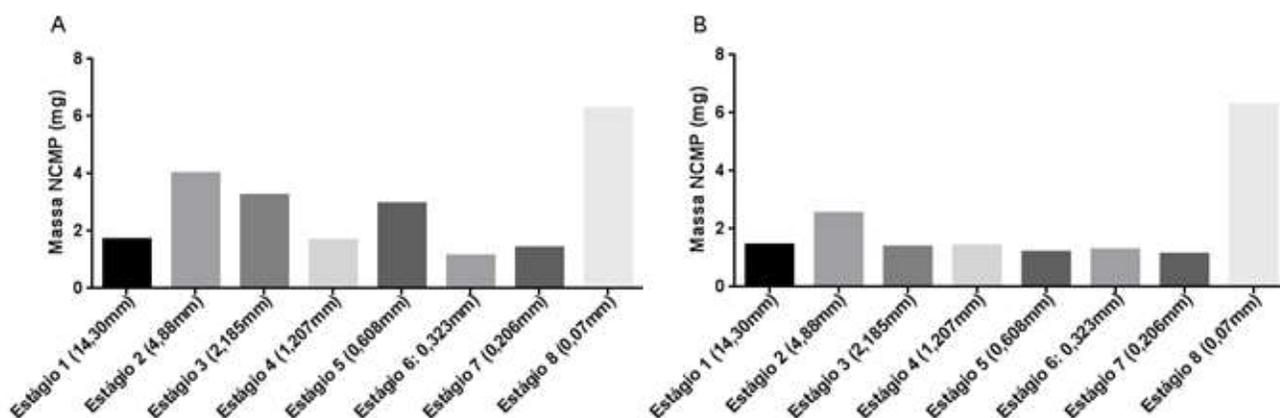
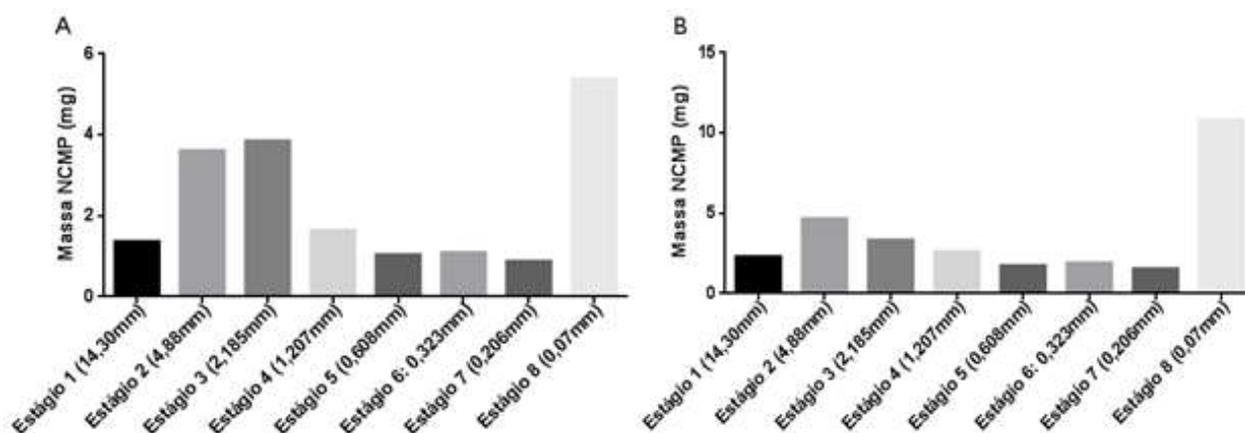


Figura 43: Deposição das NCMP de PLGA nas placas do NGI. A) PLGA sem quitosana, B) PLGA HCl-CS



Desta forma, os lotes de NCMP foram produzidos. Estas NCMP foram armazenadas em tubos de 50 mL e trazidas para o Instituto Butantan, onde testes *in vitro* e *in vivo* foram realizados para verificar seu potencial como vacina pneumocócica pulmonar em modelos animais.

#### 5.4.9. Ativação de células dendríticas

Células dendríticas (DC) são linfócitos derivados da medula óssea e o tipo mais potente de célula apresentadora de antígeno, que captura e processa antígenos para serem apresentados para células T. A capacidade das NP de serem capturadas e ativar as DC se relaciona diretamente ao seu potencial como vacina, e por isso foi realizado o ensaio de ativação de DC com as NCMP produzidas com a finalidade de selecionar quais formulações seriam avaliadas nos experimentos em animais.

Foram diferenciadas DC de 6 camundongos e a ativação das células foi avaliada por citometria de fluxo. Os marcadores utilizados para verificar a ativação das DC foram CD40, CD80, CD86 e I $\alpha$ e. O CD40 é um marcador de superfície pertencente à família dos receptores do fator de necrose tumoral (TNF-R). As células dendríticas, ao interagirem com linfócitos T por intermédio dos marcadores CD40 e CD40L sofrem um processo de maturação que leva ao aumento da expressão de moléculas MHC classe II e de moléculas de superfície coestimuladoras CD80 e CD86, o que torna as DC

aptas a apresentar os antígenos e a ativar células T *naïve* (CARVALHO 2003). Já Iale é uma molécula MHC classe II presente em células dendríticas quiescentes. Para cada formulação foi calculada a porcentagem de células ativadas para os marcadores testados, e a mediana de fluorescência das células marcadas (MFI), que representa intensidade da ativação.

Em um primeiro experimento, foi comparada a ativação de DC pelas diferentes NCMP contendo NP com PspA4Pro adsorvida. Não houve diferença estatisticamente significativa entre a porcentagem de células CD40+ (Figura 44A) e Iale+ (Figura 44F) do controle negativo e a das células incubadas com NCMP, ou mesmo com LPS, que foi empregado aqui como controle positivo. Também não houve diferença significativa entre a mediana de fluorescência para o marcador de CD40 (Figura 44B), mas houve diferença significativa entre o MFI Iale das células incubadas com LPS e com PGA-co-PDL sem quitosana vazia (Figura 44H).

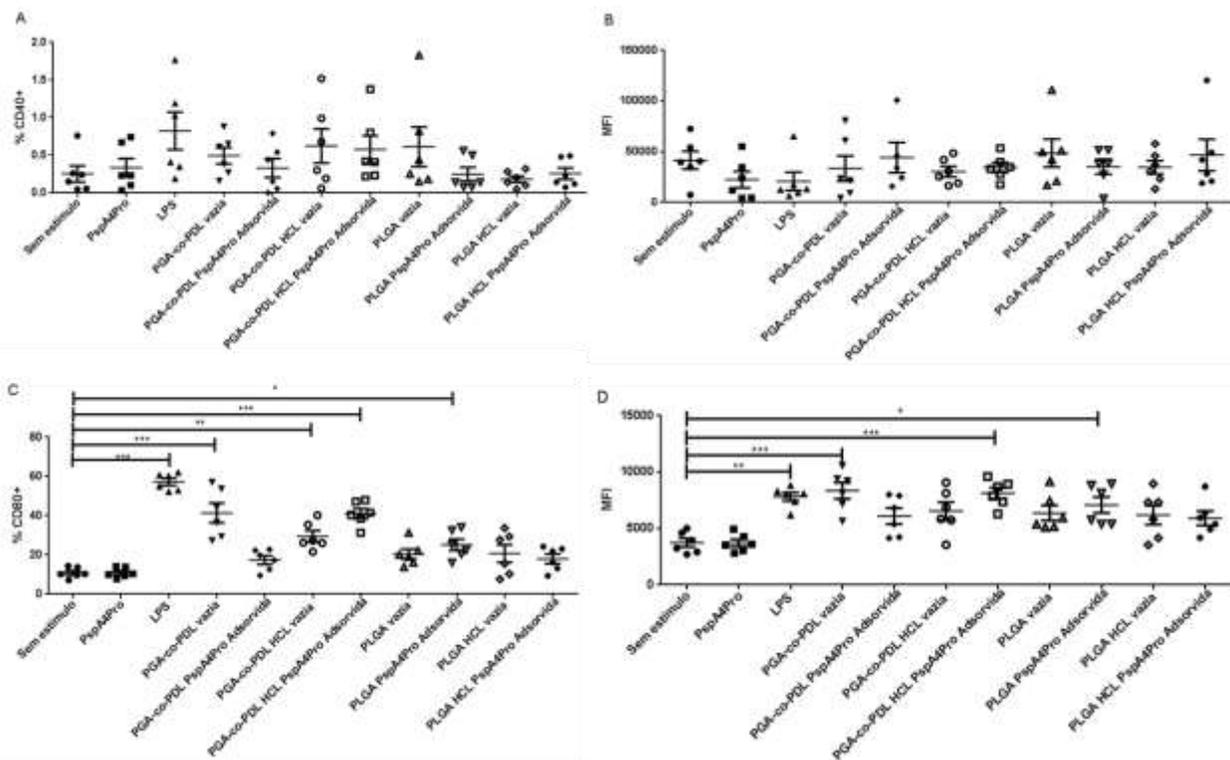
A população de células CD80+ foi significativamente maior após a incubação com LPS, PGA-co-PDL sem quitosana e com HCI-CS vazias, PGA-co-PDL HCI-CS com PspA4Pro e PLGA sem quitosana e com PspA4Pro (Figura 44B). O MFI de CD80+ também foi significativamente maior para as cinco formulações acima, mas não foi significativamente diferente para PGA-co-PDL HCI-CS vazia em relação ao controle negativo (Figura 44D).

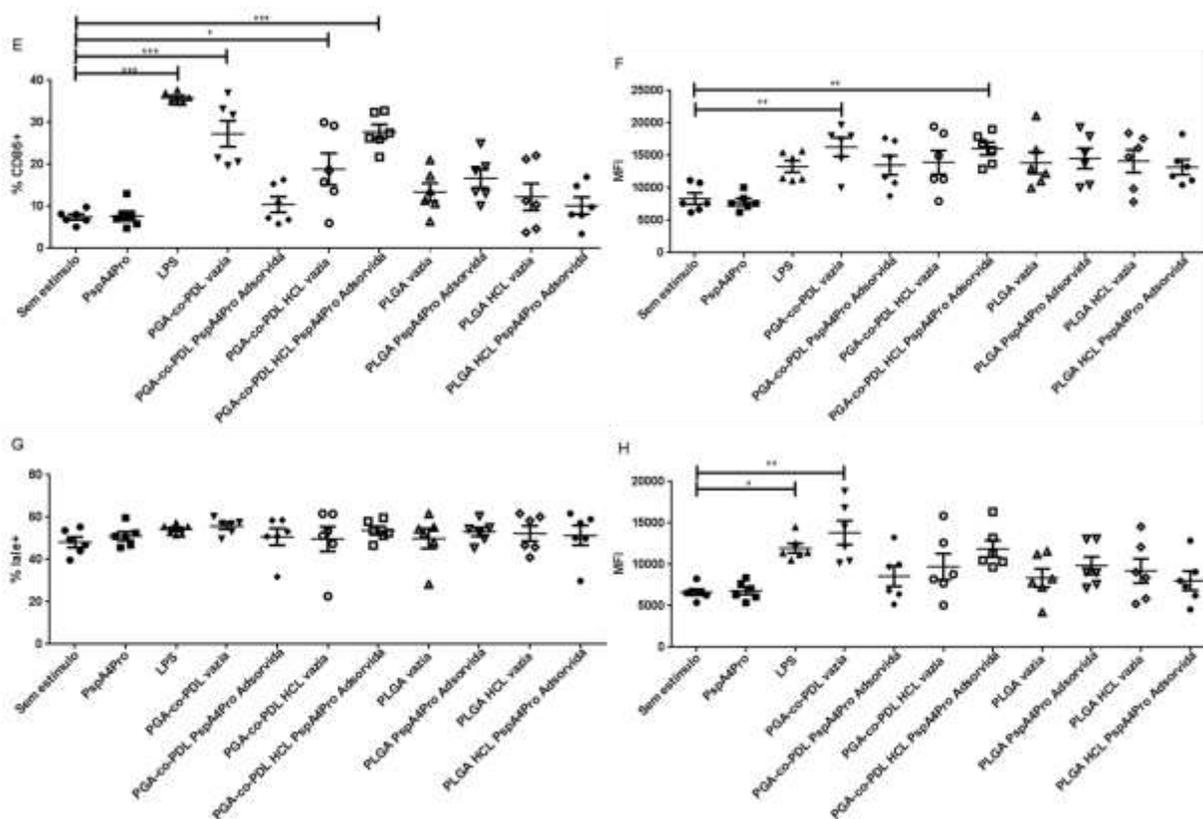
Por fim, a população CD86+ foi significativamente maior para as células estimuladas com LPS, PGA-co-PDL sem quitosana vazia, PGA-co-PDL com HCI-CS vazia e com PspA4Pro. Destas, apenas PGA-co-PDL sem quitosana vazia e com HCI-CS com PspA4Pro apresentaram MFI significativamente maior do que o controle negativo (Figura 44F).

No conjunto, estes resultados mostram fraca ativação de células dendríticas pelas moléculas de PLGA, independente da presença de quitosana ou PspA4Pro. Na verdade, a presença de PspA4Pro parece influenciar pouco na ativação das DC. Considerando que as NCMP são grandes, sua internalização pelas DC é pouco favorecida quando comparada às partículas menores. Desta forma, o que deve estar sendo internalizado são as NP liberadas das NCMP. O experimento de liberação de PspA4Pro mostrou que a liberação da proteína é rápida e incompleta. Uma das formulações que apresentou melhor resultado na ativação de DC foi a PGA-co-PDL

HCl-CS com PspA4Pro, que mostrou liberação de somente 40% de PspA4Pro em 24 h (Figura 32). Isso indica que tanto a presença de NP de PGA-co-PDL vazias como de NP com a proteína adsorvida é capaz de ativar as células dendríticas.

Figura 44: Efeito da presença das NCMP contendo diferentes formulações de NP, produzidas por emulsão simples, com e sem PspA4Pro adsorvida, na ativação de células dendríticas da medula óssea de camundongos. A) % CD CD40+ B) MFI CD40, C) % CD CD80+ D) MFI CD80, F) % CD CD86+ G) MFI CD86, G) % CD lale+ H) MFI lale. Diferenças estatisticamente significativas com o grupo controle sem estímulo estão indicadas (One-way ANOVA, pós-teste de Tukey).





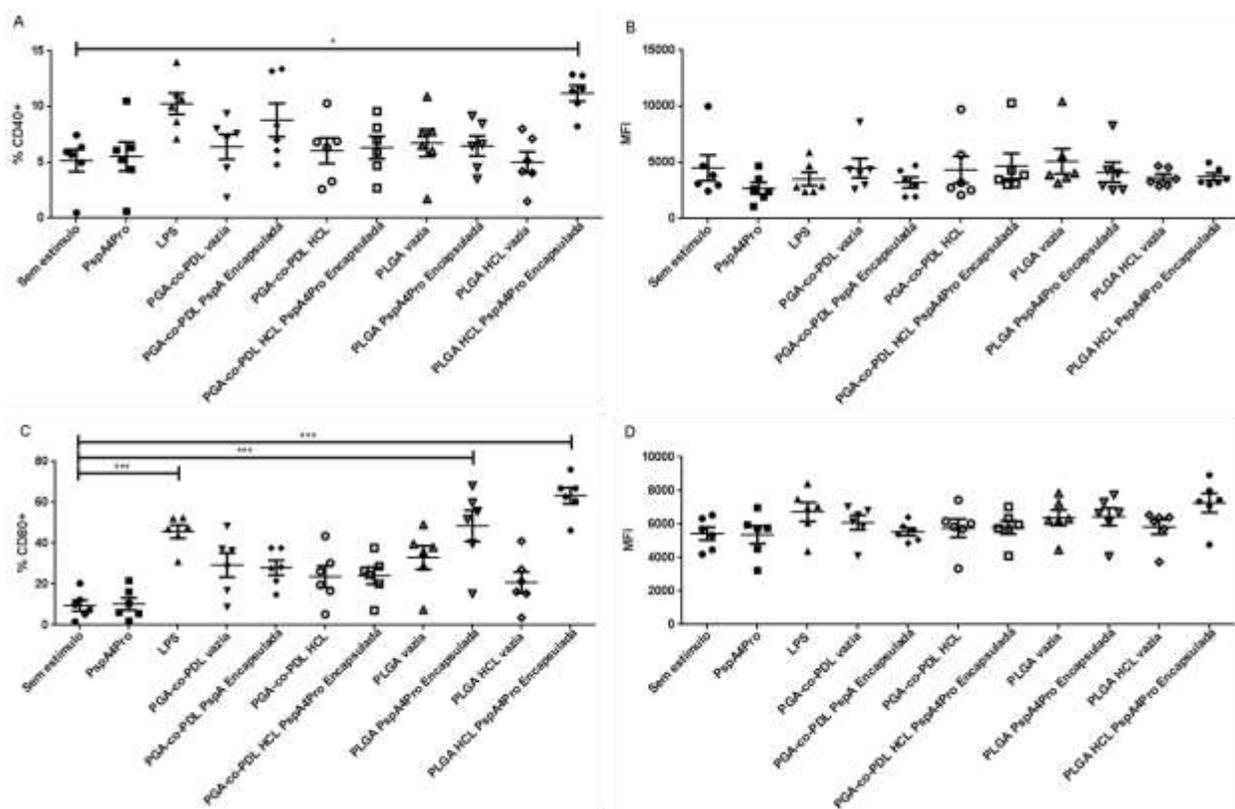
\*\*\*p<0,0001; \*\*p<0,001; \*p<0,05

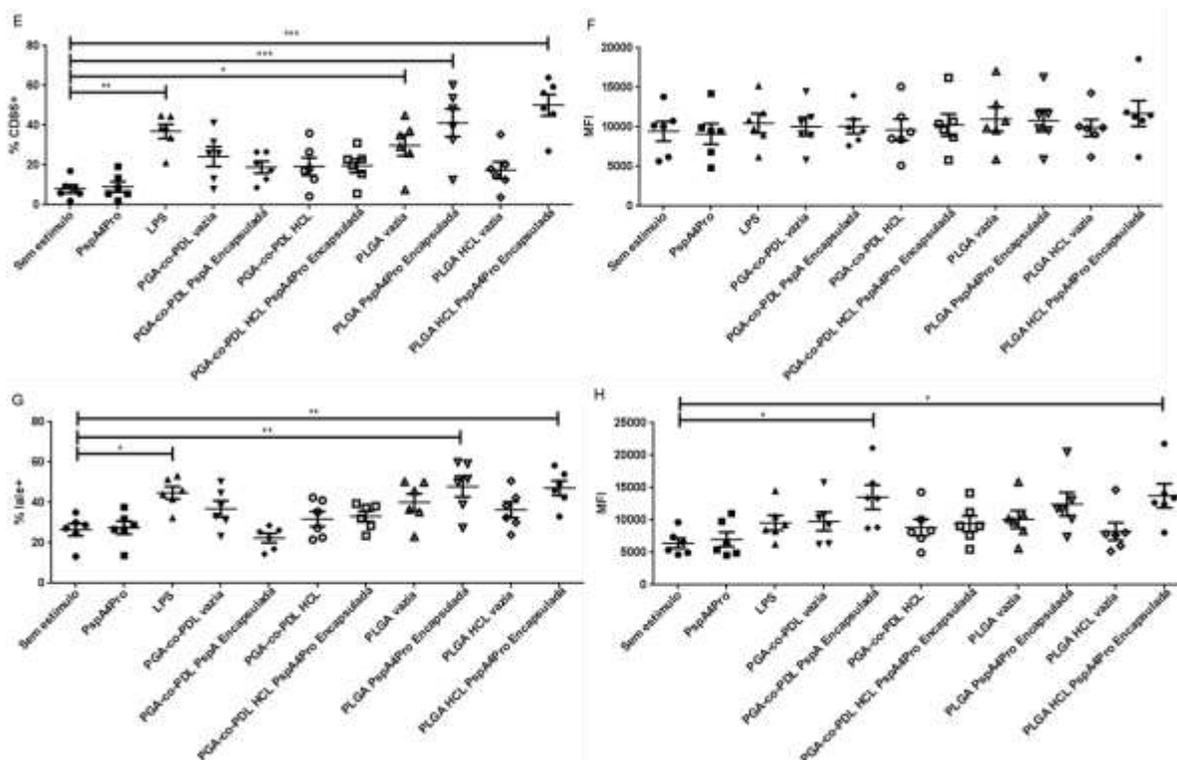
Em seguida, foram comparadas NCMP contendo NP com PspA4Pro encapsulada. As partículas de PLGA HCL-CS com PspA4Pro encapsulada foram as únicas que promoveram aumento estatisticamente significativo nas células CD40+, (Figura 45A). Na verdade, esta formulação foi a única que aumentou significativamente a população de células para todos os marcadores (Figura 45 A, C, E, G). O perfil da PLGA sem quitosana com a proteína foi bastante semelhante à formulação com quitosana, com aumento na % de CD80+, CD86+ e Irf1+, mas não de CD40+ (Figura 45 A, C, E, G).

O estímulo com as partículas de PGA-co-PDL não foi significativamente diferente do controle negativo para nenhum dos marcadores. Além da localização da PspA4Pro na partícula, que aqui encontra-se no interior, outra diferença entre as NP deste ensaio e do anterior é o tipo de emulsão pelo qual foram preparadas, simples no primeiro experimento e dupla no segundo. Embora maiores, as partículas preparadas por emulsão dupla ainda são menores do que 300 nm, então o tamanho não deveria

ser um obstáculo na internalização pelas DC. Então a diferença no perfil de ativação das DC pelas NP de PGA-co-PDL deve ser devida a outros fatores que não o tamanho, tais como a morfologia das nanopartículas ou a diferença na carga superficial. Não houve diferença significativa entre os MFI CD40, CD80 e CD86 de nenhuma formulação, seja entre si ou entre os controles negativo e positivo (Figuras 45 B, D, F). A exceção foi MFI Iale, que foi significativamente maior para PGA-co-PDL sem quitosana com PspA4Pro e para PLGA com quitosana e PspA4Pro (Figura 45 H).

Figura 45: Efeito da presença das NCMP contendo diferentes formulações de NP, produzidas por emulsão dupla, com e sem PspA4Pro encapsulada, na ativação de células dendríticas da medula óssea de camundongos. A) % CD CD40+ B) MFI CD40, C) % CD CD80+ D) MFI CD80, F) % CD CD86+ G) MFI CD86, G) % CD Iale+ H) MFI Iale. Diferenças estatisticamente significativas com o grupo controle sem estímulo estão indicadas (One-way ANOVA, pós-teste de Tukey).





\*\*\*p<0,0001; \*\*p<0,001; \*p<0,05

Como dito anteriormente, além de medir a capacidade das formulações de ativar células dendríticas, este experimento teve o objetivo de reduzir o número de formulações a serem avaliadas nos próximos experimentos, diminuindo o número de camundongos necessários para o desafio com *S. pneumoniae*. Com base nestes resultados decidiu-se prosseguir com apenas duas formulações: 1) NCMP contendo NP de PGA-co-PDL com HCL-CS e PspA4Pro adsorvida; e 2) NCMP contendo NP de PLGA com HCL-CS e PspA4Pro encapsulada.

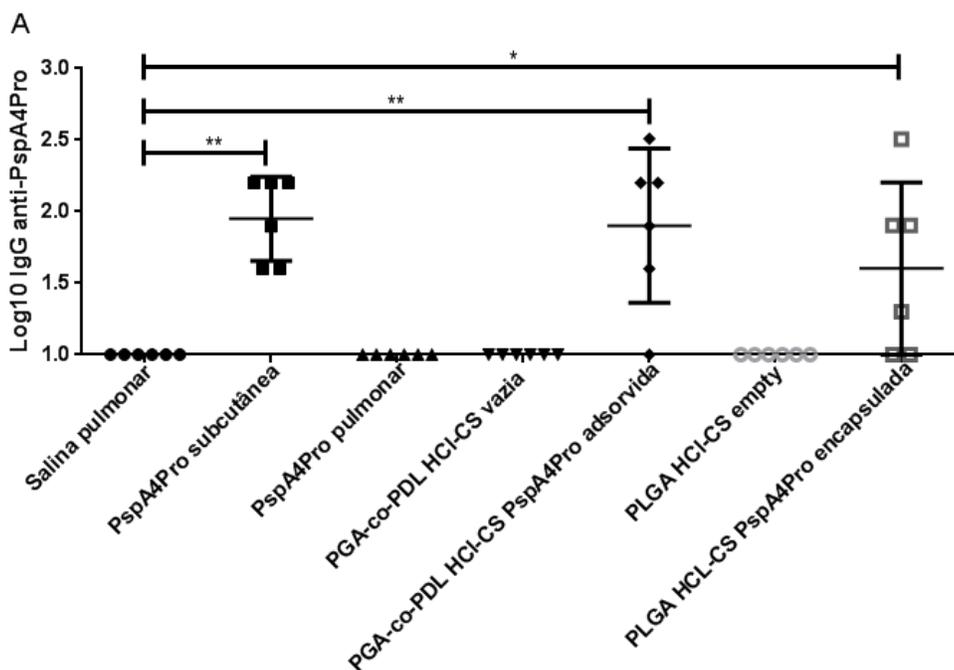
### 5.5. Imunização de camundongos com NCMP contendo 2 ug de PspA4Pro

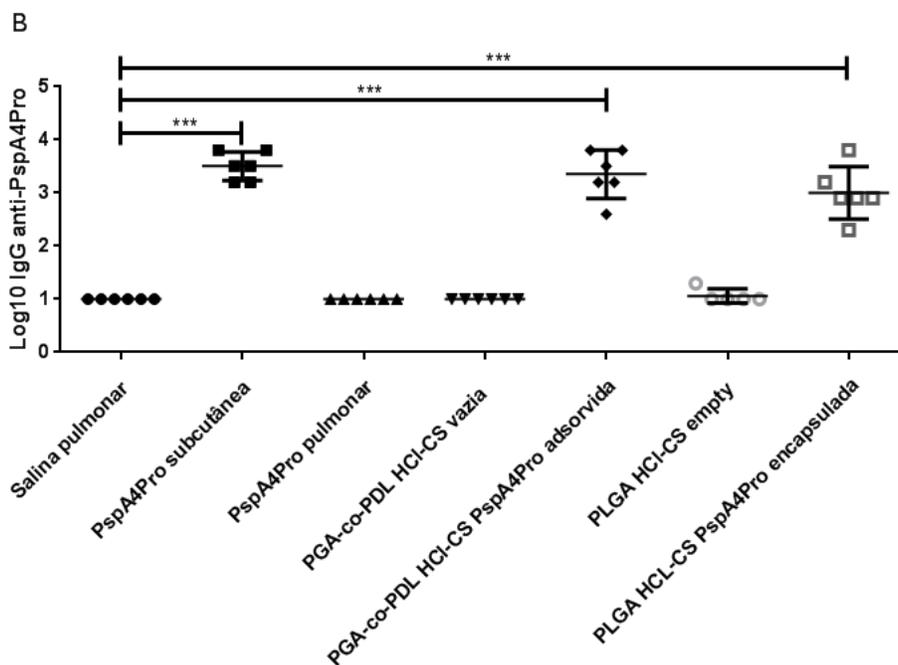
Após imunização dos animais, foi observado aumento significativo no título de IgG anti-PspA4Pro nos animais imunizados com uma dose de 2 ug PspA4Pro por via subcutânea e por via pulmonar com as NCMP com NP contendo PspA4Pro, tanto adsorvida quanto encapsulada, quando comparados com os animais que receberam salina, ou partículas vazias sem PspA4Pro e não houve diferença significativa entre os títulos atingidos por estes 3 grupos (Figura 46A).

A segunda dose da vacina levou ao aumento dos títulos de IgG anti-PspA4Pro dos animais que receberam PspA4Pro por via subcutânea e as NCMP com NP com PspA4Pro por via pulmonar, mas não da PspA4Pro pulmonar ou das NCMP sem PspA4Pro. Após a segunda dose também se observa menos dispersão entre os títulos dos 6 animais de cada grupo (Figura 46B). Novamente não houve diferença significativa entre os títulos de IgG anti-PspA4Pro entre os três grupos com maior resposta.

Nestes três grupos se observou uma resposta mais forte para IgG1 em comparação com IgG2a, com razões IgG1/IgG2a maiores do que 1 (Figura 47). Foi observada menor razão IgG1/IgG2a no grupo PLGA HCl-CS PspA4Pro em relação a PspA4Pro subcutânea, com diferença estatisticamente significativa. IgG1 favorece a resposta imune tipo Th2, se caracteriza pela produção de IL-4, que facilita a mudança isotípica de células B, e IL-5, que induz a produção de eosinófilos. Já IgG2a favorece a resposta Th1, caracterizada pela produção de IFN- $\gamma$ , que aciona a atividade bactericida de macrófagos e leva as células B à produção de anticorpos opsonizantes.

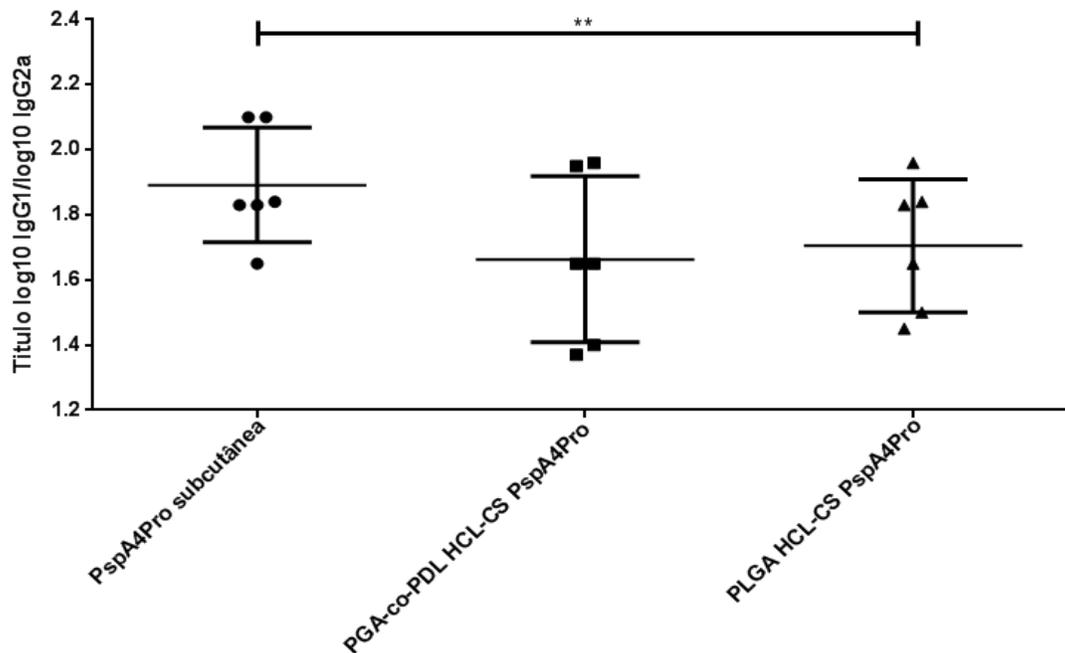
Figura 46: Título de IgG anti-PspA4Pro no soro de animais imunizados com PspA4Pro (2  $\mu$ g) e diferentes formulações de NCMP (sem PspA4Pro ou com 2  $\mu$ g de PspA4Pro). A) Título após uma dose; B) Título após duas doses. Diferenças estatisticamente significativas com o grupo controle salina-pulmonar estão indicadas (One-way ANOVA, pós-teste de Tukey).





\*\*\* $p < 0,0001$ ; \*\* $p < 0,005$ ; \* $p < 0,05$

Figura 47: Razão entre os títulos de IgG1 e IgG2a no soro de animais imunizados com duas doses de PspA4Pro (2  $\mu$ g) e diferentes formulações de NCMP

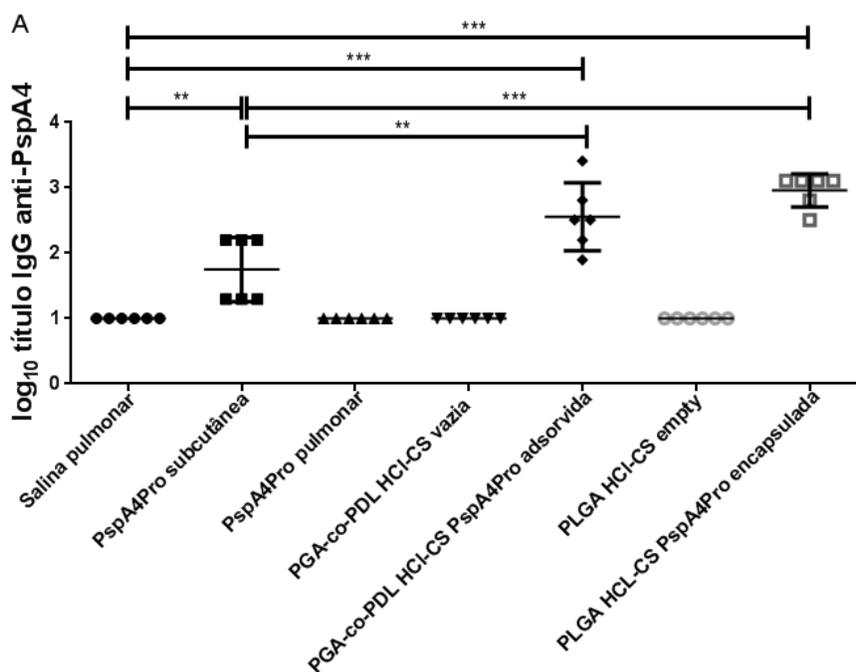


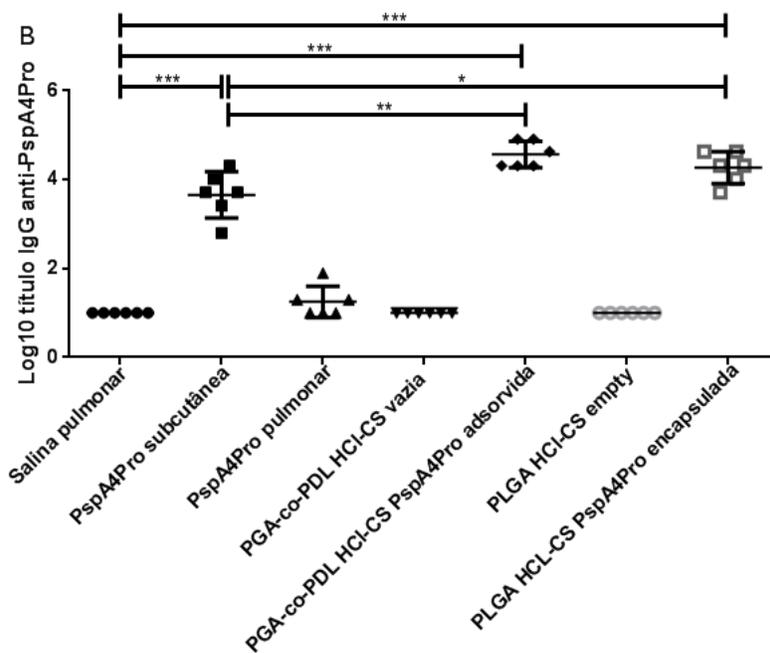
\* $p < 0,002$

## 5.6. Imunização de camundongos com NCMP contendo 6 µg de PspA4Pro

Neste experimento os grupos foram imunizados com 6 µg PspA4Pro. Tanto a imunização subcutânea como com NCMP contendo PspA4Pro apresentaram aumento no título de IgG anti-PspA4Pro quando comparados com o controle negativo (Figura 48 A e B). Ao mesmo tempo, PspA4Pro pulmonar continuou não levando à produção de IgG anti-PspA4Pro, mesmo com o aumento da dose (Figura 48 A). Os títulos gerados por PspA4Pro administrada por via subcutânea após 1 e 2 doses foram comparáveis entre os dois experimentos (Figuras 46 e 48). Já os títulos encontrados no soro dos animais que receberam as NCMP com PspA4Pro foram significativamente maiores quando a dose administrada passou de 2 µg para 6 µg. Isso resulta não só do aumento na quantidade de PspA4Pro como também na quantidade de NP. Este resultado reforça a importância das NP como adjuvantes na resposta imune desencadeada por estas formulações. Como no experimento anterior, a razão IgG1/IgG2a indica um favorecimento pela produção de IgG1. Não houve diferença significativa entre as razões IgG1/IgG2a entre as três formulações (Figura 49).

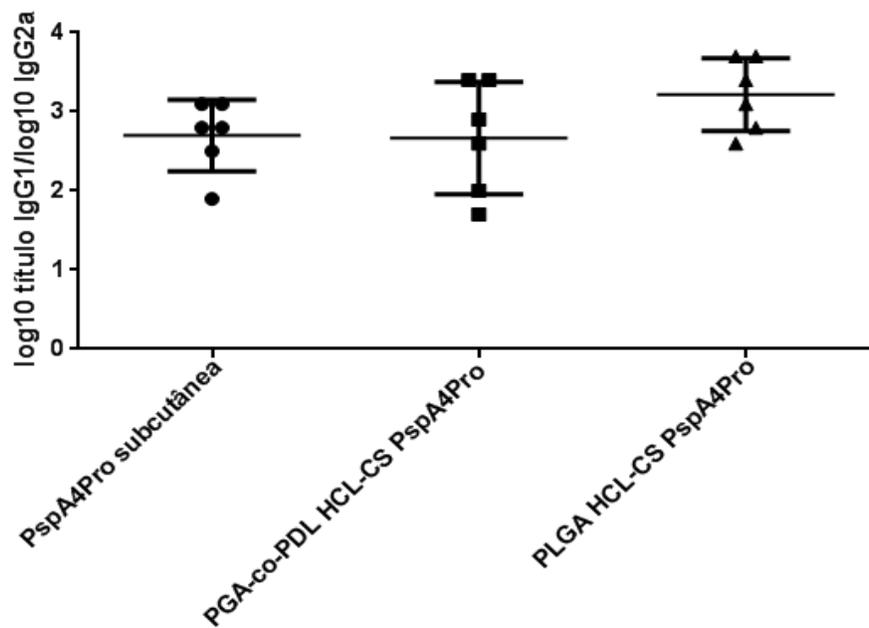
Figura 48: Título de IgG anti-PspA4Pro no soro de animais imunizados com PspA4Pro (6 µg) e diferentes formulações de NCMP (sem PspA4Pro ou com 6 µg de PspA4Pro). A) Título após uma dose; B) Título após duas doses. Diferenças estatisticamente significativas com o grupo controle salina-pulmonar e PspA4Pro-pulmonar estão indicadas (One-way ANOVA, pós-teste de Tukey).





\*\*\*p<0,0001; \*\*p<0,005; \*p<0,05

Figura 49: Razão entre os títulos de IgG1 e IgG2a no soro de animais imunizados com PspA4Pro (6 µg) e diferentes formulações de NCMP



### 5.7. Desafio letal com *S. pneumoniae*

Foram realizados 2 experimentos de desafio letal, no primeiro observou-se proteção parcial da PspA4Pro administrada por via subcutânea e das 2 formulações administradas por via pulmonar: PLGA HCl-CS com PspA4Pro encapsulada e da PGA-co-PDL HCl-CS com PspA4Pro adsorvida (Tabela 28). A eficácia das NCMP em proteger os animais contra a doença pneumocócica via imunização pulmonar foi avaliada através do desafio letal com a linhagem de *S. pneumoniae* ATCC 6303 (sorotipo 3, PspA5).

Tabela 28: Número de animais sobreviventes e taxa de sobrevivência após desafio letal com *S. pneumoniae* ATCC 6303. Camundongos Balb/c foram imunizados com 2 µg de PspA4Pro

Grupo	Sobreviventes	% Sobrevivência	P*
Salina	0/6	0	-
PspA4Pro pulmonar	0/6	0	-
PspA4Pro subcutânea	2/6	33,3	0,23
PGA-co-PDL HCl-CS vazia	0/6	0	-
PGA-co-PDL HCl-CS PspA4Pro adsorvida	4/6	66,7	0,03
PLGA HCl-CS vazia	0/6	0	-
PLGA HCl-CS PspA4Pro encapsulada	2/6	33,3	0,23

\*Teste exato de Fisher

No segundo experimento de desafio, sobreviveram 33% dos animais imunizados com PspA4Pro subcutânea, 83% dos animais imunizados com NCMP contendo NP de PGA-co-PDL HCl-CS e PspA4Pro adsorvida e 100% dos animais imunizados com NCMP contendo NP de PLGA HCl-CS e PspA4Pro encapsulada (Tabela 29). O aumento da massa de NCMP/dose resultou em aumento no título de IgG anti-PspA4Pro (Figuras 47B e 48B) e isso se refletiu no aumento da sobrevivência dos animais imunizados. O aumento da dose não significa aumentar apenas a quantidade de antígeno, mas também de NP administrada junto com o antígeno. A PspA4Pro pulmonar não ofereceu qualquer proteção contra a doença, e mesmo a imunização com PspA4Pro subcutânea com a maior dose (6 µg) ofereceu apenas proteção parcial. Este experimento demonstrou não só que a imunização pulmonar com as NCMP contendo NP ligadas à PspA4Pro foi capaz de proteger os animais contra a doença pneumocócica de forma eficiente, mas também mostrou a eficácia em aumentar a dose

de NCMP na proteção contra a doença e a importância da presença das nanopartículas e seu efeito adjuvante na imunização com PspA4Pro.

Tabela 29: Número de animais sobreviventes e taxa de sobrevivência após desafio letal com *S. pneumoniae* ATCC 6303. Camundongos Balb/c foram imunizados com 6 µg de PspA4Pro

Grupo	Sobreviventes	% Sobrevivência	P*
Salina	0/6	0	-
PspA4Pro pulmonar	0/6	0	-
PspA4Pro subcutânea	2/6	33,3	0,23
PGA-co-PDL HCl-CS vazia	0/6	0	-
PGA-co-PDL HCl-CS PspA4Pro adsorvida	5/6	83,3	0,007
PLGA HCl-CS vazia	0/6	0	-
PLGA HCl-CS PspA4Pro encapsulada	6/6	100,0	0,001

\*Teste exato de Fisher

## 6. DISCUSSÃO

O objetivo principal deste trabalho foi produzir e avaliar uma vacina pulmonar composta por nanopartículas poliméricas contendo antígenos proteicos de *S. pneumoniae*. Inicialmente planejava-se produzir nanopartículas com dois antígenos distintos, a PspA4Pro e a PdT. Uma vez que a produção da PspA4Pro já estava bem estabelecida (CAMPAGNI *et al.*, 2016; FIGUEIREDO *et al.*, 2017), este trabalho propôs a otimização do processo de purificação com foco na etapa de clarificação, uma das mais importantes do processo. Quando este trabalho começou ainda não havia um processo de produção nem de purificação estabelecidos para a PdT. Desta forma, pretendia-se construir uma cepa de *E. coli* recombinante capaz de expressar o gene da PdT, preparar um estoque congelado deste clone para futuros experimentos, realizar cultivos em frasco e em reator deste clone e purificar a proteína produzida para que esta pudesse ser utilizada na produção das nanopartículas. Apesar de o clone produtor de PdT ter sido obtido com sucesso, não houve tempo hábil para realizar os cultivos e a purificação da molécula antes da ida para o estágio de doutorado sanduíche na Liverpool John Moores University, onde foi feita a produção das nanopartículas. Atualmente nosso laboratório continua trabalhando com a produção de purificação da PdT e espera-se que no futuro nanopartículas contendo este antígeno, sozinho ou em conjunto com a PspA4Pro possam ser produzidas e estudadas.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009), a toxina diftérica CRM197 deve apresentar pureza superior à 90% para ser utilizada como carreadora em vacinas pneumocócicas conjugadas. Outros trabalhos, como ZHANG; PAN (2005) e CHENG *et al.* (2009) apresentaram processos de purificação de proteínas recombinantes que chegaram à 95% de pureza. No processo desenvolvido para a purificação da PspA4Pro atingiu-se pureza superior à 97% (FIGUEIREDO *et al.*, 2017, Anexo II). Isso significa que neste quesito, os dois processos de purificação de PspA4Pro mostrados aqui, com clarificação na presença de 0,1% ou 0,26% de CTAB, apresentaram resultados superiores, 98,2% de pureza na purificação empregando 0,1% e 98,4% de pureza na purificação com 0,26% de CTAB (Tabelas 20 e 21).

Outros processos de purificação da PspA descritos na literatura são o de BARAZZONE *et al.* (2011), que purificaram uma PspA de clado 1 em fusão com uma cauda de 6 histidinas (*His-tag*) utilizando cromatografia de troca aniônica e cromatografia de afinidade por metal para elevar a pureza da PspA de 34,9% para 96,6% com recuperação de 23%, e o de CARVALHO *et al.* (2012) que utilizaram cromatografia de troca aniônica, cromatografia de afinidade por metal e cromatografia de troca catiônica para aumentar a pureza da PspA de clado 3 com *His-tag* de 22,1% para 96,5% com recuperação de 22%. Os processos de purificação apresentados neste trabalho permitiram obter a PspA4Pro, produzida sem qualquer cauda de afinidade, com maior pureza e maior recuperação empregando duas etapas de precipitação, com CTAB e crioprecipitação a pH 4,0, e duas etapas de cromatografia de troca iônica. Embora a inserção de *tags* em proteínas recombinantes seja uma estratégia comum para facilitar a purificação, algumas vezes aumentando a recuperação, a solubilidade e facilitando o *refolding*, a fusão com *tags* pode resultar em alterações na conformação, atividade biológica ou enzimática e na toxicidade da proteína purificada (ARNAU *et al.*, 2006). Isso pode ocorrer mesmo utilizando *tags* pequenas, como a cauda de histidinas (WU; FILUTOWICZ 1999). Por isso, as *tags* devem ser removidas das proteínas, o que implica na adição de uma etapa de clivagem e uma etapa de remoção dos produtos de hidrólise da *tag* no processo de purificação. Além destas etapas adicionais aumentarem o tempo do processo, é necessário garantir que a clivagem tenha sido completa e que a proteína de interesse não tenha sido degradada no processo, caso a clivagem seja feita por proteases. A remoção das *tags* normalmente é feita por cromatografia de afinidade, que emprega resinas caras, e muitas vezes mais de uma etapa de purificação é necessária (ARNAU *et al.*, 2006, HOU *et al.*, 2004). Uma alternativa é o uso de *tags* com sítio de autoclivagem, o que elimina o uso de proteases (LU *et al.* 2011; SHI *et al.*, 2014), mas ainda depende de etapas adicionais de purificação para remoção de *tags* e de proteínas onde a clivagem foi incompleta. É por isso que na produção industrial, *tags* só são utilizadas quando as vantagens superam os custos e o tempo associados com a sua remoção (BELL *et al.*, 2013). As purificações realizadas neste trabalho permitiram obter uma proteína pura sem o uso de *tags*, o que elimina as etapas descritas acima. Isso impacta significativamente no custo do processo, já que resinas de afinidade por metal, como a

IMAC-Sepharose (GE) são significativamente mais caras do que resinas de troca iônica, como a Q-Sepharose e a SP-Sepharose utilizadas neste trabalho (GE LIFESCIENCE 2019).

A preocupação com os custos de um processo de purificação é particularmente importante quando se leva em consideração que este pode representar de 70 a 90% do custo total de produção de um produto em larga escala (STRUBE *et al.*, 2011). Embora estes custos possam ser viáveis para produtos com elevado valor agregado, eles são um grande obstáculo para a produção de vacinas em larga escala e para distribuição universal, especialmente em países com menos recursos disponíveis para investir na imunização de toda população. Daí vem a necessidade de reduzir ao máximo o custo de produção de uma vacina, o que passa pelo desenvolvimento de um processo de purificação simples, eficiente e com o menor custo possível. Uma forma de reduzir os custos de um processo é estudando como as variáveis que compõe cada etapa do processo influenciam no resultado final. Para realizar esse tipo análise, o planejamento experimental (DOE) é uma ferramenta eficiente e largamente utilizada. Como exemplo do uso do DOE na otimização de processos, pode-se citar o trabalho de VICENTE *et al.* (1998), que utilizou o planejamento experimental fatorial e a metodologia de superfícies de resposta para otimizar a produção de biodiesel. A análise da superfície obtida mostrou que a temperatura e a concentração de catalizador têm efeito positivo na conversão de óleos vegetais em biodiesel e que o efeito da concentração é maior do que o da temperatura, mas que temperaturas muito altas, acima de 60 °C, e concentrações de catalisador acima de 1,5% apresentavam efeito negativo. O modelo criado por VICENTE *et al.* (1998) através do planejamento experimental se adequou aos dados experimentais e permitiu encontrar a condição ótima para a produção de biodiesel. Da mesma forma, os modelos obtidos aqui se adequaram bem aos resultados experimentais, especialmente o modelo de recuperação de PspA4Pro, que foi muito próxima a 100% nas quatro condições testadas (Tabela 19). MARTHOS *et al.* (2015) utilizaram o planejamento experimental para estudar os efeitos dos componentes do meio de cultura na produção de polissacarídeo capsular de *S. pneumoniae* do sorotipo 1 (PS1). Os resultados do planejamento mostraram que um novo meio de cultura com menor concentração de extrato de levedura e peptonas e sem adição de aminoácidos seria viável. Avaliado no

cultivo em reator, este novo meio aumentou a produção de PS1 quando comparado ao meio inicial e a outros meios da literatura (MARTHOS *et al.*, 2015). Como nesses trabalhos, o DOE realizado aqui permitiu determinar a influência de variáveis na etapa de clarificação da PspA4Pro. Diferente de Marthos, que realizou um delineamento fatorial fracionado, aqui foi utilizada uma matriz de Plackett & Burman. Ambas são estratégias empregadas quando existem muitas variáveis e se deseja identificar quais delas são as mais importantes (RODRIGUES; IEMMA, 2009). A escolha entre estas técnicas normalmente se dá pelo tipo do experimento que está sendo realizado. A matriz de Plackett & Burman permite obter os mesmos resultados do que em um fatorial fracionado, porém com menor número de experimentos, então é mais indicada quando os experimentos em questão são caros ou difíceis. Já um fatorial fracionado é mais indicado quando se imagina que haverá um maior número de fatores e de interações entre fatores significativas para o processo (RODRIGUES; IEMMA, 2009). Neste trabalho, Plackett & Burman foi escolhido porque a quantidade de biomassa disponível para o DOE era limitada, então era importante reduzir ao máximo o número de experimentos.

Dentre as variáveis mais importantes para a pureza e a recuperação da PspA4Pro na etapa de clarificação está o CTAB. Este detergente catiônico é comumente utilizado na ruptura celular e na precipitação de ácidos nucleicos e polissacarídeos (HUANG; KIM 2013; TOMANEE; HSU; ITO 2004; LANDER *et al.*, 2002). Neste trabalho, os modelos de remoção de polissacarídeos e ácidos nucleicos mostraram que a concentração de CTAB tem efeito positivo na remoção destas moléculas. Além de polissacarídeos e ácidos nucleicos, YOSHIHISA (1999) utilizou CTAB para a remoção de LPS durante a purificação de proteínas da família da RTX toxina, enquanto nosso grupo mostrou que a clarificação com CTAB foi capaz de remover mais de 96% das endotoxinas da amostra, além de aumentar a pureza da PspA4Pro em relação a outras proteínas (FIGUEIREDO *et al.*, 2017). A concentração de LPS após a clarificação com 0,26% de CTAB não foi medida, mas considerando a previsão do modelo obtido pelo DOE, é esperado que a eliminação do LPS igual ou superior àquela obtida com 0,1% de CTAB. De fato, a redução de polissacarídeos está

relacionada à diminuição de LPS, uma vez que o método do fenol sulfúrico empregado para dosar polissacarídeos reage também com a porção polissacarídica do LPS.

Ainda com relação ao processo de purificação de PspA4Pro, o aumento da concentração de 100 mM para 150 mM de NaCl na fração de eluição de contaminantes da Q-sepharose (Tabela 20), aumentou o fator de purificação desta etapa (de 1,3 para 1,7), mas também reduziu a recuperação da PspA4Pro (61,1% contra 69,3%) em relação ao anteriormente proposto por FIGUEIREDO (2014). Este novo processo de purificação (Tabela 20) permitiu atingir a pureza desejada após a crioprecipitação em pH 4,0, enquanto o processo anterior precisou da cromatografia de troca catiônica para atingir pureza superior à 95%. Descontando a última etapa cromatográfica, o novo processo teria alcançado recuperação geral de PspA4Pro 17% maior (53% contra 36%).

A PspA4Pro purificada foi utilizada para a produção das nanopartículas poliméricas na Liverpool John Moore University durante o estágio de doutorado sanduíche. MANOLOVA *et al.* (2008) mostraram a importância do tamanho das partículas na absorção por células dendríticas. Seu estudo mostrou que após a injeção subcutânea de partículas de poliestireno de tamanho variado, partículas grandes, entre 500 nm e 2000 nm, se associavam às DC no local da injeção, enquanto partículas menores, entre 20 nm e 200 nm, eram capazes de chegar aos linfonodos para serem apresentadas às DC residentes, o que é preferível, pois nos linfonodos as DC podem apresentar os antígenos através dos complexos de histocompatibilidade maiores (MHC) de classes I e II, ativando células T *naive* e induzindo uma forte resposta imune sistêmica. Por outro lado, partículas muito pequenas também não são ideais, visto que KIM *et al.* (2010) mostraram que partículas de 200 nm foram melhor internalizadas por células dendríticas da medula óssea do que partículas de 30 nm. Tanto as partículas de PLGA como as de PGA-co-PDL produzidas apresentaram tamanho inferior à 200 nm. Apesar da adição da quitosana e da PspA4Pro ter aumentado o tamanho das partículas, estas se mantiveram abaixo dos 300 nm (Tabela 23 e Tabela 24), o que permitiria sua chegada aos linfonodos e internalização pelas células dendríticas. Isso foi confirmado pelo experimento de ativação de células dendríticas, onde foi observada ativação tanto para nanopartículas de PGA-co-PDL como para PLGA.

Em cada mg de nanopartículas de PGA-co-PDL com HCl-CS foram adsorvidos aproximadamente 36,5  $\mu\text{g}$  de PspA4Pro. Isso representa um aumento de 82% na adsorção de PspA4Pro em relação ao trabalho de KUNDA *et al.* (2015), que produziu nanopartículas de PGA-co-PDL com PspA4Pro adsorvida. Este aumento deve ser devido à carga positiva das nanopartículas com quitosana. Partículas de PGA-co-PDL sem quitosana apresentaram concentração de PspA4Pro/NP próxima a 25  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , valor muito mais próximo ao resultado de Kunda.

FECZKÓ *et al.* (2011) utilizaram planejamento experimental para otimizar o encapsulamento de albumina bovina (BSA) em nanopartículas de PLGA. Eles utilizaram um delineamento fatorial tipo Box-Behnker com 3 fatores e 3 níveis e determinaram que três variáveis independentes influenciaram no encapsulamento da proteína: a concentração de PLGA, a concentração de BSA e a razão entre os volumes da fase aquosa e da fase orgânica ( $r_{a/o}$ ). Outras duas variáveis, a concentração de PVA e o tempo da segunda sonicação, não influenciaram independentemente, mas modificaram os efeitos das outras variáveis. A concentração de PLGA apresentou efeito linear fortemente positivo e algum efeito quadrático negativo, então concentrações moderadas de PLGA, especialmente quando associadas a tempos curtos de sonicação, foram mais eficientes para encapsular a BSA. A concentração de BSA teve efeito negativo quando variável independente, mas positivo quando relacionado com a concentração de PLGA. Ou seja, aumentar a concentração de BSA torna o encapsulamento menos eficiente, mas aumentar a razão BSA/PLGA melhora a eficiência do processo. Aumentar  $r_{a/o}$  teve efeito positivo no encapsulamento. Com base no modelo obtido, FECZKÓ *et al.* (2011) chegaram a mais de 98% de eficiência no encapsulamento da BSA. Este valor está muito acima da eficiência dos encapsulamentos realizados neste trabalho, que foram de apenas 33% para nanopartículas de PLGA e 29% para nanopartículas de PLGA com HCl-CS. Neste trabalho, a concentração de PLGA utilizada foi de 2,8%, o que está dentro do intervalo ótimo definido por FECZKÓ *et al.* (2011), que fica entre 2,5 e 4,0% e a razão PspA4Pro/PLGA empregada aqui foi baixa (1:10), o que também deveria favorecer o encapsulamento. O terceiro elemento para um encapsulamento ótimo é uma razão água/óleo elevada. O modelo de Feczko mostrou que  $r_{a/o}=6$  resultaria em

encapsulamento superior, entre 90% e 100%, dependendo da concentração de PLGA. No encapsulamento realizado neste trabalho, a  $r_{a/o}$  foi próxima a 2,5. FECZKÓ *et al.* (2011) sugerem que se a  $r_{a/o}$  for baixa pode ocorrer quebra das gotículas da primeira emulsão, permitindo o escape da proteína. Como a PspA4Pro (43 kDa) é menor do que a BSA (66 kDa), este escape seria ainda mais crítico para a PspA4Pro. No conjunto, todos os fatores elencados acima poderiam explicar a baixa eficiência de encapsulamento. É importante frisar que a escolha das formulações das nanopartículas de PGA-co-PDL e de PLGA foi feita sem levar em consideração a ligação com PspA4Pro, com base apenas no tamanho das NP geradas sem proteína, visando alcançar o menor tamanho possível para aumentar a captação pelas células dendríticas. No futuro um planejamento experimental poderia ser empregado para aperfeiçoar o encapsulamento da PspA4Pro nas nanopartículas de PLGA.

A liberação inicial de PspA4Pro das nanopartículas de PGA-co-PDL HCl-CS foi de aproximadamente 30% e a liberação final após 24 h foi de aproximadamente 40%. Já a liberação inicial das nanopartículas sem quitosana foi de aproximadamente 50% e a final de 70%. O ensaio de liberação *in vitro* de PspA4Pro de nanopartículas de PGA-co-PDL (sem quitosana) realizado por KUNDA *et al.* (2015) mostrou liberação inicial de aproximadamente 40% e final de aproximadamente 94%. Portanto, a presença da quitosana não mudou muito o perfil inicial de liberação, mas levou a uma liberação final muito menor, provavelmente por causa da forte ligação entre a proteína e a partícula com carga oposta.

Embora a liberação controlada de fármacos seja desejável em muitos casos a fim de manter a dosagem contínua no corpo, a rápida liberação de 30% da PspA4Pro nas primeiras duas horas não deve representar um empecilho para a vacinação com estas partículas, já que os antígenos liberados seriam internalizados e apresentados pelas células dendríticas juntamente com antígenos ainda ligados às NP, que poderiam ter ação adjuvante (GHOTBI *et al.*, 2011). Além disso, as próprias NP vazias podem ter efeito adjuvante (ZHAO *et al.*, 2014). Outros estudos mostram que a internalização de nanopartículas por células dendríticas ocorre dentro de um intervalo de 1 a 2 h de incubação (CRUZ *et al.*, 2012, KARAGOUNI *et al.*, 2013, SALEEM *et al.*, 2005), intervalo onde a maioria da PspA4Pro ainda está dentro das nanopartículas.

A liberação de proteínas encapsuladas em nanopartículas de PLGA ocorre através de quatro vias: transporte através de poros cheios de água, transporte através do polímero, bombeamento osmótico e dissolução da partícula (FREDENBERG *et al.*, 2011). A liberação por poros ocorre via difusão, que depende do coeficiente de difusão do líquido dentro dos poros, da porosidade da partícula e da tortuosidade dos poros, que devem ser contínuos desde o ponto onde está a proteína, ou outra molécula encapsulada, até a superfície, e devem ser grandes o bastante para a passagem da molécula. A liberação por poros é o principal mecanismo de liberação de moléculas encapsuladas durante os estágios iniciais da liberação. Moléculas hidrofílicas, como proteínas e DNA geralmente são liberadas por poros (SHARMA *et al.*, 2016). A baixa liberação de PspA4Pro encapsulada durante as 24 h do ensaio sugerem que a difusão da proteína para fora das partículas através de poros foi muito pequena, talvez pela ausência de poros nas partículas ou pelo pequeno tamanho dos poros presentes. Tão pouco a liberação deve ocorrer por transporte através do polímero, fenômeno observado para moléculas pequenas e hidrofóbicas. O transporte por osmose é raro em partículas de PLGA e também depende da existência de poros largos (FREDENBERG *et al.*, 2011). Desta forma, a liberação da PspA4Pro das nanopartículas de PLGA deve ocorrer principalmente pela degradação das partículas. Isso explicaria a baixa liberação durante as 24 h do teste, visto que a degradação das nanopartículas de PLGA pode levar vários dias (SHAH; CHA; PITT 1992, ZILBERMAN; GRINBER 2008).

As características físico-químicas, como tamanho, carga e forma, de uma nanopartícula determinam como esta irá interagir com as células e, portanto, têm ligação direta com sua toxicidade. Partículas pequenas possuem maior área superficial relativa do que partículas grandes com a mesma massa, o que aumenta a área de interação com componentes celulares. O tamanho reduzido também facilita a entrada na célula, o que poderia causar dano celular (HUANG; CAMBRE; LEE 2017). JIANG *et al.* (2008) mostraram que o tamanho das nanopartículas de anatase TiO<sub>2</sub> influenciava na produção de espécies reativas de oxigênio. Eles também verificaram que nanopartículas amorfas também produziam mais espécies reativas de oxigênio. LEE *et al.* (2014), mostraram a influência da forma das partículas em sua citotoxicidade, mostrando que nanopartículas de óxido de ferro com formato de bastão foram mais

tóxicas do que nanopartículas esféricas em linhagem de macrófagos murinos RAW 264,7, gerando maior resposta inflamatória, produção de espécies reativas de oxigênio e necrose. Embora a morfologia das nanopartículas não tenha sido determinada neste trabalho, MCCALL e SIRIANNI (2013) mostraram que nanopartículas de PLGA preparadas por emulsão simples e por emulsão dupla eram esferas lisas, o que implicaria em menor toxicidade

A carga na superfície das partículas é outro fator que pode estar relacionado com sua toxicidade, pois interfere na entrada das nanopartículas na célula e no modo como essas partículas irão interagir com as organelas e moléculas intracelulares. KAI *et al.* (2011) mostraram que três nanopartículas de óxido de ferro com cargas diferentes, entre +4,5 mV e +14,5 mV, apresentaram graus diferentes de citotoxicidade em células de hepatoma humano, linhagem BEL-7402. Eles verificaram que a toxicidade aumentava com o aumento da carga. O mesmo foi observado para nanopartículas de ZnO, pois as partículas carregadas positivamente foram mais tóxicas para células epiteliais de alvéolos humanos (A549) do que partículas negativas com tamanho e forma similares (BAEK *et al.*, 2011).

Uma possível explicação para essa diferença na toxicidade de nanopartículas com tamanho e forma similares, mas cargas distintas, seria a composição da membrana das células de mamíferos, que são ricas em glicosaminoglicanas carregadas negativamente, que facilitariam a internalização das nanopartículas com carga positiva e repeliriam as de carga negativa. Dentro das células as nanopartículas positivas poderiam interagir com outras partículas com carga negativa, como ácidos nucleicos, causando danos (HUANG; CAMBRE; LEE 2017). Apesar disso, não houve grande diferença entre a toxicidade das partículas de PLGA com HCl-CS, que têm carga positiva, e as nanopartículas sem quitosana, que têm carga negativa, nem entre partículas de PGA-co-PDL com e sem quitosana. Isso significa que mesmo que haja maior internalização das nanopartículas positivas, elas não causaram dano celular maior do que as partículas negativas, pois ambas são hidrolisadas nos mesmos metabólitos biocompatíveis. De fato, nanopartículas baseadas em polímeros biodegradáveis são muito menos tóxicas do que nanopartículas de outros materiais, como metais ou nanotubos de carbono (BAHADAR 2016).

Embora a dose humana da vacina pneumocócica pulmonar com NP carregadas de PspA4Pro ainda não esteja definida, e não existam no mercado atual vacinas pneumocócicas baseadas em PspA4Pro, os trabalhos de MENZEL *et al.* (2005) e MEYER *et al.* (2006) mostraram que a dose clínica requerida para uma vacina pneumocócica de polissacarídeos administrada por via inalatória seria de 25 µg. Além disso, a administração intramuscular de 25 µg de rPspA + hidróxido de alumínio foi capaz de gerar resposta imune em voluntários saudáveis (MENZEL *et al.*, 2005). Considerando então uma dose de 25 µg e levando em conta a massa de PspA4Pro (µg PspA/mg NP) determinada anteriormente, as seguintes quantidades de NP seriam necessárias para produzir uma dose da vacina humana:

- PGA-co-PDL sem quitosana, PspA4Pro adsorvida: 0,98 mg NP
- PGA-co-PDL HCl-CS PspA4Pro adsorvida: 0,69 mg NP
- PLGA sem quitosana PspA4Pro adsorvida: 0,69 mg NP
- PLGA HCl-CS PspA4Pro adsorvida: 0,67 mg NP
- PGA-co-PDL sem quitosana PspA4Pro encapsulada: 6,04 mg NP
- PGA-co-PDL HCl-CS PspA4Pro encapsulada: 1,09 mg NP
- PLGA sem quitosana PspA4Pro encapsulada: 1,86 mg NP
- PLGA HCl-CS PspA4Pro encapsulada: 2,22 mg NP

Isso significaria viabilidade celular entre 60 e 80% para a maioria das formulações (Figura 42). Além disso, a toxicidade das nanopartículas de PGA-co-PDL foi semelhante àquela observada em trabalhos anteriores do nosso grupo (KUNDA *et al.*, 2015).

As nanopartículas foram encapsuladas em L-leucina para formar micropartículas através da técnica de *spray-dry*, um processo onde as partículas em solução são convertidas em pequenas gotas e expostas à um fluxo de ar quente e rápido que as converte em um pó que pode ser aspirado. Durante o *spray-dry* é comum adicionarem-se excipientes biocompatíveis, como aminoácidos, lipídios e carboidratos, para aumentar o tamanho das partículas e melhorar suas propriedades aerodinâmicas, além de proteger as nanopartículas durante o *spray-dry* (ALFAGIH *et al.*, 2015). TAWFEEK *et al.* (2011) produziram micropartículas de L-Leucina contendo nanopartículas de PGA-co-PDL e constataram que essas micropartículas apresentaram baixa toxicidade

e foram capazes de chegar aos pulmões com pouca deposição nas vias aéreas superiores. Resultados semelhantes foram obtidos por TAWFEEK *et al.* (2013) e KUNDA *et al.* (2015). Os perfis aerodinâmicos das micropartículas produzidas neste trabalho foram semelhantes ao das micropartículas obtidas por esses autores, com %FPF próxima a 40%. O DMAM das partículas com quitosana foi menor do que os valores obtidos nos trabalhos de Tawfeek e Kunda, indicando que houve menor agregação entre as micropartículas, o que favoreceria sua chegada aos alvéolos.

Em experimentos anteriores de nosso grupo tentou-se estabelecer um protocolo para entregar as micropartículas em forma de pó nos pulmões de camundongos, mas sem sucesso. Por isso a imunização dos camundongos foi feita instilando a solução de micropartículas ou de PspA4Pro livre diretamente em uma das narinas do animal. A instilação de volumes pequenos (10  $\mu$ L) é comumente utilizada para imunização nasal de camundongos. Volumes maiores, entre 40 e 50  $\mu$ L garantem a entrega das partículas nos pulmões (RODRIGUES *et al.*, 2018). Embora não se possa excluir a deposição de partículas ao longo do trato respiratório, o experimento de aerolização mostrou que isso também aconteceria em seres humanos que fossem imunizados com as micropartículas em pó. Vários trabalhos já mostraram como a imunização por vias diversas com PspA4Pro, livre ou associada a outras vacinas, foi capaz de levar à geração de anticorpos, reduzir a colonização e proteger camundongos desafiados com *S. pneumoniae* (VADESILHO *et al.*, 2012, FERREIRA, *et al.*, 2006, FERREIRA *et al.*, 2010). Apesar de gerar resposta imune e proteção quando administrada por estas vias, constatamos que a imunização pulmonar com PspA4Pro livre gerou baixo título de IgG anti-PspA4Pro e não foi capaz de proteger os camundongos desafiados. Por outro lado, quando 2  $\mu$ g de PspA4Pro foi administrada dentro nanopartículas formuladas em micropartículas, a imunização pulmonar resultou em títulos de IgG anti-PspA4Pro semelhantes ao título obtido com a imunização subcutânea com a mesma massa de PspA4Pro. Quando os animais imunizados com 2  $\mu$ g de proteína foram desafiados, a sobrevivência nos grupos que receberam PspA4Pro por via subcutânea e micropartículas de PLGA HCl-CS por via pulmonar foi de 33,3%, enquanto a sobrevivência no grupo imunizado com PGA-co-PDL HCl-CS por via pulmonar foi de 66,6%. Estes resultados foram semelhantes aos de RODRIGUES *et al.* (2018), que imunizaram camundongos com micropartículas de L-leucina contendo nanopartículas

de PGA-co-PDL com PspA4Pro adsorvida. A dose administrada por RODRIGUES *et al.* (2018) foi de 2 µg de PspA4Pro nas micropartículas via pulmonar e 5 µg de PspA4Pro livre pelas vias subcutânea e pulmonar. Esses resultados parecem indicar que a adição de HCl-CS à formulação das nanopartículas não contribuiu para o aumento da proteção, ou seja, não aumentou o efeito adjuvante das partículas. Contudo, é importante observar que a quantidade de PspA4Pro incorporada nas nanopartículas utilizadas por RODRIGUES *et al.* (2018) era de 20 µg PspA4Pro/mg de NP (Comunicação pessoal), enquanto as nanopartículas de PGA-co-PDL HCl-CS utilizadas neste trabalho tinham 36,5 µg PspA4Pro/mg e as NP de PLGA HCl-CS tinham 59,3 µg PspA4Pro/mg. Portanto a quantidade de micropartículas utilizada na imunização pulmonar neste trabalho foi aproximadamente a metade daquela utilizada anteriormente, mas que gerou proteção semelhante. Quando a quantidade de PspA4Pro foi aumentada de 2 µg para 6 µg, levando conseqüentemente ao aumento concomitante da quantidade de NP administrada, o título de IgG anti-PspA4Pro aumentou aproximadamente um log após a segunda dose e a sobrevivência dos grupos imunizados com PGA-co-PDL HCl-CS e com PLGA HCl-CS aumentou para 83,3% e 100,0%, respectivamente. As duas formulações induziram maior produção de IgG1 do que de IgG2a, indicando tendência a uma resposta Th2 (IgG1/IgG2a ~ 2,6). Esta tendência também foi observada no trabalho de RODRIGUES *et al.* (2018), onde ela foi um pouco mais acentuada (IgG1/IgG2a ~ 3), indicando que, apesar de a resposta com tendência Th2 continuar sendo preponderante, as novas formulações com quitosana parecem direcionar a resposta para Th1 com maior intensidade do que a formulação sem quitosana.

Embora este trabalho não tenha avaliado a capacidade de ligação dos anticorpos gerados após imunização dos animais a cepas de pneumococo que expressem PspA de diferentes famílias, RODRIGUES *et al.* (2018) mostraram que os anticorpos induzidos pelas partículas de PGA-co-PDL não foram capazes de se ligar a cepas de pneumococo expressando PspA da família 1 (cepa EF3030, sorotipo 19F, PspA1 e cepa D39, sorotipo 2, PspA2). Por outro lado, esses anticorpos se ligaram a diversas cepas que expressam PspA da família 2 (cepa M10, sorotipo 11A, PspA3, cepa 3JYP2670 (sorotipo 3, PspA4) e ATCC6303 (sorotipo 3, PspA5). No trabalho de TOSTES *et al.* (2017), camundongos foram imunizados via intranasal com PspA das

famílias 1 e 2 juntamente com vacina de célula inteira de pertussis, usada nos experimentos como adjuvante, e desafiados com uma mistura de duas cepas de *S. pneumoniae* sorotipo 6B, uma expressando PspA1 e outra expressando PspA4. Os camundongos imunizados com PspA1 e PspA4 apresentaram redução na colonização quando comparados com aqueles que receberam apenas uma das proteínas. Um novo desafio, desta vez com uma cepa do sorotipo 6B expressando PspA3 e uma do sorotipo 23F expressando PspA2 gerou resultados semelhantes (TOSTES *et al.* 2017). Isso mostra que a imunização com uma combinação de nanopartículas carregando PspA de famílias diferentes, ou uma combinação de PspA com outros antígenos, como a pneumolisina destoxificada, poderia levar a maior cobertura da vacina.

## 7. CONCLUSÕES

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CHENG, Y. et al. Fusion expression and immunogenicity of EHEC EspA-Stx2AI protein: implications for the vaccine development. **J. Microbiol**, v. 47, n. 4, p. 498-505, Ago., 2009.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

TOMANEE, P.; HSU, J. T.; ITO, Y. Fractionation of protein, RNA, and plasmid DNA in centrifugal precipitation chromatography using cationic surfactant CTAB containing inorganic salts NaCl and NH<sub>4</sub>Cl. **Biotechnol Bioeng**, v. 88, n. 1, p. 52-59, Out., 2004.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## ANEXO I

Tabela 30: Sequência de aminoácidos da PdT

PdT
MANKAVNDFILAMNYDKKKLLTHQGESIENRFIKEGNQLPDEFVV IERKKRSLSTNTSDISVTATNDSRLYPGALLVVDETLLENNPTLLA VDRAPMTYSIDLPGGLASSDSFLQVEDPSNSSVVRGAVNDLLAKWH QDYGQVNNVPARMQYEKITAHSMEQLKVKFGSDFEKTGNSLDID FNSVHSGEKQIQIVNFKQIYYTVSVDVAVKNPGDVFQDTVTVEDLK QRGISAERPLVYISSVAYGRQVYLKLETTSKSDEVEAAFEALIKG VKVAPQTEWKQILDNTEVKAVILGGDPSSGARVVTGKVDMMVEDLI QEGSRFTADHPGLPISYTTSSFLRDNVVATFQNSTDYVETKVTAYR NGDLLLDHSGAYVAQYYITWDELSYNHQQGKEVLTPKAWDRNGQ DLTAHFTTSIPLKGNVRNLSVKIREGTGLAFEWWRVTVYEKTDLPL VRKRTISIWGTTLYPQVEDKVEND

Tabela 31: Composição em porcentagem de aminoácidos da PdT

Aminoácido	Quantidade absoluta	Porcentagem
Ala (A)	29	6,2%
Arg (R)	20	4,2%
Asn (N)	26	5,5%
Asp (D)	35	7,4%
Cys (C)	0	0%
Gln (Q)	21	4,5%
Glu (E)	36	6,4%
Gly (G)	27	5,7%
His (H)	8	1,7%
Ile (I)	23	4,9%
Leu (L)	41	8,7%
Lys (K)	31	6,6%
Met (M)	6	1,3%
Phe (F)	15	3,2%
Pro (P)	17	3,6%
Ser (S)	35	7,4%
Thr (T)	42	7,6%
Trp (W)	7	1,5%
Tyr (Y)	19	4,0%
Val (V)	45	9,6%
Pyl (O)	0	0%
Sec (U)	0	0%

Fonte: (Expasy, 2014)

Massa Molecular predita: 52,8 kDa

PI predito: 5,18

Coefficiente de extinção: 66810 cm<sup>-1</sup>

## ANEXO II

Appl Microbiol Biotechnol (2017) 101:2305–2317  
DOI 10.1007/s00253-016-7983-9



BIOTECHNOLOGICALLY RELEVANT ENZYMES AND PROTEINS

## Production and purification of an untagged recombinant pneumococcal surface protein A (PspA4Pro) with high-purity and low endotoxin content

Douglas B. Figueiredo<sup>1,2</sup> · Eneas Carvalho<sup>1</sup> · Mauricio P. Santos<sup>3</sup> ·  
Stefanie Kraschowetz<sup>1,2</sup> · Rafaela T. Zanardo<sup>1,2</sup> · Gilson Campani Jr.<sup>3</sup> ·  
Gabriel G. Silva<sup>3</sup> · Cíntia R. Sargo<sup>3</sup> · Antonio Carlos L. Horta<sup>3</sup> · Roberto de C.  
Giordano<sup>3</sup> · Eliane N. Miyaji<sup>1</sup> · Teresa C. Zangirolami<sup>3</sup> · Joaquin Cabrera-Crespo<sup>1</sup> ·  
Viviane Maimoni Gonçalves<sup>1</sup>

Received: 5 September 2016 / Accepted: 26 October 2016 / Published online: 26 November 2016  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

**Abstract** *Streptococcus pneumoniae* is the main cause of pneumonia, meningitis, and other conditions that kill thousands of children every year worldwide. The replacement of pneumococcal serotypes among the vaccinated population has evidenced the need for new vaccines with broader coverage and driven the research for protein-based vaccines. Pneumococcal surface protein A (PspA) protects *S. pneumoniae* from the bactericidal effect of human apolactoferrin and prevents complement deposition. Several studies indicate that PspA is a very promising target for novel vaccine formulations. Here we describe a production and purification process for an untagged recombinant fragment of PspA from clade 4 (PspA4Pro), which has been shown to be

lipopolysaccharide, which is the major endotoxin; and (ii) cryoprecipitation that eliminates aggregates and contaminants, which precipitate at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  and pH 4.0, leaving PspA4Pro in the supernatant. The final process consisted of cell rupture in a continuous high-pressure homogenizer, clarification, anion exchange chromatography, cryoprecipitation, and cation exchange chromatography. This process avoided costly tag removal steps and recovered  $35.3 \pm 2.5\%$  of PspA4Pro with  $97.8 \pm 0.36\%$  purity and reduced endotoxin concentration by  $>99.9\%$ . Circular dichroism and lactoferrin binding assay showed that PspA4Pro secondary structure and biological activity were preserved after purification and remained stable in a wide range of temperatures and pH

cross-reactive with several PspA variants. PspA4Pro was obtained using lactose as inducer in Phytone auto-induction batch or glycerol limited fed-batch in 5-L bioreactor. The purification process includes two novel steps: (i) clarification using a cationic detergent to precipitate contaminant proteins, nucleic acids, and other negatively charged molecules as the

values.

**Keywords** *Streptococcus pneumoniae* · Lipopolysaccharide removal · Cetyltrimethylammonium bromide · Chromatography · Cryoprecipitation · Lactoferrin binding assay

✉ Viviane Maimoni Gonçalves  
viviane.goncalves@butantan.gov.br

- <sup>1</sup> Centro de Biotecnologia, Instituto Butantan, Av Vital Brasil 1500, São Paulo, SP 05503-900, Brazil
- <sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, Universidade de São Paulo, Avenida Prof. Lineu Prestes 2415, Edifício ICB-III, São Paulo, SP 05508-900, Brazil
- <sup>3</sup> Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, Rodovia Washington Luís km 235, São Carlos, SP 13565-905, Brazil

## Introduction

*Streptococcus pneumoniae* causes diseases as pneumonia, meningitis, and sepsis, representing a major cause of mortality worldwide, mainly among young children and elderly people (Walker et al. 2013). Conjugated pneumococcal vaccines based on capsular polysaccharides (PS) effectively prevent invasive diseases, but only of the serotypes included in formulations. As a consequence, the vaccine serotypes are being replaced by non-vaccine serotypes, which have emerged as a new challenge (Pichon et al. 2013), because the need for

 Springer

2306

Appl Microbiol Biotechnol (2017) 101:2305–2317

multiple PS in formulations increases the costs associated with the development of wide-spectrum vaccines and hinders their use in low- and middle-income countries.

The use of protein antigens shared by different *S. pneumoniae* serotypes should allow for the elaboration of serotype-independent pneumococcal vaccines. Among candidates, pneumococcal surface protein A (PspA) represents one of the most promising. Every pneumococcal strain evaluated to date expresses this protein attached to the cell wall and exposed outside the polysaccharide layer. PspA inhibits complement deposition on the pneumococcal surface (Ren et al. 2004) and binds to apolactoferrin, preventing its bactericidal action in mucosal areas (Mirza et al. 2004). Immunization with PspA protected mice in challenge experiments (Briles et al. 2000; Briles et al. 2003; Darrieux et al. 2008) and sera from human volunteers immunized with PspA protected mice in passive immunization assays (Briles et al. 2000). Moreover, pre-existing serum antibodies against PspA, but not PS, protected humans against carriage after intranasal inoculation with *S. pneumoniae* (McCool et al. 2002).

The PspA structure comprises four distinct domains: a coiled-coil  $\alpha$ -helix-rich N-terminal domain that is exposed outside the polysaccharide layer, a proline-rich domain, a choline-binding domain, and a short hydrophobic tail at the C-terminal domain (Jedrzejas et al. 2001). PspA variants are divided into three families and six clades depending on the identity of amino acid sequences of the  $\alpha$ -helix region (Hollingshead et al. 2000). Several studies have shown that more than 90% of pneumococcal strains express PspA belonging to families 1 or 2 (Coral et al. 2001; Crony et al. 2012; Qian et al. 2012). Some N-terminal fragments of

cleaved tags. Tag removal poses some technical difficulties: the cleavage may not be complete or the proteases may cleave the target protein at secondary sites; the separation often has low yield and depends on expensive chromatography resins due to the similarity between hydrolyzed and tagged molecules (Arnau et al. 2006). Furthermore, the affinity step alone does not always suffice, and further purification steps are required for a product with the desired purity (Hou et al. 2004). An alternative and novel strategy was developed using self-cleaving tags, thus eliminating the need for proteases (Lu et al. 2011; Shi et al. 2014). However, cleavage may be incomplete and further purification steps must be included to separate the target protein from the cleavage products.

At industrial scale, on the other hand, a tag is adopted only if it presents clear advantages in production or to the therapeutic, because of extra time and cost associated with tag removal and the subsequent purification steps required when a tag system is used (Bell et al. 2013). Furthermore, few studies describe the production of untagged recombinant proteins (Hou et al. 2004; Wear et al. 2005; Ludwig et al. 2010).

In the present work, we describe a fully scalable process for the production and purification of a recombinant fragment of PspA from clade 4 (PspA4Pro), which contains the N-terminal  $\alpha$ -helix domain and the first block of the proline-rich domain and cross-reacts with PspA variants from clades 1 to 5 (Moreno et al. 2010). This fragment, cloned without tags, was produced in the intracellular soluble fraction of *Escherichia coli*. The purification strategy was designed to reach at least the purity recommended by the World Health Organization (WHO 2009) for carrier proteins used in pneumococcal conjugated vaccines with low endotoxin content.

PspA elicit a broadly protective cross-response against several clades (Darrieux et al. 2008; Oliveira et al. 2010; Moreno et al. 2010; Goulart et al. 2011).

In large-scale recombinant protein production, downstream processes account for up to 80% of total production costs (Banki et al. 2005). These costs, while potentially acceptable for high-end products, pose an obstacle to the large-scale production of vaccines that should benefit entire populations in countries with different investment potentials. Therefore, the development of simple and reliable purification processes for recombinant proteins represents an important goal in vaccine production.

Tags are often added to recombinant proteins to facilitate the purification process, improve yield, increase solubility, and aid refolding. However, tags may also have detrimental effects such as changing protein conformation, inhibiting enzyme activity, altering biological activity, and toxicity (Arnau et al. 2006). Even commonly used small tags, like histidine tags, may interfere with protein properties (Wu and Filutowicz 1999). Because of these negative effects, ideally, tags should be cleaved off and an additional purification step added to eliminate leftover-tagged proteins, cleaving enzymes, and

 Springer

Cell concentration was measured by culture broth optical density ( $\lambda = 600$  nm) and dry cell weight (g/L). Acetate and carbon source concentrations were analyzed by HPLC using an Aminex HPX-87H column (Bio-Rad) and 5 mM sulfuric acid as the mobile phase (0.6 mL/min) at 60 °C, with a refraction index detector (Waters 410) for sugars and glycerol, and UV-detector (Waters 486) at 210 nm for organic acids. For plasmid stability measurement, diluted samples of culture broth were plated on LB agar and incubated for 24 h at 37 °C. Then, at least 50 colonies from each sample were replicated in LB agar with and without kanamycin. After incubation at the same conditions, plasmid stability was calculated as the percentage of antibiotic-resistant colonies in relation to the number of colonies formed in plates without antibiotic.

#### PspA4Pro purification

The protein was purified with the following steps: cell separation, cell rupture, clarification, anion exchange chromatography, cryoprecipitation at pH 4.0, and cation exchange chromatography. Three clarification procedures were evaluated:

## Materials and methods

### Materials

The shovel mixer X-520 was supplied by Ingenieurbüro CAT M. Zipperer GmbH (Staufen im Breisgau, Germany). The cell disruption system was composed of a high-pressure continuous homogenizer from APV GAULIN (Crawley, UK), a tube-and-shell heat exchanger from Exergy (NY, USA), a jacketed reservoir (ArtePeças, São Paulo, Brazil), and a chiller from PolyScience (Niles, USA). The centrifuge Avanti J-251 was from Beckman Coulter (Brea, USA). All preparative chromatographic media and preparative chromatographic system (Äkta Avant 150) were from GE Lifescience (USA). The densitometer GS-800 was from BioRad (Hercules, USA). A size exclusion high-performance chromatography (HPSEC) column TSK-GEL G2000SW<sub>XL</sub> (TOSOH BIOSCIENCE, Minato, Japan) connected to a high-performance liquid chromatography (HPLC) system SCL-10AVP (SHIMADZU, Kyoto, Japan) was used for lactoferrin binding and molecular

### Establishing clarification conditions

Three different pH values and the detergent CTAB were evaluated to improve debris removal efficiency: pH 4.0, 5.5, and 6.5, and 0.1% (*m/v*) CTAB at pH 6.5. Samples (10 mL) from the Homogenate of the first purification process were adjusted to the desired pH or mixed with CTAB for 60 min at room temperature. These samples were centrifuged at 17,696×*g* and 4 °C for 90 min, and PspA4Pro purity and recovery were analyzed in the supernatant. The best condition for clarification was then applied to the entire Homogenate volume and to the two following purifications. The Homogenate was centrifuged at 17,696×*g* and 4 °C for 90 min. The supernatant containing PspA4Pro was called Clarified fraction.

### Anion exchange chromatography

Anion exchange chromatography was carried out using 200 mL Q-Sepharose FF resin packed in a XK 50/30 column. The volumetric flow was 2.50 mL/(min cm<sup>2</sup>) (50 mL/min). The column was equilibrated with five column volumes (CV) of 10 mM sodium phosphate buffer, pH 6.5, and conductivity

 Springer

source and lactose as inducer, according to Horta et al. (2012).

Cell concentration was measured by culture broth optical density ( $\lambda = 600$  nm) and dry cell weight (g/L). Acetate and carbon source concentrations were analyzed by HPLC using an Aminex HPX-87H column (Bio-Rad) and 5 mM sulfuric acid as the mobile phase (0.6 mL/min) at 60 °C, with a refraction index detector (Waters 410) for sugars and glycerol, and UV-detector (Waters 486) at 210 nm for organic acids. For plasmid stability measurement, diluted samples of culture broth were plated on LB agar and incubated for 24 h at 37 °C. Then, at least 50 colonies from each sample were replicated in LB agar with and without kanamycin. After incubation at the same conditions, plasmid stability was calculated as the percentage of antibiotic-resistant colonies in relation to the number of colonies formed in plates without antibiotic.

### PspA4Pro purification

The protein was purified with the following steps: cell separation, cell rupture, clarification, anion exchange chromatography, cryoprecipitation at pH 4.0, and cation exchange chromatography. Three clarification procedures were evaluated:

### Establishing clarification conditions

Three different pH values and the detergent CTAB were evaluated to improve debris removal efficiency: pH 4.0, 5.5, and 6.5, and 0.1% (*m/v*) CTAB at pH 6.5. Samples (10 mL) from the Homogenate of the first purification process were adjusted to the desired pH or mixed with CTAB for 60 min at room temperature. These samples were centrifuged at  $17,696\times g$  and 4 °C for 90 min, and PspA4Pro purity and recovery were analyzed in the supernatant. The best condition for clarification was then applied to the entire Homogenate volume and to the two following purifications. The Homogenate was centrifuged at  $17,696\times g$  and 4 °C for 90 min. The supernatant containing PspA4Pro was called Clarified fraction.

### Anion exchange chromatography

Anion exchange chromatography was carried out using 200 mL Q-Sepharose FF resin packed in a XK 50/30 column. The volumetric flow was 2.50 mL/(min cm<sup>2</sup>) (50 mL/min). The column was equilibrated with five column volumes (CV) of 10 mM sodium phosphate buffer, pH 6.5, and conductivity

 Springer

2308

Appl Microbiol Biotechnol (2017) 101:2305–2317

1.2 mS/cm. The elution was performed with a discontinuous gradient of NaCl (150, 300, and 1000 mM) in 10 mM phosphate buffer pH 6.5, using 5CV for each step.

### Cryoprecipitation

The pH of PspA4Pro fraction eluted from Q-Sepharose was decreased to 4.0 using glacial acetic acid. After pH adjustment, the sample was frozen (−20 °C) for 24 h. After this period, it was thawed and centrifuged ( $17,696\times g$ , 60 min, 4 °C). The supernatant was recovered and called Cryo-pH 4.0.

### Cation exchange chromatography

For cation exchange chromatography, 75 mL of SP-Sepharose FF resin was packed in an XK 26/20 column. The volumetric flow was 2.3 mL/(min cm<sup>2</sup>) (12 mL/min). The column was equilibrated with 5 CV of 25 mM sodium acetate buffer pH 4.0. The elution was performed by a discontinuous gradient of NaCl (500, 800, and 1000 mM) in 25 mM acetate buffer pH 4.0, using 5CV for each step.

### Mix mode chromatography

For the mix mode chromatography, 25 mL of CAPTO-MMC resin was packed in a XK 26/20 column. The flow was 0.75 mL/(min cm<sup>2</sup>), i.e., 4 mL/min. This chromatography was used at two time points in the process: after clarification and after cryoprecipitation. In the first experiment, 150 mL of

The purification factor (PF) and protein recovery (Rc) were calculated according to Eqs. (1) to (3) and the percentage of endotoxin reduction (Er) according to Eq. (4).

$$PF = \frac{PspA4Pro(\%)_n}{PspA4Pro(\%)_h} \quad (1)$$

where PspA4Pro (%) is the purity determined by densitometry of PspA4Pro band in the Homogenate fraction (*h*) and in the step (*n*).

$$PspA4Pro(g) = \frac{Prot(g) \times PspA4Pro(\%)}{100} \quad (2)$$

where PspA4Pro(g) is the PspA4Pro total amount and Prot(g) is the total protein amount measured according to Lowry.

$$Rc(\%) = \frac{PspA4Pro(g)_n \times 100}{PspA4Pro(g)_h} \quad (3)$$

where PspA4Pro(g)*h* is the total mass of PspA4Pro in the Homogenate fraction and PspA4Pro(g)*n* is the total mass of PspA4Pro in the step.

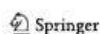
$$Er(\%) = 100 - \frac{E(EU/mL)_n \times V(mL)_n \times 100}{E(EU/mL)_h \times V(mL)_h} \quad (4)$$

where *E*(EU/mL) is the endotoxin concentration and *V*(mL) is the volume in the Homogenate fraction (*h*) and in the step (*n*).

Clarified fraction was applied to the resin previously equilibrated with 5 CV of 10 mM sodium phosphate buffer, pH 6.5, and conductivity 1.5 mS/cm. A discontinuous gradient of L-arginine (100, 200, 300, 500, and 1000 mM) in 10 mM phosphate buffer pH 6.5 was performed using 5 CV for each elution step. In the second experiment, 450 mL of Cryo-pH 4.0 fraction was applied to the resin previously equilibrated with 5 CV of 25 mM acetate buffer with 300 mM NaCl, pH 4.0, and conductivity 40 mS/cm. The elution was performed by a discontinuous gradient of L-arginine (500, 800, and 1000 mM) in 25 mM acetate buffer pH 4.0, using 5 CV for each step.

#### Protein quantification and PspA4Pro purity and recovery determination

Protein concentration was determined by the Lowry methodology (Lowry et al. 1951). PspA4Pro purity was determined by densitometry of the bands in 12% SDS-PAGE with 2-mercaptoethanol (Laemmli 1970) and calculated as the percentage of PspA4Pro band in relation to the sum of all other bands in the lane. Lipopolysaccharide (LPS) was measured as endotoxin unities by the Limulus amoebocyte lysate test (Bang 1956).



linear regression equation of the molecular mass logarithm versus the retention time of both standard curves.

#### Secondary structure and stability of purified PspA4Pro

Secondary structure and stability of PspA4Pro at different temperatures and pH values and in the presence of CTAB were verified by circular dichroism (CD). Measurements were obtained from 185 to 260 nm, and final CD spectra resulted from the mean of five measurements. PspA4Pro samples (0.1 mg/mL) were prepared in 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0 as follows: with buffer only, with 0.15% CTAB, and with buffer at pH 3.5 to pH 9.0. The sample in buffer only was heated (1 °C/min) from 15 to 95 °C and cooled back to 15 °C (1 °C/min). Deconvolution was calculated based on the Dichroweb online database (Whitmore and Wallace 2004) with Contin and CDSSTR algorithms (Sreerama and Woody 2000).

## Results

### PspA4Pro production

The auto-induction animal component-free medium employed in the simple batch cultivation has three carbon sources: glucose, consumed first; glycerol, the main carbon source during the induction phase; and lactose, the inducer of recombinant protein synthesis. Glucose exerts a catabolic repression effect on *lac* promoter and inhibits PspA4Pro synthesis. Glucose was exhausted in the medium within 8 h of cultivation, and the small amount of acetate produced was

### Binding of PspA4Pro to human lactoferrin

The binding ability of PspA4Pro to human lactoferrin was analyzed to verify if the protein preserved its biological function after purification. In this assay, lactoferrin was added to the purified PspA4Pro in three different proportions: 2 mg PspA4Pro plus 0.5 mg lactoferrin, 1 mg PspA4Pro plus 1 mg lactoferrin, and 1 mg PspA4Pro plus 2 mg lactoferrin. The mixtures were incubated at 37 °C for 1 h and applied to the HPSEC. The mobile phase was 300 mM sodium phosphate buffer pH 7.0 with 500 mM NaCl, and the flow rate was 0.6 mL/min.

### Determination of PspA4Pro molecular mass

To evaluate the molecular mass of PspA4Pro, two standard curves were prepared in HPSEC. The first curve included the globular proteins  $\beta$ -amylase (220 kDa), albumin (66 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), cytochrome c (12 kDa), and aprotinin (6 kDa). The second curve included linear dextran polymers with molecular masses of 6, 10, 70, and 229 kDa. The molecular mass of PspA4Pro was calculated using the

The combination of glycerol and lactose resulted in an almost unnoticeable diauxic growth. Lactose consumption increased after 9 h cultivation (Fig. 1), in parallel with the beginning of protein synthesis (Fig. 2a). In this process, the biomass concentration reached 39 g/L of dry cell weight in 16 h of cultivation (Fig. 2a). The plasmid remained quite stable, as the percentage of plasmid retention was higher than 88% within 14 h of cultivation and dropped to 70% at the end of the process (Fig. 2a). The volumetric production reached 7.6 g/L of PspA4Pro, the productivity 0.45 g/(L h) and the specific production 200 mg PspA4Pro/g biomass (Fig. 2a).

For the fed-batch strategy, the biomass increased up to 104 g/L within 36 h cultivation, leading to a PspA4Pro production reached 11.9 g/L after 11 h of induction. The plasmid retention was 95% at the end of cultivation (Fig. 2b). As expected, the fed-batch cultivation reached higher biomass concentration, but the cultivation was longer. Therefore, the PspA4Pro productivity was lower than in auto-induction batch, 0.33 g/(L h), as well as the specific production, 100 mg PspA4Pro/g biomass (Fig. 2b).

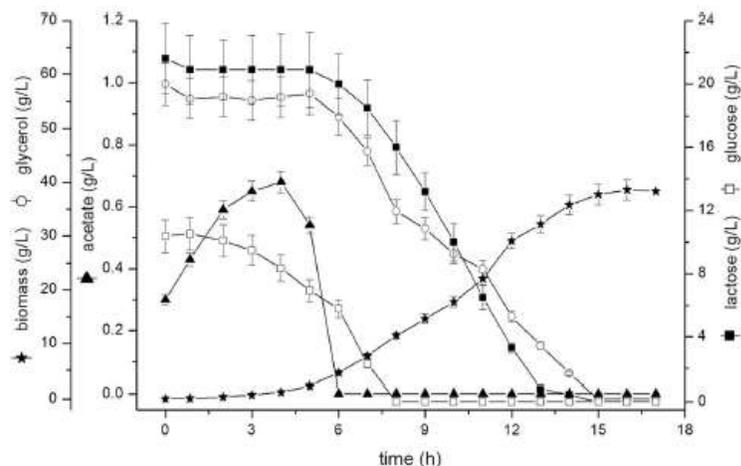
### Cell rupture and clarification

Soluble PspA4Pro was produced in the cytoplasm of recombinant *E. coli*. Frozen cells were suspended in lysis buffer and ruptured in a high-pressure continuous homogenizer. During the circulation of cells inside the closed loop of the homogenizer, samples were taken to measure cell lysis and protein release, respectively, by OD at 600 nm and absorbance at 280 nm. There was a rapid decrease in OD, which indicates that most of the cells were ruptured in the first 2 min. After

completely consumed after 6 h (Fig. 1). Glycerol consumption started after 4 h of cultivation, while lactose consumption started after 8 h, i.e., only after glucose exhaustion (Fig. 1).

4 min, both OD and absorbance at 280 nm reached an equilibrium plateau, indicating that cell rupture was completed after four residence times.

**Fig. 1** Production of PspA4Pro in 5-L bioreactor batch cultivation. Time profiles of biomass (stars), acetate (solid triangles), glucose (open squares), glycerol (open circles), and lactose (solid squares) in Phytone auto-induction medium



Springer

After cell lysis, four conditions were evaluated for the clarification step: pH 4.0, pH 5.5, pH 6.5, and 0.1% CTAB at pH 6.5. The purity and recovery increased with increasing pH (Table 1), but the pellet produced after centrifugation at pH 6.5 was soft and difficult to separate from the supernatant. The clarification with CTAB showed the greatest increase in purity and recovery of PspA4Pro (Table 1), and a hard and compact pellet was produced and easily removed, suggesting that the centrifugation time could be decreased.

CTAB also decreased endotoxin concentration (Table 2), because this cationic detergent interacts with negatively charged contaminants and parts of LPS, which is the main endotoxin molecule.

#### Comparison between ion exchange and mix mode chromatography

Both anion and cation exchange chromatographic steps allowed higher PspA4Pro recovery with similar purification factor than mix mode chromatography (data not shown). The low recovery in mix mode chromatography was associated with the combined interaction modes of the resin: ionic and hydrophobic, which led to a very strong binding with

PspA4Pro that was not eluted from the resin even with 1 M L-arginine. Due to this low recovery, mix mode chromatography was removed from the purification process and the sequence of chromatographic steps was limited to an anion exchange followed by a cation exchange. It is important to emphasize that the opposite sequence is not possible, since pH reduction of the Homogenate led to a huge loss of PspA4Pro in the clarification step (Table 1).

#### Cryoprecipitation

A precipitate was observed when the pH of the fraction eluted from Q-Sepharose was adjusted to 4.0 in order to apply it to the cation exchange chromatography, but PspA4Pro remained in the supernatant and the purity increased from  $65.2 \pm 10.7$  to  $93.7 \pm 4.9\%$ . The freezing/thawing of the Q-fraction without pH adjustment also precipitated contaminants, while PspA4Pro was recovered in the supernatant. When the clarification step was performed at pH 4.0, it resulted in the loss of almost all PspA4Pro (Table 1). On the other hand, PspA4Pro did not precipitate at pH 4.0 after Q-Sepharose. Hence, pH adjustment and freezing were combined in a cryoprecipitation step, which resulted in a great increase of purity and high step recovery (Table 2).

**Table 1** PspA4Pro recovery and purification factor under different clarification conditions

Clarification condition	PspA4Pro recovery (%)	Purification factor
pH 4.0	0.8	0.2
pH 5.5	67.9	0.9
pH 6.5	90.4	1.0
CTAB 0.1%	100.0	1.7

### Final purification process and endotoxin removal

The complete purification process was established based on the steps selected above: cell rupture in a continuous high-pressure homogenizer, clarification in the presence of the cationic detergent CTAB, anion exchange chromatography, cryoprecipitation at pH 4.0, and cation exchange chromatography. At the end of the three purification processes,  $35.3 \pm 2.5\%$  of the initial PspA4Pro was recovered, with

Springer

Appl Microbiol Biotechnol (2017) 101:2305–2317

2311

**Table 2** Evaluation of the PspA4Pro purification process<sup>a</sup>

Purification Step	PspA4Pro purity (%)	PspA4Pro mass (g)	PspA4Pro recovery (global)	PspA4Pro recovery (step)	Purification factor (global)	Purification factor (Step)	EU/mg PspA4Pro <sup>b</sup>	Endotoxin reduction (%)
Homogenate	33.40 ± 4.05	2.86 ± 1.75	100 ± 0.0	100 ± 0.0	1.00 ± 0.0	1.00 ± 0.0	933.80	0
Clarification 0.1% CTAB	50.36 ± 7.11	2.67 ± 1.87	92.3 ± 13.3	92.3 ± 13.3	1.57 ± 0.08	1.57 ± 0.08	33.0 <sup>b</sup>	96.5 <sup>c</sup>
Anion exchange chromatography	65.2 ± 10.77	1.78 ± 1.08	62.0 ± 4.7	69.3 ± 15.4	2.06 ± 0.47	1.32 ± 0.35	17.40	99.5
Cryoprecipitation pH 4.0	93.70 ± 4.92	1.39 ± 0.99	47.8 ± 8.9	82.7 ± 25.2	2.95 ± 0.32	1.30 ± 0.19	0.03	99.9
Cation exchange chromatography	97.80 ± 0.36	1.00 ± 0.58	35.3 ± 2.5	75.3 ± 12.7	2.96 ± 0.35	1.05 ± 0.05	0.07	99.9

<sup>a</sup> Average and standard deviation of two purification processes from auto-induction cultivation and one process from glycerol-limited fed-batch induced with lactose

<sup>b</sup> Endotoxin unities (EU) per µg of PspA4Pro

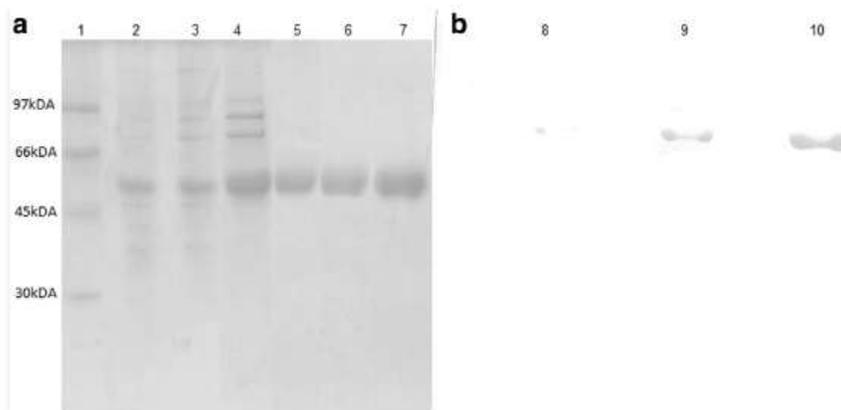
<sup>c</sup> Control clarification at pH 6.5 without CTAB (874.0 EU/µg PspA4Pro, endotoxin reduction 32.1%)

97.8 ± 0.36% purity. In addition, the purification process successfully removed more than 99.9% of the endotoxin unities (EU) from the product (Table 2). The clarification step removed 96.5% of the EU, while centrifugation of Homogenate without CTAB removed 32.1% of the EU. Almost all EU that remained after clarification with CTAB was removed during anion exchange chromatography and cryoprecipitation at pH 4.0. The increase in EU/microgram observed in the cation exchange chromatography resulted from the loss of PspA4Pro during this step (Table 2). However, a slight EU reduction from 4.51 to 4.48 log was detected (data not shown). Figure 3 shows a representative SDS-PAGE of all purification fractions and the Western Blot of the purified protein. PspA4Pro has no enzymatic activity; thus, Western Blot and the lactoferrin binding assay were performed to verify, respectively, if PspA4Pro antigenicity and biological activity were preserved after the purification process.

### PspA4Pro binding to lactoferrin and molecular mass

After mixing PspA4Pro and human lactoferrin in different proportions, distinct peaks were observed in HPSEC: one corresponding to the PspA4Pro-lactoferrin complex (RT = 12.56 min) and the other to excess PspA4Pro (RT = 13.05 min) or excess lactoferrin (RT = 15.28 min). These results show that purified PspA4Pro maintained the capacity to bind to human lactoferrin, suggesting that biological activity was unchanged (Fig. 4). Based on the mass of human lactoferrin (80 kDa) and PspA4Pro (43 kDa), our results suggest that two PspA4Pro molecules can bind to each lactoferrin molecule (Fig. 4b), which is not in accordance with a previous calculated stoichiometry of approximately 1:1 for this binding (Senkovich et al. 2007). It is also important to notice that the PspA4Pro binding capacity was not affected by the high ionic force of the mobile phase, which contains

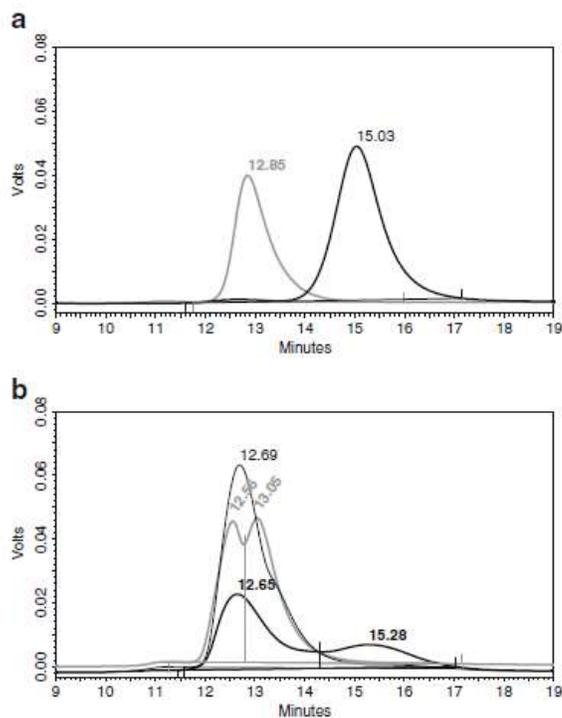
**Fig. 3** a SDS-PAGE of untagged recombinant PspA4Pro in the purification process: 1 molecular marker, 2 Homogenate, 3 CTAB Clarified fraction, 4 anion exchange chromatography fraction, 5 Cryo-pH 4.0 fraction, 6 cation exchange chromatography fraction, 7 purified PspA4Pro (10  $\mu$ g). b Western Blot of different amounts of purified PspA4Pro: 8 2  $\mu$ g, 9 5  $\mu$ g, and 10 10  $\mu$ g



Springer

2312

Appl Microbiol Biotechnol (2017) 101:2305–2317



**Fig. 4** Binding of PspA4Pro to human lactoferrin. a Two micrograms per microliter purified PspA4Pro (*gray*) and 1 mg/mL human lactoferrin (*black*). b Mixture of PspA4Pro and human lactoferrin. Two micrograms per microliter PspA4Pro and 0.5 mg/mL lactoferrin (*black*

*curve*). One microgram per microliter PspA4Pro and 1 mg/mL lactoferrin (*gray curve*). One microgram per microliter PspA4Pro and 2 mg/mL lactoferrin (*bold curve*)

300 mM NaCl and 500 mM phosphate buffer, indicating high affinity between the two molecules.

In order to calculate the PspA4Pro molecular mass, two different standard curves were prepared: one using globular proteins and the other using linear dextran polymers of different sizes (curves not shown). The theoretical mass of PspA4Pro is 43 kDa (PROTEIN CALCULATOR 2013). However, only the molecular mass calculated by the dextran standard curve was close to this value. PspA4Pro displayed a retention time of 12.85 min (Fig. 4a), which corresponds to a molecular mass of 111 kDa when calculated based on the globular protein standard curve, and 49 kDa when calculated based on the linear dextran standard curve. PspA4Pro is rich in  $\alpha$ -helix and has a coiled-coil structure, which gives it a lengthened shape, like a rod. Thus, the Stokes radius is larger and retention time is lower for PspA4Pro than for globular proteins, which results in the overestimation of PspA4Pro mass when calculated with the globular protein standard curve. These results are in accordance with previous works that characterized recombinant N-terminal fragments of PspA and found that those fragments had linear coiled-coil structures (Jedrzejewski et al. 2000; Jedrzejewski et al. 2001).

 Springer

Appl Microbiol Biotechnol (2017) 101:2305–2317

2313

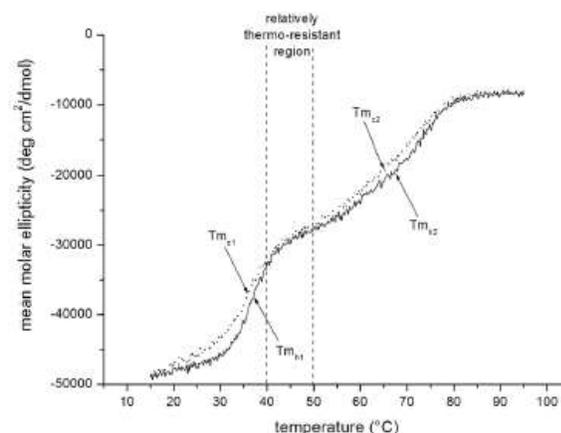
cooled (Table 3; Fig. 6). In addition, a region where PspA4Pro presented an intermediate structure that was more resistant to temperature was observed between 40 and 50 °C (Fig. 6). In order to calculate the  $T_m$ , the temperature at which the protein loses half of its original structure, the curve was divided in two parts: one between 15 and 50 °C, another between 40 and 95 °C. The similarity of  $T_m$  values obtained for heating and cooling confirms that PspA4Pro recovered its original structure after thermal treatment (Fig. 6). This property could be advantageous for downstream processing, as thermal treatment could be employed to remove contaminant proteins.

PspA4Pro also maintained its secondary structure in a wide range of pH values according to Contin and CDSSTR algorithms (Table 3). The maintenance of secondary structure in face of pH changes suggests that the PspA4Pro loss during clarification at pH 4.0 (Table 1) was due to a dragging effect of other contaminants precipitating at acid pH. Therefore, precipitation steps based on pH variation are suited for PspA4Pro purification, as long as a certain level of purity has already been reached, as found here after anion exchange chromatography.

## Secondary structure and stability of purified PspA4Pro

CD spectra were obtained to determine the secondary structure of purified PspA4Pro in the presence or absence of CTAB, during thermal treatment and at different pH values. In all spectra, two valleys were observed, with minimum values at 208 and 222 nm (Fig. 5), which suggests  $\alpha$ -helix-rich protein, as expected for the N-terminal fragment cloned, as demonstrated for N-terminal fragments of PspA from different pneumococcal strains (Jedrzejewski et al. 2000; Lamani et al. 2000; Jedrzejewski et al. 2001; Haughney et al. 2013). In the presence of CTAB, the molar ellipticity at 222 nm increased from  $-45,881$  to  $-19,739$ , which indicates a loss of  $\alpha$ -helix structure (Fig. 5). This loss, however, seems to be reversible, since the spectrum in the absence of CTAB was obtained with a PspA4Pro that was treated with CTAB at the beginning of the purification process.

The overlap of heating and cooling curves obtained at 222 nm during the thermal treatment, in which PspA4Pro was heated from 15 to 95 °C and cooled back to the initial temperature, indicates that although PspA4Pro loses  $\alpha$ -helix structures during heating, it regains its original structure when

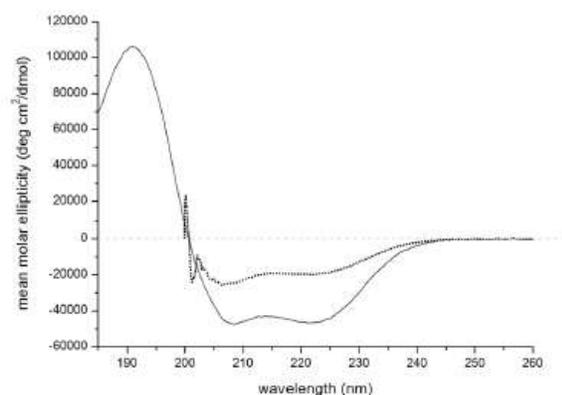


**Fig. 6** Changes in PspA4Pro molar ellipticity at 222 nm during heating (solid line) and cooling (dotted line) from 15 to 95 °C and from 95 to 15 °C, respectively, at 1 °C/min. The arrows indicate  $T_m$  during heating (*h*) and cooling (*c*) between 15 and 50 °C,  $T_{m1} = 36.781$  °C,  $T_{m1} = 35.827$  °C, and between 40 and 95 °C,  $T_{m2} = 67.501$  °C,  $T_{m2} = 65.215$  °C

flasks (Studier 2005) but was successfully adapted for bioreactor cultivation using an animal-free origin peptone to avoid

## Discussion

In industrial bioprocesses, glucose-based mineral salt media are normally used and the cell metabolism is controlled by glucose limited fed-batch to reach high cell densities and high-level recombinant protein production (Krause et al. 2016). Due to the reduced acetate formation, our group has been using glycerol as carbon source in fed-batch cultivation, and lactose instead IPTG as inducer for recombinant protein production with important results (Carvalho et al. 2012; Horta et al. 2011, 2012, 2014; Vélez et al. 2014). Another strategy explored to improve protein production was the auto-induction system, which was originally developed for shaken



**Fig. 5** Circular dichroism spectra of purified PspA4Pro in the presence (dotted line) or absence (solid line) of CTAB. Molar ellipticity from 185 to 260 nm

the risks of bovine spongiform encephalopathy transmission (Vélez et al. 2014; Campani et al. 2016). Here, we show that the auto-induction system for bioreactor cultivation has the advantage of being simpler and faster than the glycerol limited fed-batch, with higher specific production and productivity (Fig. 2). Moreover, both cultivation strategies gave similar results in downstream processing (Table 2), which means that the purification process developed is robust enough to deal with differences in the raw material.

According to WHO (2009), diphtheria CRM<sub>197</sub>, a carrier protein commonly used in pneumococcal conjugate vaccines, should present more than 90% purity. Among the purification processes of recombinant protein candidates for vaccines, a purity ranging from 90 to 95% was described (Frace et al. 1999; Zhang and Pan 2005; Cheng et al. 2009). Thus, our process is among those with higher purity.

In the purification process developed, 35% of PspA4Pro was recovered and the purity increased from 33 to 97.8%, which translates into an overall purification factor of 2.96-fold. Hou et al. (2004) devised two protocols to purify His-tagged and untagged HIV-1 reverse transcriptase, obtaining similar activities and yields in both processes. Although we did not purify tagged PspA in this work, our group described purification processes for obtaining His-tagged PspA from families 1 and 2. The first one used anion exchange chromatography and IMAC Sepharose to increase the purity of PspA from 34.9 to 96.6%, while recovering 23% of the initial PspA (Barazzone et al. 2011). The second consisted of an anion exchange chromatography, metal affinity chromatography, and a cation exchange chromatography, increasing PspA

**Table 3** Secondary structure of PspA4Pro, before and after thermal treatment, and at different pH values according to Contin and CDSSTR algorithms

Contin														
	Thermal treatment		pH											
	Non-heated	Heated	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0
α-Helix	98.7	99.1	99.1	99.2	99.2	99.1	99.2	99.1	99.2	99	99.2	99.2	99.4	98.7
β-Sheet	1.2	0.9	0.8	0.9	0.7	0.9	0.8	0.9	0.8	1.0	0.7	0.8	0.6	0.8
Twists	0.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Disordered	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5
Total	100	100	99.9	100	99.9	100	100	100	100	100	99.9	100	100	100
CDSSTR														
	Thermal treatment		pH											
	Non-heated	Heated	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0
α-Helix	82	79	80	80	78	80	74	78	73	79	82	79	81	78
β-Sheet	8	8	7	9	11	8	9	9	9	9	7	7	9	8
Twists	6	4	3	5	5	5	6	5	6	4	6	3	3	4
Disordered	4	8	10	6	7	7	9	7	10	8	7	11	8	9
Total	100	99	100	100	101	100	98	99	98	100	102	100	101	99

purity from 22.1 to 96.5% with 22% recovery (Carvalho et al. 2012). Compared to the previous processes, the present one managed to obtain higher purity and better recovery of an untagged PspA employing two precipitation steps and two chromatographic steps. Moreover, this process is cheaper than the traditional purification using His-tag for metal affinity chromatography, since the elimination of the IMAC-Sepharose would reduce 4.5 times the process cost, without taking into account the costs of the steps to remove the tag.

Another important aspect of the purification process is the LPS removal in the clarification step. The detergent CTAB has been used for cell disruption and precipitation of polysaccharides and nucleic acids (Huang and Kim 2013; Tomanee et al. 2004; Lander et al. 2002). In addition, Panda and Chakraborty (1998) demonstrated that purified LPS can bind to cationic detergents forming mixed micelles. Yoshihisa (1999) employed CTAB for LPS removal in the purification process of RTX toxin family proteins in a process where these toxins were precipitated with detergent, leaving LPS in the supernatant. However, these studies did not evaluate the capacity of CTAB to precipitate LPS and other contaminants during protein purification.

Branston et al. (2015) described LPS removal from purified Phage M13, which was precipitated three times with 2% (w/v) PEG 6000 and 500 mM NaCl with 97% yield and 90% endotoxin removal in the supernatant. After performing three new rounds of precipitation with 2% (w/v) PEG 6000, 500 mM NaCl, and 2% (v/v) Triton X-100, a 5.7 log endotoxin reduction was achieved. In contrast, we showed here that after only one precipitation step with CTAB, which was added to the crude raw material, the Homogenate, 100% of PspA4Pro was recovered in the supernatant and 96.5% of endotoxin was

removed in the precipitate (Table 2). The purification process presented in this work reached a 5.3 log endotoxin reduction. In addition, Branston and colleagues do not state if the treatment with PEG and Triton X-100 removed contaminants other than endotoxins, while the clarification step described here increased PspA4Pro purity with high recovery, removed a large quantity of endotoxins, and helped centrifugation by forming a compact pellet. Characteristics of PspA, such as high solubility and a rod shape with well-defined electronegative and electropositive regions, might have contributed to the success of CTAB in the process. Removal of LPS in early steps of the purification process is especially important, as more free binding sites are available in the anion exchange resin to interact with PspA4Pro. It is noteworthy that due to CTAB positive charge, any remaining detergent is eliminated in the non-adsorbed fraction of Q-Sepharose.

Briles et al. (2000) immunized healthy human adults with two doses of 125 µg PspA in a phase 1 clinical trial. Thus, considering 42 weeks of work in 5-L auto-induction batches and 35% final recovery, the whole process described here would produce 4.46 million doses annually, which would be enough to immunize all Brazilian newborns in 2015 (IBGE 2016) with the same dose and immunization schedule. It is worth to note that the purification process was performed with 100 g of wet biomass, so in order to purify the whole biomass produced in 5-L (around 700 g wet biomass), the process has to be scaled seven times up, which means only 7 L of Homogenate. Therefore, this volume can be processed using fundamentally the same equipment as described here and no major problems are envisaged. In addition, scaling up ion exchange chromatography is extensively studied and easily done by increasing diameter or height

of the column (Rathore and Velayudhan 2003; Al-Jibbouri 2006).

In conclusion, the auto-induction simple batch provides higher PspA4Pro specific production and productivity than the glycerol limited fed-batch. The purification process developed for untagged PspA4Pro is simple, easy to scale up, and adequate for vaccine production. The purification strategy adopted here allowed us not only to obtain a superior purity and yield in comparison to our previous works but also to eliminate >99.9% of the LPS. The protein displayed a CD spectrum that resembled previously reported spectra. The purified PspA4Pro was stable in a wide range of pH values and temperatures and maintained its capacity to bind human lactoferrin.

**Acknowledgments** The authors would like to thank Milena Apetito Akamatsu and Bianca Pereira Carvalho Holanda for performing endotoxin quantification and the Sao Paulo Research Foundation for financial support (FAPESP grant numbers 2012/04858-7, 2015/06255-6 and 2015/10.291-8). Douglas B. Figueiredo receives a scholarship from CNPq (140573/2015-1). Gilson Campani Jr. received a scholarship from FAPESP (2011/16605-3). Stefanie Krashowetz, Rafaela T. Zanardo, Mauricio P. Santos, and Gabriel G. Silva received scholarships from CAPES.

#### Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

#### References

- Al-Jibbouri S (2006) Scale-up of chromatographic ion-exchange processes in biotechnology. *J Chromatogr A* 1116:135–142. doi:10.1016/j.chroma.2006.03.033
- Armau J, Lauritzen C, Petersen GE, Pedersen J (2006) Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein Expression and Purif* 48:1–13. doi:10.1016/j.pep.2005.12.002
- Bang FBA (1956) Bacterial disease of *Limulus polyphemus*. *Bull Johns Hopkins Hosp* 98:325–351
- Banki MR, Gemgross TU, Wood DW (2005) Novel and economical purification of recombinant proteins: intein-mediated protein purification using *in vivo* polyhydroxybutyrate (PHB) matrix association. *Protein Sci* 14:1387–1395. doi:10.1110/ps.041296305
- Barazzone GC, Carvalho RJ, Kraschowetz S, Horta ACLH, Silva AJ, Zangirolami TC, Goulart C, Leite CCL, Tanizaki MM, Gonçalves VM, Cabrera-Crespo J (2011) Production and purification of recombinant fragment of pneumococcal surface protein A (PspA) in *Escherichia coli*. *Procedia Vaccinol* 4:27–35. doi:10.1016/j.provac.2011.07.005
- Bell MR, Engleka MJ, Malik A, Strickler JE (2013) To fuse or not to fuse: what is your purpose? *Protein Sci* 22:1466–1477. doi:10.1002/pro.2356
- Branston SD, Wright J, Keshavarz-Moore E (2015) A non-chromatographic method for the removal of endotoxins from bacteriophages. *Biotechnol and Biochem* 112:1714–1719. doi:10.1002/bit.25571
- Brazilian Institute of geography and Statistics (IBGE) available at <<http://brasilensintese.ibge.gov.br/populacao/taxas-brutas-de-natalidade.html>> Accessed 01 July 2016.
- Briles DE, Hollingshead SK, King J, Braun PA, Park MK, Ferguson LM, Nabors GS (2000) Immunization of humans with recombinant pneumococcal surface protein a (rPspA) elicits antibodies that passively protect mice from infection with *Streptococcus pneumoniae* bearing heterologous PspA. *J Infect Dis* 186:1694–1701. doi:10.1086/317602
- Briles DE, Hollingshead SK, Paton JC, Ades EW, Novak L, van Ginkel FW, Benjamin WH Jr (2003) Immunizations with pneumococcal surface protein A and pneumolysin are protective against pneumonia in a murine model of pulmonary infection with *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* 188:339–348. doi:10.1086/376571
- Campani G, Santos MP, Silva GG, Horta ACL, Badino AC, Giordano RC, Gonçalves VM, Zangirolami TC (2016) Recombinant protein production by engineered *Escherichia coli* in a pressurized airlift bioreactor: a techno-economic analysis. *Chem Eng Process Process Intensif*. doi:10.1016/j.cep.2015.10.020
- Carvalho RJ, Cabrera-Crespo J, Tanizaki MM, Gonçalves VM (2012) Development of production and purification processes of recombinant fragment of pneumococcal surface protein A in *Escherichia coli* using carbon sources and chromatography sequences. *Appl Microbiol Biotechnol* 94:683–694. doi:10.1007/s00253-011-3649-9
- Cheng Y, Feng Y, Luo P, J G, Yu S, Zhang W, Liu Y, Wang Q, Zou Q, Mao X (2009) Fusion expression and immunogenicity of EHEC EspA-Stx2A1 protein: implications for vaccine development. *J Microbiol (Seoul, Repub Korea)* 47:498–505. doi:10.1007/s12275-009-0116-8
- Coral MCV, Fonseca N, Castaneda E, Di Fabio JL, Hollingshead JK, Briles DE (2001) Pneumococcal surface protein A of invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates from Colombian children. *Emerg Infect Dis* 7:832–836. doi:10.3201/eid0705.017510
- Croncy CM, Coats MT, Nahm MH, Briles DE, Crain MJ (2012) PspA family distribution, unlike capsular serotype, remains unaltered following introduction of the heptavalent pneumococcal conjugate vaccine. *Clin Vaccine Immunol* 19:891–896. doi:10.1128/CVI.05671-11
- Darieux M, Moreno AT, Ferreira DM, Pimenta FC, de Andrade AL, Lopes AP, Leite LCC, Miyaji EM (2008) Recognition of pneumococcal isolates by antisera raised against PspA fragments from different clades. *J Med Microbiol* 57:273–278. doi:10.1099/jmm.0.47661-0
- France AM, Klimov AI, Rowe T, Black RA, Katz JM (1999) Modified M2 protein produce heterotypic immunity against influenza A virus. *Vaccine* 18:2237–2244
- Goulart C, Darieux M, Rodriguez D, Pimenta FC, Brandileone MCC, Andrade ALSS, Leite LCC (2011) Selection of family 1 PspA molecules capable of inducing broad-ranging cross-reactivity by complement deposition and opsonophagocytosis by murine peritoneal cells. *Vaccine* 29:1634–1642. doi:10.1016/j.vaccine.2010.12.074
- Haughney A, Petersen LK, Schoofs AD, Ramer-Tait AE, King JD, Briles DE, Wannemuehler MJ, Narasimhan B (2013) Retention of structure, antigenicity and biological function of pneumococcal surface protein A (PspA) released from polyanhydride nanoparticles. *Acta Biomater* 9:8262–8271. doi:10.1016/j.actbio.2013.06.006
- Hollingshead SK, Becker R, Briles DE (2000) Diversity of PspA: mosaic genes and evidence for past recombination in *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 68:5889–5900
- Horta ACL, Silva AJ, Sargo CR, Gonçalves VM, Zangirolami TC, Giordano RC (2011) Robust artificial intelligent tool for automatic start-up of the supplementary medium feeding in recombinant *E. coli* cultivations. *Bioprocess Biosyst Eng* 34(7):891–901. doi:10.1007/s00449-011-0540-0
- Horta ACL, Sargo CR, Silva AJ, Gonzaga MC, Santos MP, Gonçalves VM, Zangirolami TC, Giordano RC (2012) Intensification of high cell-density cultivations of *rE. coli* for production of *S. pneumoniae* antigenic surface protein, PspA3, using model-based adaptive control. *Bioprocess Biosyst Eng* 35:1269–1280. doi:10.1007/s00449-012-0714-4

- Horta ACL, Silva AJ, Sargo CR, Vêlez AM, Gonzaga MC, Gonçalves VM, Giordano RC, Zangirolami TC (2014) A supervision and control tool based on artificial intelligence for high cell density cultivations. *Braz J Chem Eng* 31:457–468
- Hou EW, Prasad R, Beard WA, Wilson SH (2004) High-level expression and purification of untagged and histidine-tagged HIV-1 reverse transcriptase. *Protein Expr Purif* 34:75–86. doi:10.1016/j.pep.2003.10.018
- Huang WC, Kim JD (2013) Cationic surfactant-based method for simultaneous harvesting and cell disruption of a microalgal biomass. *Bioresour Technol* 149:579–581. doi:10.1016/j.biortech.2013.09.095
- Jedrzejas MJ, Hollingshead SK, Lebowitz J, Chantalat L, Briles DE, Lamani E (2000) Production and characterization of the functional fragment of pneumococcal surface protein A. *Arch Biochem Biophys* 373:116–125. doi:10.1006/abbi.1999.1544
- Jedrzejas MJ, Lamani E, Becker RS (2001) Characterization of selected strains of pneumococcal surface protein A. *J Bio Chem* 276:33121–33128. doi:10.1074/jbc.M103304200
- Krause M, Neubauer A, Neubauer P (2016) The fed-batch principle for the molecular biology lab: controlled nutrient diets in ready-made media improve production of recombinant protein in *Escherichia coli*. *Microb Cell Factories* 15:110–123. doi:10.1186/s12934-016-0513-8
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:682–685
- Lamani E, McPherson DT, Hollingshead SK, Jedrzejas MJ (2000) Production, characterization, and crystallization of truncated forms of pneumococcal surface protein A from *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 20:379–388. doi:10.1006/prep.2000.1320
- Lander RJ, Winters MA, Meacle FJ, Buckland BC, Lee AL (2002) Fractional precipitation of plasmid DNA from lysate by CTAB. *Biotechnol Bioeng* 79:776–784. doi:10.1002/bit.10335
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr RH (1951) Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Bio Chem* 193:265–275
- Lu W, Sun Z, Tang Y, Chen J, Tang F, Zhang J, Liu J (2011) Split intein facilitated tag affinity purification for recombinant proteins with controllable tag removal by inducible auto-cleavage. *J Chromatogr A* 1218:2553–2560. doi:10.1016/j.chroma.2011.02.053
- Ludwig C, Wear MA, Walkinshaw MD (2010) Streamlined, automated protocols for the production of milligram quantities of untagged recombinant human cyclophilin-A (hCyoA) and untagged human proliferating cell nuclear antigen (hPVNA) using ÄKTExpress™. *Protein Expr Purif* 71:54–61
- McCool TL, Cate TR, Moy G, Weiser JN (2002) The immune response to pneumococcal proteins during experimental human carriage. *J Exp Med* 195:359–365
- Mirza S, Hollingshead SK, Benjamin WH Jr, Briles DE (2004) PspA protects *Streptococcus pneumoniae* from killing by apolactoferrin, and antibody to PspA enhances killing of pneumococci by apolactoferrin [corrected]. *Infect Immun* 72:5031–5040. doi:10.1128/IAI.72.9.5031-5040.2004
- Moreno AT, Oliveira ML, Ferreira DM, Ho PL, Darrieux M, Leite LC, Ferreira JM Jr, Pimenta FC, Andrade AL, Miyaji EM (2010) Immunization of mice with single PspA fragments induces antibodies capable of mediating complement deposition on different pneumococcal strains and cross-protection. *Clin Vaccine Immunol* 17:439–446. doi:10.1128/CVI.00430-09
- Oliveira MLS, Miyaji EN, Ferreira DM, Moreno AT, Ferreira PCD, Moreno AT, Ferreira PCD, Lima FA, Santos FL, Sakauchi MA, Takata CS, Higashi HG, Raw I, Kubrusly FS, Ho PL (2010) Combination of pneumococcal surface protein A (PspA) with whole cell pertussis vaccine increases protection against pneumococcal challenge in mice. *PLoS One* 5(5):e10863
- Panda AK, Chakraborty AK (1998) Interaction of mixed surfactants with bacterial lipopolysaccharide. *J Colloid Interface Sci* 203:260–264. doi:10.1006/jcis.1998.5505
- Pichon B, Ladhani SN, Slack MP, Seconds-Pichon A, Andrews NJ, Waight PA, Miller E, George R (2013) Changes in molecular epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* causing meningitis following introduction of pneumococcal conjugate vaccination in England and Wales. *J Clin Microbiol* 51:820–827. doi:10.1128/JCM.01917-12
- PROTEIN CALCULATOR V3.4 (2013) available at < <http://protecalc.sourceforge.net/> > Accessed 01 June 2016
- Qian J, Yao K, Xue L, Xie G, Zheng Y, Wang C, Shang Y, Wang H, Liu L, Li C, Ji W, Wang Y, Xu P, Yu S, Tang YW, Yang Y (2012) Diversity of pneumococcal surface protein A (PspA) and relation to sequence typing in *Streptococcus pneumoniae* causing invasive disease in Chinese children. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31:217–223. doi:10.1007/s10096-011-1296-9
- Rathore AS, Velayudhan A (2003) Scale-up and optimization in preparative chromatography. principles and biopharmaceutical applications. Marcel Dekker Inc., New York
- Ren B, McCroy MA, Pass C, Bullard DC, Ballantyne CM, Xu Y, Briles DE, Szalai AJ (2004) The virulence function of *Streptococcus pneumoniae* surface protein A involves inhibition of complement activation and impairment of complement receptor-mediated protection. *J Immunol* 173:7506–7512
- Senkovich O, Cook WJ, Mirza S, Hollingshead SK, Protasecch II, Briles DE, Chattopadhyay D (2007) Structure of a complex of human lactoferrin N-lobe with pneumococcal surface protein A provides insight into microbial defense mechanism. *J Mol Biol* 370:701–713. doi:10.1016/j.jmb.2007.04.075
- Shi C, Tarimala A, Meng Q, Wood DW (2014) A general purification platform for toxic proteins based on intein trans-splicing. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:9425–9435. doi:10.1007/s00253-014-6080-1
- Sreerama N, Woody RW (2000) Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal Biochem* 287:252–260. doi:10.1006/abio.2000.4880
- Studier FW (2005) Protein production by auto-induction in high density shaking culture. *Protein Expr Purif* 41:313–322. doi:10.1016/j.pep.2005.01.016
- Tomancec P, Hsu JT, Yoichiro I (2004) Fraction of protein, RNA and plasmid DNA in centrifugal precipitation chromatography using cationic surfactant CTAB containing inorganic salts NaCl and NH<sub>4</sub>Cl. *Biotechnol Bioeng* 88:52–59. doi:10.1002/bit.20203
- Vêlez AM, Silva AJ, Horta AC, Sargo AC, Campani G, Gonçalves GS, Lima RCG, Zangirolami TC (2014) High-throughput for penicillin G acylase production in *E. coli* fed-batch cultivations. *BMC Biotechnol* 14:6. doi:10.1186/1472-6750-14-6
- Walker CLW, Rudan I, Liu L, Nair H, Theodoratou E, Bhutta ZA, O'Brien KL, Campbell H, Blackt RE (2013) Global burden of childhood pneumonia and diarrhea. *Lancet* 381:1405–1416. doi:10.1016/S0140-6736(13)60222-6
- Wear MA, Patterson A, Malone K, Dunsmore C, Turner NJ, Walkinshaw (2005) A surface plasmon resonance-based assay for small molecule inhibitors of human cyclophilin A. *Anal Biochem* 345:214–226. doi:10.1016/j.ab.2005.06.037
- Whitmore L, Wallace BA (2004) DICHROWEB: an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Res* 32:668–673. doi:10.1093/nar/gkh371
- World Health Organization (2009) Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of pneumococcal conjugate vaccines. WHO press, World Health Organization, Geneva, Switzerland. Available at <http://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/pneumo/en/>

- Wu J, Filutowicz M (1999) Hexahistidine (His6)-tag dependent protein dimerization: a cautionary tale. *Acta Biochim Pol* 46:591–599
- Yoshihisa H (1999) Process for producing vaccine for bacterial toxin belonging to RTX toxin family. Canadian patent number CA 02109233
- Zhang D, Pan W (2005) Evaluation of three *Pichia pastoris*-expressed *Plasmodium falciparum* merozoite proteins as a combination vaccine against infection with blood-stage parasites. *Infect Immun* 73: 6530–6536. doi:10.1128/IAI.73.10.6530-6536.2005