



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Instituto de Microbiologia Prof. Paulo Góes

IVNA ALANA FREITAS BRASILEIRO DA SILVEIRA

**OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO
IMUNOLÓGICA DE VACINAS CONJUGADAS DE POLISSACARÍDEO
MENINGOCÓCICO SOROGRUPO C
COM TOXÓIDE TETÂNICO**

Rio de Janeiro

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Ivna Alana Freitas Brasileiro da Silveira

Obtenção, caracterização físico-química e avaliação imunológica de vacinas conjugadas de polissacarídeo meningocócico sorogrupo C com toxóide tetânico

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Título de Doutor em Imunologia

Orientador: Prof. Dr. José Mauro Peralta

Rio de Janeiro

Março/2007

Silveira, Ivna Alana Freitas Brasileiro da.

Obtenção, caracterização físico-química e avaliação imunológica de vacinas conjugadas de polissacarídeo meningocócico sorogrupo C com toxóide tetânico/ Ivna Alana Freitas Brasileiro da Silveira. - Rio de Janeiro: UFRJ / IMPPG, 2007.

xx, 172 f.: il.; 31 cm.

Orientador: José Mauro Peralta

Tese (doutorado) – UFRJ/ Instituto de Microbiologia Professor Paulo Góes/ Programa de Pós-Graduação em Imunologia, 2007.

Referências Bibliográficas: f. 141-172.

1. Vacina Conjugada 2. *Neisseria meningitidis* grupo C. 3. Aminoácido redutivo modificada. 4. Resposta Humoral. 5. Resposta Celular. – Teses. I. Peralta, José Mauro. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Microbiologia Prof. Paulo Góes, Programa de Pós-Graduação em Imunologia. III. Título.

Trabalho realizado no Laboratório de
Tecnologia Bacteriana, Vice-Diretoria
de Desenvolvimento Tecnológico de
Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo
Cruz

Para meu pai Mesquita, minhas irmãs Adélia e Ivsa e minhas “mães” Balbina, Áurea e Bebel (*in memoriam*), Reinalice, Ieda, Sonia e Romilda, com amor...

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. José Mauro Peralta por sua orientação, conselhos e sugestões para a melhoria do trabalho e pela oportunidade de contar com sua experiência científica
- À Dra. Ellen Jessouroun pela parceria de tantos anos, estímulo constante para o meu aprimoramento profissional e pessoal, amizade, realização dos ensaios de atividade bactericida e idéia inicial para o desenvolvimento deste projeto
- Ao Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) da Fundação Oswaldo Cruz, pela oportunidade concedida para o desenvolvimento deste projeto, que é de extrema importância na área de Saúde Pública do país
- Ao Dr. Carl Frasch pela parceria, críticas e sugestões sobre o projeto
- Ao Dr. Robert Lee Che-Hung do CBER/FDA, nos Estados Unidos, pela colaboração, incentivo e ensinamentos sobre a reação de conjugação
- À Lígia Peçanha pela revisão e sugestões de melhoria da tese e pelos ensinamentos que contribuíram para a minha formação em Imunologia
- À Renata Chagas Bastos pela longa parceria na padronização de várias etapas e realização de ensaios físico-químicos, de fundamental importância no desenvolvimento do projeto
- Ao Milton Neto da Silva pela parceria na realização de várias etapas do trabalho, interpretação dos espectros de RMN e ensinamentos na área, que foram de fundamental importância para a caracterização das moléculas
- À Maria de Lourdes Leal e William Cláudio pela amizade e realização dos ensaios fermentativos para obtenção dos polissacarídeos
- Ao Ruy Porto pela convivência e realização dos ensaios de purificação dos polissacarídeos
- À Andréa Larangeira, Edson Fernandes e Denise Pereira pela realização dos ensaios imunoenzimáticos
- À amiga Solange Fernandes pelo carinho e realização dos ensaios de atividade bactericida
- À Solange Pereira pela amizade, convivência e participação em algumas análises
- Às amigas Sonia de Castro Abreu, Adenilza Belo, Nilda pelo constante apoio, convívio e incentivo
- À mais recente amiga Elza Scott pelas palavras de conforto, sugestão para utilização do ensaio fotométrico de detecção do resíduo de cianeto, formatação dos gráficos com perfil cromatográfico e outras opiniões sobre o projeto
- À toda a equipe do Laboratório de Tecnologia Bacteriana que contribuiu diretamente e indiretamente para a realização deste trabalho

- Aos Laboratórios de Controle Físico-Químico, Controle Biológico e Microbiológico de Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, pela realização de ensaios de controle de processo e do produto final

- À Carla Wolanski da Divisão de Controle de Processos do Departamento de Vacinas Bacterianas de Bio-Manguinhos, pelo apoio e realização do ensaio de avaliação do resíduo de ADH

- À toda a equipe do Departamento de Vacinas Bacterianas de Bio-Manguinhos, em especial à amiga Elaine Maria Teles, pela amizade e apoio constante

- Ao Joel Majerowicz, Rodrigo Muller, Fernanda Rimolli e toda a equipe do Laboratório de Experimentação Animal de Bio-Manguinhos, pela fotografia do camundongo imunizado, pelo constante apoio e inoculação dos animais nos ensaios de soroneutralização

- Ao Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear de Far-Manguinhos da Fundação Oswaldo Cruz, pela realização das análises de RMN

- Ao Prof. Krishnaswamy Rajagopal do Laboratório de Termodinâmica e Cinética Aplicada (LATCA/EQ) da Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, pela realização das análises de espectroscopia de espalhamento de luz para detecção do peso molecular do polissacarídeo nativo

- À Kátia Antunes do Laboratório de Contaminantes do Departamento de Química, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz, pela validação do método de polarografia

- À Lília Seródio do Instituto Vital Brasil, pela amizade, sugestões e discussão na interpretação dos ensaios de soroneutralização

- Ao Departamento de Imunologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz, pelo fornecimento dos reagentes e POP para a realização do ensaio de soroneutralização

- À Fátima Gomes pela colaboração e fornecimento do protocolo e materiais para a realização dos ensaios de ELISPOT

- À Cláudia Barroso, pela amizade, ensinamentos e fornecimento inicial de meios de cultura para os ensaios com as células linfóides

- Ao Josué pela leitura das placas de ELISPOT

- À Ana Paula dos Santos pela convivência e sugestões no protocolo experimental utilizado nos ensaios de citometria

- Ao Zilton Vasconcelos pela amizade, convivência dos últimos meses, sugestões, realização das análises de marcação intracelular e de superfície no citômetro e interpretação dos resultados

- À Adriana Bonomo pela convivência, ensinamentos, discussão de resultados, sugestões e por ter despertado minha atual paixão pela Imunologia
- Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Sorologia, Departamento de Imunologia do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, pela convivência agradável e sugestões sobre o trabalho
- Aos queridíssimos amigos Flávia Barroca, Mário Brasileiro, Victor de Angelis e Leila Carvalho Campos, pelo estímulo constante na minha vida profissional e pessoal, pelo amor e carinho, pela convivência maravilhosa.

Oração da Serenidade
(Autor desconhecido)

Deus,
Conceda-me Serenidade
Para aceitar as coisas que não posso modificar
Coragem para modificar aquelas que posso
E Sabedoria para reconhecer a diferença.

RESUMO

Neisseria meningitidis é um dos principais patógenos causadores de meningite e outras manifestações clínicas no mundo. O sorogrupo C é responsável por 40% dos casos de doença meningocócica no Brasil, constituindo um sério problema de Saúde Pública. As vacinas polissacarídicas disponíveis não induzem proteção e memória imunológica em lactentes, porque são antígenos T-independentes. Além disto, este polissacarídeo pode induzir tolerância imunológica após imunização repetida em crianças e adultos. Para a obtenção de um antígeno T-dependente, foram desenvolvidas todas as etapas de produção, purificação e controle de uma vacina conjugada brasileira efetiva, contra *N.meningitidis* sorogrupo C (MenPSC-TT), através de aminação redutiva modificada, utilizando como proteína carreadora, o toxóide tetânico ativado com hidrazida. Vários lotes de conjugados produzidos em diferentes escalas (200 a 20.000 doses humanas; 10µg/dose), sob condições reprodutíveis, apresentaram razões açúcar:proteína entre 0,3 e 0,5. Os resultados dos ensaios de controle de qualidade mostraram a eficiência do processo de purificação (sistema de ultrafiltração tangencial) na remoção de reagentes, sub-produtos de reação e polissacarídeo livre. Um lote piloto de vacina liofilizada apresentou resultados de controle de qualidade satisfatórios, incluindo segurança e estabilidade por mais de 2 anos após envase e liofilização. A vacina piloto foi imunogênica em camundongos de forma dose-dependente, com um aumento de 10 a 20 vezes nos títulos de IgG, principalmente das sub-classes IgG1 e IgG2b (títulos mais altos após a 1ª dose; ANOVA, $p < 0,05$) e sem a detecção de IgG2a. Estes anticorpos apresentaram títulos altos de atividade bactericida (SBA), correlacionáveis com proteção à doença meningocócica. A vacina induziu anticorpos com maiores índices de avididade nas concentrações de 0,1 e 1µg, sugerindo indução de memória imunológica. Foi encontrada uma alta correlação entre ELISA e atividade bactericida do soro ($r = 0,91$), enquanto a correlação entre ELISA de alta avididade e SBA foi mais baixa ($r = 0,70$). Camundongos imunizados em esquema primário com 2 ou 3 doses da vacina conjugada MenPSC-TT (grupo 1) e MenPSC nativo (grupo 2) receberam dose reforço com o conjugado, para a análise de resposta de memória. Nas amostras de soro do grupo 1 imunizados com 2 ou 3 doses foram detectados títulos de IgG mais elevados, principalmente do isotipo IgG1, sugerindo o reconhecimento do polissacarídeo nativo através da ativação de células B de memória. Além disto, a vacina conjugada induziu anticorpos anti-TT capazes de proteger camundongos contra o desafio com toxina tetânica *in vivo*. Camundongos inoculados com diferentes lotes de conjugados sobreviveram ao desafio com uma cepa heteróloga sorogrupo C, apresentando mais que 85% de proteção, enquanto apenas 20% dos animais imunizados com MenPSC nativo sobreviveram. Estes resultados sugerem a manutenção de resposta humoral ao imunógeno durante um ano. A vacina também foi estudada para avaliação de células secretoras de anticorpos específicas do antígeno de curta e longa duração no baço e medula óssea, 1 ano após imunização primária. A resposta observada para o grupo imunizado com MenPSC-TT foi maior do que àquela induzida pelo MenPSC nativo, no baço (2.900 vs 450 por 1×10^7 células) e medula (6.850 vs 567 por 1×10^7 células; $p < 0,05$). A produção de citocinas intracelular (IL-4, IL-10, IL-12, IFN- γ) analisada por citometria de fluxo não mostrou diferença significativa entre camundongos imunizados e grupos controle. O mesmo aconteceu quando o imunofenotipo de células T (CD4, CD8, CD69 and CD44) foi analisado. Entretanto, uma população de célula linfóide de memória (CD27⁺IgD⁻) foi detectada, em animais imunizados com 3 doses de MenPSC-TT, e desafiados com uma cepa heteróloga. Estes resultados demonstram a imunogenicidade e segurança da vacina conjugada MenPSC-TT e sustentam a produção de lotes vacinais em condições de Boas Práticas de Fabricação para a realização de estudos clínicos de Fase I.

ABSTRACT

Neisseria meningitidis is one of the most important pathogens causing meningitis and other clinical manifestations around the world. The serogroup C causes around 40% of all meningococcal diseases in Brazil, becoming a serious public health problem. The polysaccharide vaccines available do not appear to provide protection in infancy or immunologic memory as measured by antibody responses because they are T-independent antigens. In addition, this polysaccharide may induce immunological tolerance after inoculation of repeated doses in adults and children. In order to obtain a T-dependent antigen, it was developed all steps to produce, purify and control an effective Brazilian serogroup C protein-polysaccharide conjugate vaccine (MenCPS-TT) by modified reductive amination. Hydrazide-activated tetanus toxoid was used as carrier protein. Several MenCPS-TT conjugate lots were produced at different scales (from 200 to 20,000 human doses; 10µg/dose) under reproducible conditions and showed sugar:protein ratios from 0.3 to 0.5. The results of quality control assays showed the efficiency of purification process used (tangential flow ultrafiltration) in the removal of reagents, by-products and unconjugated polysaccharide. One freeze-dried pilot vaccine lot showed satisfactory quality control results including safety and stability for more than 2 years after filling and freeze-drying. This pilot vaccine was immunogenic in mice in a dose-dependent fashion generating a 10 to 20-fold rise in IgG response. This IgG response was characterized by high titers of IgG1 and IgG2b isotypes and no detection of IgG2a. After the first dose, the IgG2b titers were significantly higher than the IgG1 titers (ANOVA, $p < 0.05$). The vaccine also induced high SBA titers which are correlated with protection against meningococcal disease. Vaccine concentrations of 1µg and 0.1µg showed higher avidity indice, suggesting induction of immunologic memory. A high correlation between ELISA and SBA ($r = 0.91$) was found while the correlation between high-avidity ELISA and SBA was lower ($r = 0.70$). Mice that received primary immunization with 2 or 3 doses of MenCPS-TT (group 1) and native MenCPS (group 2) were boosted with the native MenCPS to analyze memory response. Serum samples of group 1 immunized with 2 or 3 doses showed higher IgG titers mainly of isotype IgG1, suggesting recognition of native polysaccharide by activation of memory B-cell. In addition, MenCPS-TT conjugate vaccine induced antibodies anti-TT capable to protect mice against a challenge with tetanus toxin *in vivo*. Mice inoculated with different conjugate lots survived from challenge with a heterologous group C strain (> 85% of protection), while only 20% of the animals immunized with native MenCPS survived. These data suggest the maintenance of antigen-specific humoral response for long period. The vaccine was also studied in ELISPOT assays to measure antigen-specific short- and long-lived antibody-secreting cells present in spleen and bone marrow, respectively, 1 year after primary immunization. The magnitude of the response was greater in the MenCPS-TT-immunized group than in plain MenCPS-immunized group for spleen (2,900 vs 450 per 1×10^7 cell) and bone marrow cells (6,850 vs 567 per 1×10^7 cell; $p < 0.05$). The intracellular cytokine production (IL-4, IL-10, IL-12, IFN- γ) analyzed by flow cytometry did not show significant differences among immunized mice and control mice groups. The same results were observed when the T cells immunophenotype (CD4, CD8, CD69 and CD44) was analyzed. However, a memory lymphoid-cell population (CD27⁺IgD⁻) was detected by flow cytometry in animals immunized with 3 doses of MenCPS-TT and challenged with a heterologous group C strain (ANOVA, $p < 0.05$). These results demonstrate the immunogenicity and safety of MenCPS-TT conjugate vaccine and support the production of vaccine lots in GMP conditions for Phase I clinical trials.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Incidência (por 100.000 habitantes) da doença meningocócica no Brasil entre 1971 e 2004 (Fonte: Ministério da Saúde)	29
Figura 2. Número de casos da doença meningocócica causada pelos grupos A, B e C no Brasil (casos com grupo conhecido), entre 1995-2005 (Fonte: Ministério da Saúde, Fundação Nacional da Saúde, COVER, CENEPI).	30
Figura 3. Percentual cumulativo dos casos de meningite meningocócica causada pelo sorogrupo C no Brasil entre 1998-2003, por faixa etária (Fontes: GT Meningite, COVER, CENEPI, Fundação Nacional de Saúde)	30
Figura 4. Fluxograma esquemático da ativação do polissacarídeo nativo para produção da vacina conjugada contra <i>N.meningitidis</i> sorogrupo C	56
Figura 5. Fluxograma esquemático da ativação do toxóide tetânico para produção da vacina conjugada contra <i>N.meningitidis</i> sorogrupo C	58
Figura 6. Fluxograma esquemático da produção da vacina conjugada contra <i>N.meningitidis</i> sorogrupo C	61
Figura 7. Peso em gramas de um camundongo imunizado por via intra-muscular com 3 doses da vacina conjugada MenPSC-TT (lote 40; 20.000 doses), mantido no infectório durante 1 ano e desafiado com suspensão bacteriana	72
Figura 8. Espectro ¹ HRMN 1D do MenPSC nativo - 500 MHz, 37°C	81
Figura 9. Esquemas reacionais da ativação do MenPSC nativo, TT e da conjugação entre o MenPSC ativado e TTH por aminação redutiva	82
Figura 10. Espectro ¹ HRMN 1D do MenPSC ativado após oxidação com periodato de sódio - 500 MHz, 37°C	83
Figura 11. Perfil de eluição do MenPSC nativo, MenPSC oxidado não purificado (NP) e MenPSC oxidado purificado (P), em cromatografia de exclusão (TSK 4000 Pwxl; 206 nm)	84
Figura 12. Perfil de eluição do TT nativo (lote 04/01) e do TT ativado (TTH; lote 08/03) em cromatografia de exclusão (TSK 4000 Pwxl; 280 nm)	85
Figura 13. Perfis de eluição do conjugado MenPSC-TT não purificado (NP), conjugado MenPSC-TT purificado (P), MenPSC ativado e TT ativado (TTH) em cromatografia de exclusão (TSK 4000 Pwxl; 206 e 280 nm)	86
Figura 14. Espectro ¹ HRMN 1D do MenPSC conjugado - 500 MHz, 37°C	87
Figura 15. Perfis de eluição de diferentes lotes da vacina conjugada MenPSC-TT, obtidos em escala de 20.000 doses, MenPSC ativado e TT ativado (TTH) em cromatografia de exclusão (TSK 4000 Pwxl; 280 nm)	88

Figura 16. Dosagem de IgG total de camundongos imunizados por via intramuscular com 3 doses de conjugados obtidos em escalas de 200 e 2.000 doses humanas, em intervalo de 21 dias	92
Figura 17. Atividade bactericida do soro (SBA) de camundongos imunizados por via intra-muscular com 3 doses de conjugados obtidos em escalas de 200 e 2.000 doses humanas, em intervalo de 21 dias. Cepa heteróloga 1002/90 de <i>N.meningitidis</i> sorogrupo C	93
Figura 18. Isotipos de anticorpos IgG anti-MenPSC (ELISA) de camundongos imunizados por via intra-muscular com 3 doses (1 µg/dose) da vacina conjugada MenPSC-TT, em intervalos de 15 dias (lote 40)	95
Figura 19. Gráfico representativo do cálculo dos índices de avides (IAs) de anticorpos IgG anti-MenPSC (ELISA) camundongos imunizados por via intramuscular com 3 doses de diferentes conjugados MenPSC-TT (lotes 29 e BR06)	96
Figura 20. Avides de anticorpos IgG anti-MenPSC de camundongos imunizados por via intra-muscular com 3 doses de diferentes concentrações da vacina conjugada MenPSC-TT (lote 40)	97
Figura 21. Identificação de células B produtoras de IgG presentes em medula e baço de animais imunizados por via intra-muscular com 3 doses de conjugado MenPSC-TT (lote 40; 1µg/dose) ou MenPSC (5µg/dose) e PBS e desafiados 14 meses após a imunização com suspensão bacteriana, utilizando-se 8×10^5 células totais/mL, em resposta à estimulação específica (MenPSC-TT e MenPSC) e inespecífica (controle sem células) (ELISPOT)	100
Figura 22. Frequência de células B produtoras de IgG (“spots”; CPS), contra diferentes estímulos, presentes em baço de animais imunizados por via intramuscular com 3 doses do conjugado MenPSC-TT (lote 29) ou PBS, em intervalos de 21 dias e desafiados 12 meses após com suspensão bacteriana, utilizando-se diferentes concentrações de células totais (ELISPOT)	101
Figura 23. Frequência de células B produtoras de IgG (“spots”; CPS), contra diferentes antígenos, presentes em baço de animais imunizados por via intramuscular com 3 doses do conjugado MenPSC-TT (lote 30) ou PBS, em intervalos de 21 dias e desafiados 19 meses após com suspensão bacteriana, utilizando-se 8×10^5 células totais/mL (ELISPOT)	102
Figura 24. Frequência de células B produtoras de IgG (“spots”; CPS), contra diferentes antígenos, presentes na medula de animais imunizados por via intramuscular com 3 doses do conjugado MenPSC-TT (lote 30) ou PBS, em intervalos de 21 dias e desafiados 19 meses após com suspensão bacteriana, utilizando-se 8×10^5 células totais/mL (ELISPOT)	103
Figura 25. Frequência de células B produtoras de IgG (“spots”; CPS), contra	

MenPSC-TT, presentes no baço e medula de animais imunizados por via intramuscular com 3 doses da vacina conjugada MenPSC-TT liofilizada (lote 40; 1µg/dose) ou MenPSC (5µg/dose), em intervalos de 15 dias e desafiados 14 meses após a imunização com suspensão bacteriana, utilizando-se 8×10^5 células totais/mL (ELISPOT) 104

Figura 26. Percentual de sub-população de células linfóides com fenótipo de CD27⁺IgD⁻ em resposta ao conjugado MenPSC-TT, presentes no baço de animais imunizados por via intra-muscular com 3 doses da vacina conjugada MenPSC-TT liofilizada (lote 40; 1µg/dose), MenPSC (5µg/dose) ou PBS, em intervalos de 15 dias e desafiados 4 meses após a imunização, com cepa heteróloga de *N.meningitidis* sorogrupo C (N1002/90), em citometria de fluxo 105

Figura 27. Percentual de sub-população de células linfóides com fenótipo de CD27⁺IgD⁻ em resposta ao conjugado MenPSC-TT, presentes no baço de animais imunizados por via intra-muscular com 2 ou 3 doses da vacina conjugada MenPSC-TT liofilizada (Grupo 1, lote 40; 1µg/dose), MenPSC (Grupo 2, 5µg/dose) ou PBS (Grupo 4), em intervalos de 15 dias e desafiados 4 meses após a imunização, com cepa heteróloga de *N.meningitidis* sorogrupo C (N1002/90), em citometria de fluxo 106

Figura 28. Percentual de sub-população de células linfóides com fenótipo de CD27⁺IgD⁻ em resposta ao conjugado MenPSC-TT, presentes no baço de animais imunizados por via intra-muscular com 2 ou 3 doses da vacina conjugada MenPSC-TT liofilizada (lote 40; 1µg/dose), MenPSC (5µg/dose) ou PBS, em intervalos de 15 dias, em citometria de fluxo 107

Figura 29. Estabilidade da Vacina Conjugada MenPSC-TT liofilizada (lote 40) estocada durante 0, 11 e 22 meses a 4°C após envase e liofilização, avaliada através do perfil de eluição em cromatografia de exclusão (TSK 4.000 P_{WXL}; 206 nm) 108

Figura 30. Estabilidade da vacina conjugada MenPSC-TT liofilizada (lote 40) estocada durante 6, 15 e 26 meses a 4°C após envase e liofilização, avaliada pela determinação de IgG total (ELISA) no soro de animais imunizados por via intramuscular com 3 doses, em intervalos de 15 dias 109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Vacinas conjugadas mono, bi e tetravalente existentes em diferentes estágios de desenvolvimento, utilizando diversos polissacarídeos de <i>N.meningitidis</i> e proteínas carreadoras	45
Tabela 2. Características de vários lotes da vacina conjugada MenPSC-TT, obtidos em escalas de 200 (lote 26), 2.000 (lotes 28, 29 e 30) e 20.000 (lotes 37, 40 e 03/05) doses humanas (10 µg/dose)	88
Tabela 3. Testes de controle de qualidade utilizados para avaliação do conjugado MenPSC-TT (produto a granel, lote 03/05)	90
Tabela 4. Testes de controle de qualidade utilizados para avaliação da vacina conjugada MenPSC-TT liofilizada (produto final, lote 40)	91
Tabela 5. IgG total e atividade bactericida do soro (SBA) de camundongos imunizados por via intra-muscular com diferentes concentrações da vacina conjugada MenPSC-TT, em intervalos de 15 dias. Estudo dose-resposta	94
Tabela 6. Proteção de camundongos desafiados com toxina tetânica e soros de animais imunizados com diferentes vacinas conjugadas com toxóide tetânico como proteína carreadora (ensaio de soroneutralização)	98
Tabela 7. Proteção de camundongos desafiados com suspensão bacteriana após 1 ano de imunização por via intra-muscular com 3 doses de lotes de conjugados MenPSC-TT, obtidos em diferentes escalas e MenPSC, em intervalos de 15 dias	97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADH	Dihidrazida do Ácido Adípico
AEC	3-Amino-9-EtilCarbazol
Ag-Ac	Complexos Antígeno-Anticorpo
APC	Antigen Presenting cell
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BCR	B Cell Receptor
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CD	Cluster of Differentiation
CEUA	Comitê de Ética de Utilização Animal
CPS	Células Produtoras de Spots
CNBr	Brometo de Cianogênio
CRM ₁₉₇	Cross-Reacting Mutant (Toxina Diftérica não tóxica)
DE ₅₀	Dose Efetiva 50
DL ₅₀	Dose Letal 50
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DOC	Desoxicolato de Sódio
D ₂ O	Água Deuterada
DT	Difteria e Tétano
EDAC	Carbodiimida
ELISA	Ensaio imunoenzimático
ELISPOT	Ensaio enzimático de detecção de “spots”
EU/μg	Endotoxin Unit por micrograma
Fc	Receptor Fc
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
g	grama
GMP	Good Manufacturing Practices
HPAEC-PAD	High-Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed-Amperometric Detection
Hib	<i>Haemophilus influenzae</i> tipo b
¹ HRMN 1D	Ressonância Magnética Nuclear de próton uni-dimensional
IA	Índice de Aidez
IFN-γ	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IRP	Iron Regulated Protein
Lf	Limite de floculação
Ln	Logaritmo neperiano
LAL	Limulus Amebocyte Lysate
LOS	Lipooligossacarídeo
LSD	Least Square Differences
L+/10 -	Limite de morte (100%)
MAC	Membrane Attack Complex
MALLS	Multi-Angle Laser Light Scattering

MenPSC	Polissacarídeo meningocócico sorogrupo C
MenPSC-TT	Polissacarídeo Meningocócico Sorogrupo C conjugado com Toxóide
Tetânico	
mM	milimolar
M	Molar
µg	micrograma
µL	microlitro
mg	miligrama
mL	mililitro
MHz	MegaHertz
min	minuto
MVP	Meningococcal Vaccine Project
NaIO ₄	Periodato de sódio
N-CAM	Moléculas de Adesão de Células Neurais
NH ₂	Grupo amino
nm	nanômetro
NK	Natural Killer
OMV	Outer Membrane Vesicle
OMS	Organização Mundial da Saúde
Opa	Proteína de classe 5 ou proteína de opacidade
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
Opc	Proteína 5C
OPD	o-phenilenediamina
PATH	Program for Appropriate Technology in Health
PBS	Salina tamponada
PE	Ficoeritrina
PerCP	Proteína Clorofil Peridina
pH	potencial Hidrogeniônico
POP	Procedimento Operacional Padrão
ppb	parte por bilhão
ppm	parte por milhão
PRRP-TT	Polissacarídeo Poliribitol Ribosil Fosfato conjugado com toxóide
tetânico	
p/v	peso/volume
rpm	rotação por minuto
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SBA	Serum Bactericidal Activity
SFB	Soro Fetal Bovino
SNC	Soro Normal de Camundongo
ST	Sequence Type
Th	Célula T helper
TI-2	Antígeno T-independente tipo 2
TT	Toxóide Tetânico
TBS	Tampão TRIS em solução Salina
TCR	T Cell Receptor
TGF-β	Transforming growth factor-β
TSA	Tryptic Soy Agar
TTH	Toxóide Tetânico ativado com Hidrazina
TNF-α	Tumor Necrosis Factor alfa
UFC	Unidade Formadora de Colônia

UI
v/v

Unidade Internacional
volume/volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1. Características microbiológicas e patogênese dos meningococos	21
1.2. Características epidemiológicas da doença meningocócica	25
1.3. Resposta imune aos meningococos	31
1.4. Estratégias vacinais contra <i>N.meningitidis</i> grupos A, C, W135 e Y	37
1.4.1. Vacinas polissacarídicas	37
1.4.2. Vacinas polissacarídicas conjugadas	39
1.5. Métodos de conjugação	46
2. OBJETIVOS	52
2.1. Objetivo geral	52
2.1.1. Objetivos específicos	52
3. MATERIAL E MÉTODOS	54
3.1. Obtenção e caracterização dos componentes a serem conjugados	54
3.1.1. Polissacarídeo grupo C (MenPSC)	54
3.1.2. Toxóide tetânico (TT)	55
3.2. Ativação do polissacarídeo e da proteína e obtenção dos conjugados	55
3.2.1. Oxidação do polissacarídeo	55
3.2.2. Ativação da proteína	57
3.2.3. Reação de conjugação	59
3.2.4. Purificação dos conjugados	60
3.2.5. Caracterização físico-química dos conjugados	60
3.2.5.1. Teor de açúcar livre	60
3.2.5.2. Razão açúcar:proteína (mg:mg)	62
3.2.5.3. Espectroscopia ¹ H RMN 1D	62
3.2.5.4. Resíduo de ADH	62
3.2.5.5. Resíduo de cianeto	63
3.2.5.6. Controle de qualidade do produto a granel	64
3.3. Preparação de um lote piloto da vacina conjugada MenPSC-TT	64
3.3.1. Obtenção do lote piloto	64
3.3.2. Controle de qualidade do produto final	65
3.4. Avaliação imunológica dos conjugados	65
3.4.1. Imunização dos animais	65
3.4.1.1. Imunogenicidade de lotes de conjugados obtidos em menor escala	65
3.4.1.2. Estudo dose-resposta	66
3.4.2. Ensaio para determinação de títulos de anticorpos (ELISA)	65
3.4.2.1. IgG total	66
3.4.2.2. Sub-classes de IgG (IgG1, IgG2a, IgG2b)	67
3.4.2.3. Índice de avidéz	68
3.4.3. Ensaio para determinação da atividade bactericida do soro (SBA)	69
3.4.4. Ensaio de soroneutralização	69
3.4.5. Ensaio desafio	71
3.4.6. ELISPOT	72
3.4.7. Cultura de esplenócitos para marcação intracelular de citocinas e de superfície por citometria de fluxo	74
3.4.7.1. Marcação intracelular para detecção de citocinas	76
3.4.7.2. Marcação de superfície	77

3.5. Estabilidade da vacina conjugada MenPSC-TT liofilizada	78
3.6. Análises estatísticas	78
4. RESULTADOS	80
4.1. Detecção e caracterização estrutural dos componentes intermediários e conjugados	80
4.2. Testes de controle de qualidade do produto a granel e da vacina conjugada MenPSC-TT	89
4.3. Resposta humoral da vacina conjugada MenPSC-TT	91
4.3.1. Títulos de IgG induzidos contra o MenPSC e atividade bactericida do soro	91
4.3.2. Sub-classes de IgG	94
4.3.3. Índice de avidéz dos anticorpos	95
4.3.4. Ensaio de soroneutralização	97
4.3.5. Ensaio desafio	99
4.4. Resposta celular da vacina conjugada MenPSC-TT	99
4.4.1. ELISPOT	99
4.4.2. Citometria de fluxo	104
4.5. Estabilidade da vacina conjugada MenPSC-TT	107
5. DISCUSSÃO	110
6. CONCLUSÕES	139
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	141

1. INTRODUÇÃO

A doença meningocócica foi descrita desde a época de Hipócrates, que associava fortes dores de cabeça e zumbido no ouvido com inflamação no cérebro e altas taxas de mortalidade. Antes do século XIX a doença meningocócica era incluída nas doenças de manchas (“spot fevers”) que podiam ser causadas por diferentes agentes ainda desconhecidos. No entanto, o “rash” hemorrágico, a tendência de aparecimento em aglomerações e a ocorrência em surtos já eram associados à doença (CARTWRIGHT, 1995).

A doença foi descrita pela primeira vez, por Vieusseux, em 1805, quando foram definidos os primeiros sintomas clínicos. Entretanto, as alterações patológicas foram associadas a estes sintomas alguns anos mais tarde, quando se encontrou material purulento na base do cérebro, congestão nos vasos das meninges e exudato sangüíneo na superfície do cérebro de alguns casos fatais (VIEUSSEUX, 1805, apud CARTWRIGHT, 1995). O agente causador, *Neisseria meningitidis*, foi isolado pela primeira vez em 1887 por Anton Weichselbaum, que observou a bactéria no fluído cerebrospinal e deu o nome de *Diplococcus intracellularis* (apud POLLARD, 2004). Entretanto, a doença meningocócica permanece em uma posição de destaque entre as infecções bacterianas, em todo o mundo, principalmente devido à apresentação clínica dramática da doença, alta mortalidade, potencial epidêmico e o recente desaparecimento de outras importantes doenças infecciosas em países desenvolvidos, através de melhorias nos sistemas de Saúde Pública e vacinação (POLLARD & FRASCH, 2001).

1.1. Características microbiológicas e patogênese dos meningococos

Neisseria meningitidis (*N.meningitidis*), ou meningococo, pertencente à família *Neisseriaceae*, se apresenta como um diplococo Gram-negativo em forma de grão de café ou aspecto reniforme, que se divide transversalmente, o que faz com que possa se apresentar em

tétrades. Seu tamanho varia entre 0,6-1,5 μm dependendo da fonte de isolamento e da idade da cultura. Apresenta cápsula polissacarídica e fímbrias, é imóvel e não forma endosporos (VEDROS, 1984). O meningococo é um microrganismo microaerófilo que cresce preferencialmente em atmosfera com 5-10% de CO_2 , e temperatura ótima entre 35 e 37°C (VEDROS, 1984; BJUNE et al., 1991).

Os meningococos são classificados em 13 diferentes grupos (A, B, C, E-29, H, I, K, L, M, W135, X, Y, Z), de acordo com a composição e reatividade imunológica de seus polissacarídeos capsulares, que constituem o principal fator de virulência do microrganismo. Os polissacarídeos servem de base para a maioria das vacinas meningocócicas licenciadas atualmente e são capazes de induzir imunidade específica ao grupo. Por isto o conhecimento da prevalência dos grupos entre as cepas que causam infecção invasiva é de fundamental importância para formulação de vacinas (GOTSCHLICH, LIU & ARTENSTEIN, 1969; ROSENSTEIN et al., 2001; PICHICHERO, 2005).

A maior parte dos casos de doença meningocócica é causada pelos grupos A e C, contra os quais as vacinas polissacarídicas são parcialmente efetivas, e pelo grupo B que possui uma cápsula polissacarídica pouco imunogênica em humanos. Os principais polissacarídeos meningocócicos capsulares associados com doença invasiva, são compostos de derivados de ácido siálico, consistindo de unidades repetidas de mono, di ou trissacarídeos. A cápsula do grupo B consiste de unidades repetidas de ácido neuramínico N e O acetilado, com ligação glicosídica $\alpha 2 \rightarrow 8$, enquanto a cápsula do grupo C é composta também de unidades repetidas de ácido neuramínico N e O acetilado, mas com ligação glicosídica $\alpha 2 \rightarrow 9$. Por outro lado, a cápsula do grupo A consiste de unidades repetidas de N-acetilmanosamina-fosfato (BUNDLE, SMITH & JENNINGS, 1974; BHATTACHARJEE et al., 1975).

A endotoxina é o glicolípido presente em maior quantidade na membrana externa de *N.meningitidis*, assim como em outras bactérias Gram-negativas. Entretanto, a endotoxina do gênero *Neisseria* tem a porção glicídica mais curta em comparação a outras moléculas de endotoxina, porque não possui o antígeno O. Alguns autores a denominam lipooligossacarídeo (LOS) (DEVOE & GILCHRIST, 1973; VERHEUL, SNIPPE & POOLMAN, 1993; POOLMAN, 1995; PRESTON et al., 1996). O gênero *Neisseria* pode expressar um ou mais tipos de endotoxina e as diferenças estruturais da molécula de LOS determinam os 12 imunotipos diferentes de *N.meningitidis*. Os imunotipos L1 até L8 são encontrados principalmente nos grupos B e C enquanto os imunotipos L9 a L13 estão associados ao grupo A. A presença do imunotipo L8 tem sido relacionada ao aumento de sensibilidade do meningococo à atividade bactericida do soro (FRASCH, MENELIS & GOTSCHLICH, 1976; POOLMAN, VAN DER LEY & TOMASEN, 1995).

Os meningococos têm a capacidade de trocar o material genético responsável pela produção de cápsula e assim mudam do grupo B para C e vice-versa, devido à similaridade estrutural entre as duas cápsulas. Esta capacidade de mudança de cápsula pode ser um importante mecanismo de virulência, devido ao amplo uso de vacinas que induzem proteção grupo-específica (SWARTLEY et al., 1997). Desta forma, deve-se ter uma avaliação epidemiológica constante, para o controle dos grupos prevalentes, após a introdução de rotina de uma vacina contra determinado grupo.

Os seres humanos são o único reservatório de *N.meningitidis* e a nasofaringe é o sítio de colonização dos meningococos e de onde o microrganismo é transmitido por aerossol ou secreções aos outros indivíduos. Os meningococos sobrepõem as defesas do hospedeiro e atacam a superfície microvilosa de células não ciliadas de mucosa da nasofaringe, onde se multiplicam (STEPHENS, HOFFMAN & MCGEE, 1983). O pili e algumas proteínas são as principais adesinas que se ligam aos receptores do hospedeiro e estimulam a ingestão do

meningococo pelas células epiteliais (STEPHENS, HOFFMAN & MCGEE, 1983; DE VRIES et al., 1998). Os meningococos geralmente são bactérias comensais em humanos. Cerca de 5 a 15% de indivíduos adultos saudáveis são portadores assintomáticos de cepas de *N.meningitidis* na nasofaringe, onde é estabelecido um processo de imunização que resulta em resposta humoral protetora sistêmica (STEPHENS, 1999). Entretanto, os portadores assintomáticos constituem uma importante fonte de transmissão da bactéria, principalmente para crianças com menos de 2 anos de idade, que correspondem à faixa etária mais susceptível à doença (GREENFIELD, SHEEHE & FELDMAN, 1971; CAUGANT, HOIBY & MAGNUS, 1994). Em alguns indivíduos a bactéria penetra a mucosa e ganha acesso à corrente sanguínea, causando doença sistêmica que pode apresentar diferentes manifestações clínicas que variam desde pneumonia (10%); meningococemia (12,5%); epiglote, otite media, conjuntivite, uretrite (27,5%); meningite (50%); septicemia fulminante com choque séptico, falência múltipla de órgãos, coagulação sistêmica e morte (VEDROS, 1984; POOLMAN, VAN DER LEY & TOMASEN, 1995; STEVEN & WOOD, 1995, ROSENSTEIN et al., 2001).

As cepas mais virulentas de meningococos, associadas com a doença invasiva, produzem cápsula polissacarídica, que serve de proteção contra processos de dissecação durante a transmissão e permite a evasão de mecanismos de resposta imune do hospedeiro, porque se tornam resistentes à fagocitose (PETTERSSON et al., 1997). Os microrganismos que possuem cápsula polissacarídica composta de unidades de ácido siálico são ainda capazes de inibir a ativação da via alternativa de ativação do complemento.

Outro importante fator de virulência do microrganismo é a liberação de vesículas de membrana externa (OMVs), que são constituídas de LOS, proteínas de membrana externa, fosfolipídeos e polissacarídeos capsulares, para o meio, durante a fase exponencial de crescimento. Estas estruturas, que contêm todos os antígenos presentes na membrana externa,

são distribuídas pelo organismo provocando efeitos como intensa produção de citocinas e a estimulação de células inflamatórias responsáveis por vários sintomas comuns nas diferentes manifestações da doença meningocócica (ZOOILINGER et al., 1972; DEVOE, 1992; VERHEUL, SNIPPE & POOLMAN, 1993; POOLMAN, VAN DER LEY & TOMASEN, 1995).

Os meningococos sofrem autólise e liberam DNA e componentes da parede celular, os quais também induzem a cascata inflamatória. Estes mecanismos podem contribuir para a existência de clones de isolados invasivos, através da aquisição de fatores de virulência particulares ou de características antigênicas que não são reconhecidas pelo hospedeiro e assim, podem possibilitar a evasão de mecanismos imunes adaptativos.

1.2. Características epidemiológicas da doença meningocócica

A doença meningocócica tem um caráter endêmico na maioria dos países, normalmente ocorrendo numa incidência de um a 12 casos por 100.000 habitantes por ano, principalmente em crianças de 6 meses a 2 anos de idade (RIEDO, PLIKAYTIS & BROOME, 1995). A doença pode ocorrer, no entanto, também em surtos e em grandes epidemias, tanto em países desenvolvidos como em subdesenvolvidos e os mecanismos responsáveis pela sua distribuição ainda permanecem pouco conhecidos (WANG et al., 1993; ACHTMAN, 1995). Dados epidemiológicos sugerem que a ecologia natural da doença meningocócica resulta em taxas variáveis de doença pelo mundo, diferenças na distribuição dos grupos entre regiões geográficas e alterações na distribuição dos grupos com o tempo (POLLARD, 2004).

A doença meningocócica apresenta alta letalidade nas formas mais graves com taxa de mortalidade em torno de 15%, caracterizando-se como importante problema de Saúde Pública. Para complicar o quadro, a doença pode ser mal diagnosticada, inicialmente

podendo ser confundida como uma doença causada por vírus, além de ter um curso de progressão rápida, podendo desenvolver-se em poucas horas ou em dois dias, restando assim pouco tempo para o início de terapia efetiva (MOORE, 1992; POLLARD, 2004; PICHICHERO, 2005; GIRARD et al., 2006). Cerca de 10 a 20% dos pacientes que sobreviveram à infecção meningocócica apresentam seqüelas significativas que levam a convulsões e incapacidades como surdez, retardamento psicomotor e até amputação de membros (PICHICHERO, 2005). A doença é comum em locais de clima temperado e em regiões tropicais, com casos esporádicos durante todo o ano nas áreas rurais e urbanas e com aumentos sazonais no inverno e início da primavera. Alguns autores associaram esta maior freqüência a outras enfermidades do trato respiratório também comuns nesta época, como infecções por mycoplasma e vírus influenzae (GOLDSCHNEIDER, GOTSCHLICH & ARTENSTEIN, 1969c).

Cinco grupos de *N.meningitidis* são responsáveis pela ocorrência de mais que 90% de meningite severa e septicemia, em todo o mundo (GIRARD et al., 2006). Na África, abaixo do deserto do Sahara, numa região de savana que vai do leste da Etiópia ao oeste do Senegal, conhecida como cinturão da meningite, a incidência da doença tem caráter epidêmico e é causada principalmente pelo grupo A, que responde por cerca de 90% dos casos (WHO, 1997). Durante a epidemia de 1996, cerca de 200.000 casos foram descritos, com 20.000 mortes. As taxas de incidência em anos epidêmicos chegam a 1000 casos por 100.000 habitantes, com 20% de mortalidade (GIRARD et al., 2006). O surgimento de casos de doença meningocócica causada pelo grupo W135, desde 2000, em países como Arábia Saudita, durante o encontro anual de peregrinos em Hajj, complicou a situação epidemiológica na região (TAHA et al., 2004; GIRARD et al., 2006). A cepa responsável por este surto se espalhou para outros países e causou uma grande epidemia em Burkina Faso em 2002 (DECOSAS & KOAMA, 2002). Epidemia causada pelo grupo A também ocorreu na

Ásia, incluindo China, Índia, Nepal e Mongólia (WANG et al., 1992). Recentemente foi descrito o aparecimento de casos de doença meningocócica causada pelo grupo X em países da África, o que determina o monitoramento constante para avaliação da incidência do grupo até então desconhecido (SORIANO-GABARRÓ & WOLTER, 2006).

Os grupos B e C são responsáveis pelos casos da doença na Europa e Américas, com mais de 50% dos casos sendo causados pelo grupo B (DONALDSON, MOORES & HOWE, 1999), enquanto os grupos A e C predominam na Ásia e África (SCHWARTZ, MOORE & BROOME, 1989; WHO, 1995; CONNOLLY & NOAH, 1999). Nos países desenvolvidos, o grupo B predomina em crianças abaixo de 4 anos, o grupo A em crianças em idade pré-escolar e o grupo C em adolescentes e adultos jovens (sorotipos C:2a e 2b). A proporção de cepas do grupo B é especialmente alta na Noruega, Holanda, Alemanha e Dinamarca, enquanto proporções crescentes de cepas do grupo C têm sido descritas na Eslováquia, República Checa, Grécia, Irlanda, Espanha, Canadá e Reino Unido (RAMSAY et al., 1997; TIMEN & VAN STEENBERGEN, 2002; SALLERAS, DOMINGUEZ & CARDENOZA, 2003a; 2003b; SNAPE & POLLARD, 2005; GIRARD et al., 2006). Durante a década de 90 o grupo C causou vários surtos, causados principalmente por um grupo de cepas altamente relacionadas referidas como um complexo clonal de sequência tipo 11 (ST-11) / enzima tipo 37 (ET-37) (WHALEN et al., 1995). A maioria das cepas isoladas de doença invasiva pertence aos complexos ST-11, ST-32, ST-8, ST-7, ST-41, ST-1, ST-4 e ST-5 (“sequence types”) identificados em ensaios de tipagem de sequência em Multilocus (SIERRA et al., 1991; SACCHI et al., 1992; WANG et al., 1993; BOSLEGO et al., 1995; KNAPP & RICE, 1995; FISCHER & PERKINS, 1997; GIRARD et al., 2006).

O grupo Y é responsável por grande proporção de casos da doença meningocócica e tem sido classicamente associado com pneumonia (KOPPEL, ELLENBOGEN & GEBHART, 1977). Nos Estados Unidos cerca de 3000 casos ocorrem anualmente, com taxa de

mortalidade de 12% envolvendo os grupos B, C e Y em iguais proporções (ROSENSTEIN, PERKINS & STEPHENS, 1999; NELSON et al., 1999). A prevalência do grupo Y tem crescido substancialmente e responde pela infecção invasiva presente nos idosos deste país.

No Brasil a doença meningocócica foi primeiramente descrita em 1906, até então tendo ocorrido em surtos. Entre 1945 e 1961 o grupo A foi prevalente aparecendo, pela primeira vez, em caráter epidêmico em São Paulo, numa taxa de incidência de 25 casos por 100.000 habitantes.

No início da década de 70 ocorreu uma epidemia do grupo C, seguida novamente de uma do grupo A, com incidência altíssima e causando até 30 casos por 100.000 habitantes. Estas duas epidemias motivaram a criação de Bio-Manguinhos em 1976, visando o incentivo e a modernização da Fundação Oswaldo Cruz na área de imunobiológicos. Nesta ocasião ocorreu a transferência de tecnologia da produção da vacina anti-meningocócica grupos A/C do Instituto Merieux na França para Bio-Manguinhos, que se tornou no Brasil, a instituição produtora desta vacina, tendo desde então produzido mais de 50 milhões de dose. Na mesma época a doença meningocócica passou a ser de notificação compulsória em todo o território brasileiro (NORONHA, 1993). No período de 1980 até 1992 a incidência da doença meningocócica no Brasil foi de um caso por 100.000 habitantes, em vários estados, com a prevalência de 83% para o grupo B. De acordo com o Ministério da Saúde, neste período, apenas 6% das cepas, eram pertencentes ao grupo C. No final da década de oitenta a incidência deste grupo em São Paulo passou a ser de 4 casos por 100.000 habitantes, caracterizando uma nova epidemia na região. No município do Rio de Janeiro, na mesma época, a situação era semelhante àquela observada em São Paulo (NORONHA, STRUCINER & HALLORAN, 1995; BARROSO, 1998).

Atualmente a doença ocorre com incidência de 3,32 casos por 100.000 habitantes e letalidade correspondente a 19,4% (Figura 1; SINAN/SVS/MS, 2005). Nas duas últimas

décadas predominou o grupo B, mas nos últimos anos há uma confluência nas incidências de meningite causadas pelos grupos B e C, no Brasil, embora com diferenças regionais importantes (Figura 2; SIFONTES et al., 1997; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). Como cerca de 70% dos casos de doença meningocócica não têm sorogrupo identificado, pode-se calcular que o número real de casos deve ser o triplo do indicado na Figura 2, ou seja, mesmo com o declínio na incidência, há atualmente mais de 1.000 casos de meningite causada pelos grupos B e C, anualmente, no Brasil. A cepa epidêmica do grupo B foi caracterizada como pertencente a um único clone (ST-2) do complexo ST-5 que também tem sido responsável por epidemias na Europa, EUA, Chile e Cuba (SACCHI, 2000). De 1998 a 2003 este perfil de prevalência tem se mantido, com casos da doença induzida pelo grupo C sendo observados em diferentes faixas etárias, desde crianças com menos de 1 ano de idade até adultos jovens, com mais de 15 anos (Figura 3; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). Entre o grupo C, o clone C:2b:P1.3 tem sido identificado em epidemias na grande São Paulo e no Paraná (SIERRA et al., 1991; SACCHI et al., 1992; BOSLEGO et al., 1995; KNAPP & RICE, 1995).

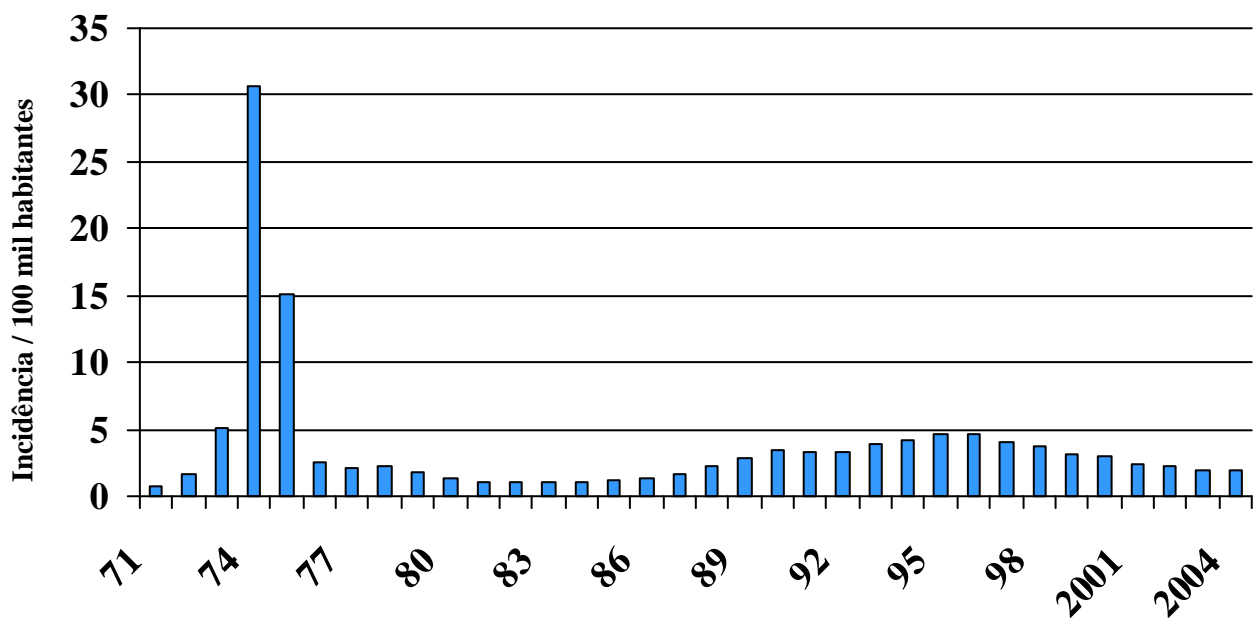


Figura 1. Incidência (por 100.000 habitantes) da doença meningocócica no Brasil entre 1971 e 2004 (Fonte: Ministério da Saúde).

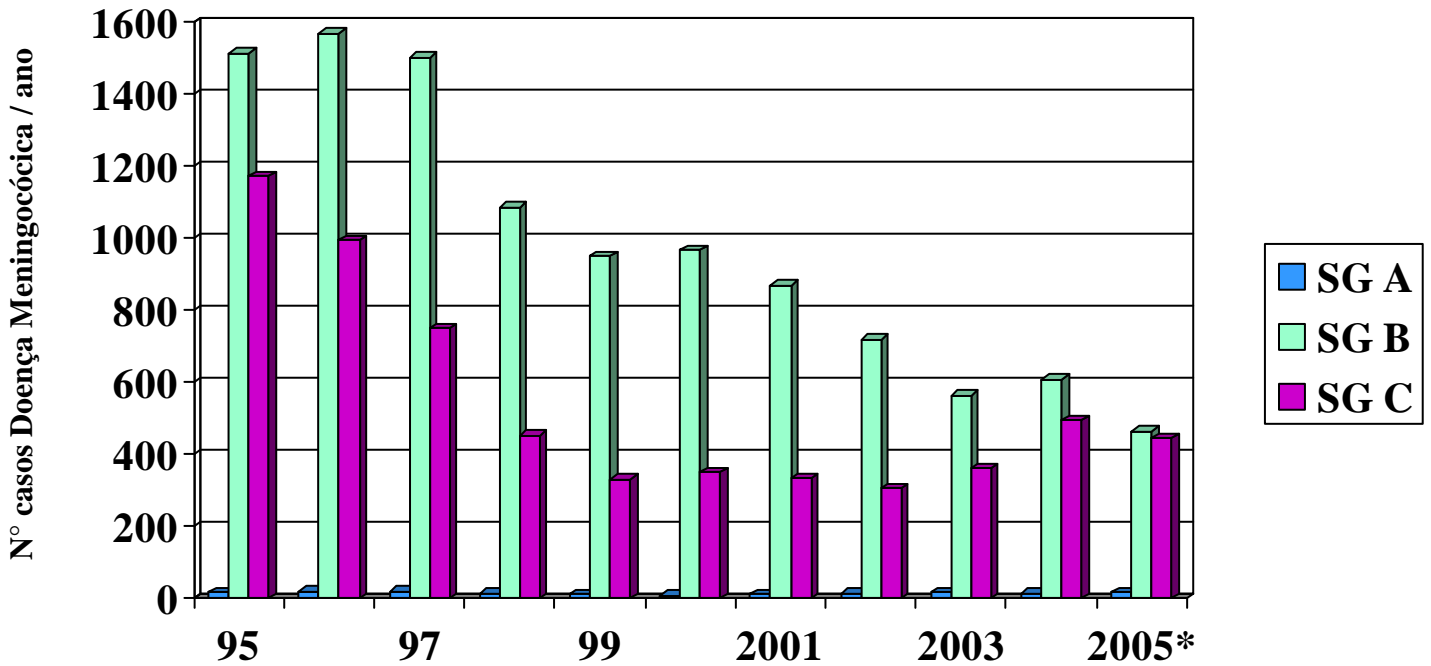


Figura 2. Número de casos da doença meningocócica causada pelos grupos A, B e C no Brasil (casos com grupo conhecido), entre 1995-2005 (Fonte: Ministério da Saúde, Fundação Nacional da Saúde, COVER, CENEPI).

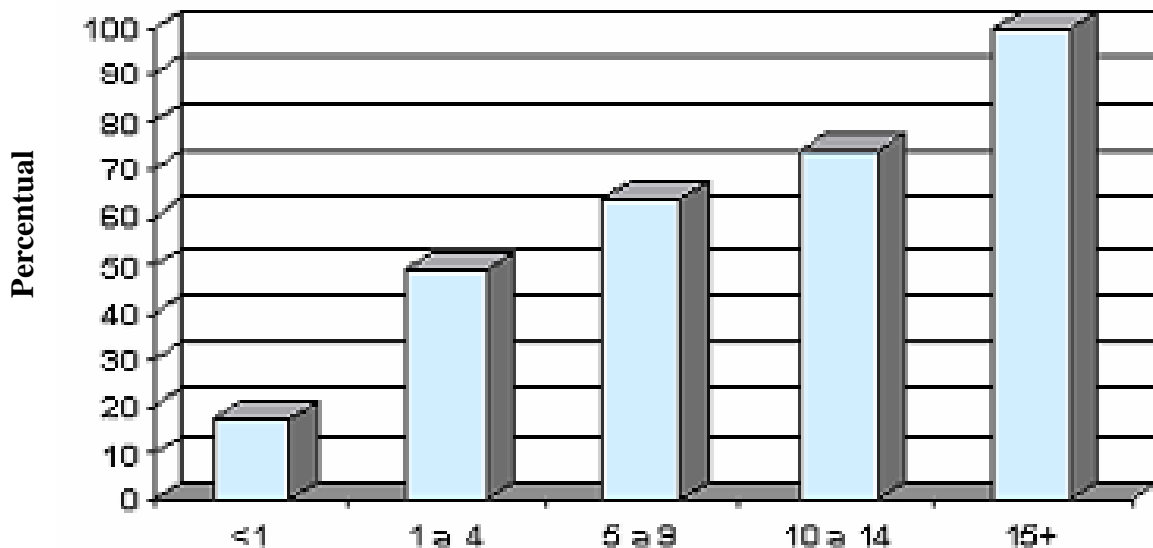


Figura 3. Percentual cumulativo dos casos de meningite meningocócica causada pelo grupo C no Brasil entre 1998-2003, por faixa etária (Fontes: GT Meningite, COVER, CENEPI, Fundação Nacional de Saúde).

Barroso, estudando aspectos epidemiológicos e biológicos da doença meningocócica no Rio de Janeiro, caracterizou o período entre 1989 e 1993 como hiper-endêmico com prevalência do grupo B em crianças com menos de 5 anos. Entre 1993 e 1995 o pesquisador observou um aumento da incidência do grupo C, em adolescentes e adultos jovens e predomínio das formas septicêmicas. Para os grupos B e C foi detectada uma alta resistência a sulfonamida (89% e 36%, respectivamente) e para o grupo C, 11% das cepas isoladas foram resistentes à rifampicina (BARROSO, 1998). Embora esteja ocorrendo um aumento gradual de resistência dos meningococos à penicilina, este antibiótico ainda é eficaz contra a *N. meningitidis* e o seu baixo custo viabiliza o tratamento antibiótico adequado de maneira quase universal. Apesar disso, a taxa de letalidade continua inalterada, em torno de 15% nos últimos 50 anos.

1.3. Resposta imune aos meningococos

O sistema de defesa do hospedeiro contra a doença causada por *N.meningitidis* envolve mecanismos imunes inatos e adquiridos que reconhecem as estruturas da superfície bacteriana. A resposta imune pode variar dependendo da idade da criança, bem como do grupo do microrganismo. O padrão da doença em indivíduos imunodeficientes indica a complexidade da resposta imune aos meningococos e sugere um papel central para anticorpos e sistema complemento (POLLARD & FRASCH, 2001).

A situação de portador assintomático tem sido considerada como responsável pela imunidade natural contra *N.meningitidis*, em função da presença de IgA e IgG em alguns indivíduos analisados (JONES & ELDRIDGE, 1979). Por outro lado, estes indivíduos constituem uma fonte de transmissão do microrganismo aos indivíduos não portadores, que representam o grupo de risco potencial de infecção. A eficiência deste tipo de imunidade contra os meningococos fica comprometida pela capacidade da maioria das cepas produzirem IgA proteases, enzimas capazes de degradar os anticorpos presentes na mucosa (GRIFFISS, 1995).

Os primeiros mecanismos de defesa mobilizados na infecção meningocócica têm a participação dos fagócitos mononucleares, neutrófilos, células natural “killer” (NK), proteínas ligadoras de manose e sistema complemento. A mobilização destes processos depende do reconhecimento, pelo hospedeiro, dos diferentes tipos de antígenos de superfície do microrganismo. Estas moléculas estão incluídas em um grupo de moléculas presentes nos microrganismos, denominados padrões moleculares associados a patógenos, que têm o LPS como representante das bactérias gram-negativas (MEDZHITOV & JANEWAY JR, 2000). O LOS meningocócico é um potente ativador da via alternativa do complemento. A presença de anticorpos pré-formados contra antígenos do meningococo favorece a ativação da via clássica do complemento e a formação do complexo de ataque à membrana (“MAC”), que elimina o microrganismo. Ambas as vias geram a proteína conhecida como C3 e seu produto de clivagem denominado C3b, moléculas importantes na opsonização das bactérias infectantes, que favorece a fagocitose (GRIFFISS, 1995; WAGNER & ROTH, 1999; POLLARD & FRASCH, 2001). Cepas que possuem cápsula polissacarídica são mais resistentes à fagocitose e conseqüentemente são mais virulentas. Além disto, os polissacarídeos capsulares, constituídos de ácido siálico, são capazes de inibir a via alternativa de ativação do complemento, componente importante da imunidade inata. Indivíduos com deficiência dos componentes terminais do complemento (C5-C9) podem desenvolver a doença e cerca da metade destes indivíduos pode ter ataques recorrentes. Por outro lado, indivíduos com deficiência em properdina ou fator D podem desenvolver a doença com taxas de morte superiores a 50% e sem recorrência entre os sobreviventes (ROSS & DENSEN, 1984). Para alguns grupos a presença de cápsula nas cepas patogênicas, concentração de anticorpos, especificidade destes anticorpos, isotipos de IgG, disponibilidade de sítios de ligação da fração Fc das imunoglobulinas e moléculas do sistema complemento (C3 e C3b) ligadas na superfície bacteriana, contribuem para as diferenças de suscetibilidade do microrganismo aos

mecanismos de defesa do hospedeiro (FRASCH & CHAPMAN, 1972; PELTOLA, 1983; ROSS et al., 1987; AASE, HOIBY & MICHAELSEN, 1998).

Dados experimentais sugerem que a eliminação do meningococo através da fagocitose pode variar, dependendo do grupo e da origem da cepa. Cepas oriundas de portadores assintomáticos são mais sensíveis à fagocitose do que aquelas isoladas de casos clínicos (ROSS et al., 1987).

As imunoglobulinas A, G e M, medidas por ensaios imunoenzimáticos (ELISA), têm sido descritas como as mais importantes na proteção contra infecções meningocócicas. As subclasses IgG₁ e IgG₃ são os anticorpos predominantes, enquanto IgG₂ pode também estar presente em crianças maiores (SJURSEN et al., 1990; POLLARD et al., 1999a).

Os estudos de Goldschneider, Gotschlich & Artenstein (1969a, 1969b) mostraram que a suscetibilidade à doença meningocócica está relacionada à ausência de anticorpos com poder bactericida. Cerca de 50% dos recém-nascidos apresentam atividade bactericida anti-meningocócica, proveniente da transferência transplacentária de anticorpos maternos e conseqüentemente não são susceptíveis à doença. Entretanto, a imunidade cai rapidamente e as crianças com idade entre 6 e 18 meses apresentam alto risco de infecção causada por bactérias encapsuladas, porque não apresentam uma sub-população específica de célula B presente na zona marginal de órgãos linfóides, responsável pelo reconhecimento e resposta ao polissacarídeo capsular. Esta sub-população celular tem um desenvolvimento tardio na ontogenia do sistema imune, entretanto, quando presente, é estimulada e após a diferenciação em plasmócitos é capaz de produzir IgM contra o polissacarídeo (MOSIER et al., 1977; RUBINSTEIN et al., 1998). Durante os anos seguintes de vida ocorre evolução na maturação da resposta imune devido à exposição natural aos microrganismos, onde entre 50 e 80% das crianças com 12 anos e 65 a 85% dos indivíduos adultos possuem anticorpos com atividade bactericida (GOLDSCHNEIDER, GOTSCHLICH & ARTENSTEIN, 1969a, 1969b;

POLLARD & FRASCH, 2001). Entretanto, são observadas respostas diferenciadas à infecção meningocócica, que podem depender do comportamento das células T, produção de anticorpos e/ou padrão de citocinas e mediadores produzidos. O completo entendimento dos mecanismos envolvidos na resposta imune aos meningococos poderia definir outras abordagens para o desenvolvimento de novas vacinas (POOLMAN, HOPMAN & ZANEM, 1983; POLLARD et al., 1999a; POLLARD et al., 1999b; COHEN, 2000; VERMONT & VAN DEN DOBBELSTEEN, 2002).

Para alguns autores, a suscetibilidade à infecção pelo grupo B também está relacionada ao baixo poder bactericida do soro. A baixa imunogenicidade do polissacarídeo deste grupo é explicada pela sensibilidade a neuraminidases e semelhança estrutural com unidades de ácido siálico existentes em tecidos humanos, presentes em moléculas de adesão de células neurais (N-CAM) de fetos humanos. Esse mimetismo molecular é responsável pelo não reconhecimento da cápsula como um antígeno estranho ao hospedeiro e, conseqüentemente, pela não produção de anticorpos e, por isto, a atividade lítica do soro tem sido atribuída a outros antígenos não capsulares (FINNE, LELNONEN & MAKELA, 1983; RICHMOND et al., 2000). Entre eles, estão Por A, Opc, Opa (classe 5), proteínas reguladas pelo ferro (IRPs) e LOS, que induzem anticorpos com poder bactericida. Existem evidências que a opsonofagocitose tem um papel importante na eliminação dos grupos B e E-29, enquanto é pouco expressiva para os grupos A e C. O isotipo das imunoglobulinas induzidas pelos antígenos não capsulares e o índice de avidéz são parâmetros importantes na avaliação de proteção à doença meningocócica (DEVOE & GILCHRIST, 1973; GRIFFISS et al., 1991; BOSLEGO et al., 1995; POOLMAN, 1995; WHO, 2000).

Wetzler et al. (1996), estudaram o efeito de componentes de envoltório de espécies patogênicas de *Neisseria*, sobre a ativação de linfócitos e verificaram que a endotoxina induz a proliferação policlonal de linfócitos B e sua diferenciação em plasmócitos. Os resultados

demonstraram que este componente induz a expressão de B7.2 na superfície de linfócitos B. Esta molécula tem importância crucial na transdução do segundo sinal necessário à ativação de linfócitos T. Após ativação estas células produzem citocinas como as interleucinas 2 e 4, que induzem a diferenciação das células B em células produtoras de anticorpos (WETZLER et al., 1996; QUAKYI et al., 1997; QUAKYI, HOCHSTEIN & TSAI 1997). Além disso, foi descrito o efeito adjuvante dos componentes de membrana externa dos meningococos, principalmente relacionado à endotoxina, que também é um potente ativador de macrófagos. Como o recrutamento de células auxiliares tem especial importância na interação entre linfócitos B e T, o efeito da liberação de componentes celulares durante a doença meningocócica deve ser considerado (FREUDEENBERG & GALANOS, 1988; GUPTA et al., 1993; GUPTA & SIBER, 1995; PÉREZ-MELGOSA et al., 2001).

Microrganismos infectantes e seus produtos induzem no hospedeiro, uma produção exacerbada de mediadores inflamatórios, produzidos por células como macrófagos ativados, sendo responsabilizados por diferentes manifestações clínicas das infecções bacterianas, como febre, hipercoagulação, falência múltipla de órgãos e morte. Esta ativação celular que normalmente faz parte da resposta protetora do organismo contra a agressão, quando está exacerbada tem efeito deletério sobre o hospedeiro (SWEET & HUME, 1996).

A resposta imune contra os grupos A, C, W135 e Y é mediada por anticorpos, predominantemente IgM, com baixa afinidade, independente da resposta mediada por células T (GOLDSCHNEIDER, GOTSCHLICH & ARTENSTEIN, 1969a; 1969c; PELTOLA, 1983; POOLMAN, HOPMAN & ZANEM, 1983; BUCHANAN, ARULANANDAM & METZGER, 1998). A atividade bactericida do soro de indivíduos infectados com estes grupos está inversamente relacionada à incidência da doença. Os anticorpos são principalmente contra os polissacarídeos capsulares, que têm sido utilizados como componentes de vacinas contra infecção meningocócica desde a década de 70 (GOTSCHLICH, LIU &

ARTENSTEIN, 1969). Vários estudos estabeleceram títulos mínimos protetores de anticorpos presentes no soro, com atividade bactericida (SBA), que são correlacionáveis com proteção à doença meningocócica, causada principalmente pelo grupo C, através de ensaios *in vitro*. Títulos de SBA ≥ 8 ou ≥ 4 são considerados protetores, utilizando-se fonte de complemento de coelho neonato ou humano, respectivamente (SIKKEMA et al., 2000; SANTOS et al., 2001; JÓDAR, GRIFFITHS & FEAVERS, 2004; BORROW, BALMER & MILLER, 2005).

Os polissacarídeos não são imunogênicos em crianças com menos de 18 meses de idade, devido à ausência de uma sub-população específica de célula B na zona marginal de órgãos linfóides. Entretanto, em crianças maiores, onde esta sub-população já foi desenvolvida, os polissacarídeos ativam células B de forma intensa, através da ligação cruzada de moléculas de imunoglobulina de superfície. Esta ativação é favorecida pela existência de múltiplos epítomos antigênicos idênticos nas moléculas dos polissacarídeos (MOND, LEES & SNAPPER, 1995). Além disso, porinas e LPS podem fornecer sinais secundários críticos para a ativação de células B, após exposição ao polissacarídeo meningocócico, através da interação direta com estas células (SNAPPER et al., 1995; 1997a; 1997b). Ocorre, então, a diferenciação das células B, específicas para polissacarídeos, em plasmócitos de curta duração produtores de anticorpos. Entretanto, como os polissacarídeos são antígenos T-independentes do tipo 2 (TI-2), não induzem a geração de células de memória, o que resulta na indução de resposta imune transitória. Estes antígenos também estimulam uma mudança limitada de classe de isotipos de imunoglobulina, sem maturação da afinidade dos anticorpos produzidos (BUCHANAN et al., 1998). Em contraste, o polissacarídeo meningocócico grupo A induz memória imunológica em crianças com menos de 18 meses de idade (GOLD et al., 1979; MacLENNAN et al., 1999). Em adição à fraca resposta imune induzida pelos polissacarídeos, estudos recentes têm demonstrado hiporresponsividade imunológica em crianças e adultos após repetidas doses da vacina

contendo polissacarídeo grupo C, o que impede a sua utilização em programas de imunização de rotina e restringe o seu uso em epidemias (GRANOFF et al., 1998; RICHMOND et al., 1999; 2000; ENGLISH et al., 2001; MacLENNAN et al., 2001).

1.4. Estratégias vacinais contra *N.meningitidis* grupos A, C, W135 e Y

1.4.1. Vacinas polissacarídicas

Na década de 30, foram descobertos os polissacarídeos capsulares como antígenos específicos de diferentes grupos de *N.meningitidis* (SCHERP & RAKE, 1945). Os polissacarídeos identificados e recém isolados deram origem aos primeiros produtos a serem testados em animais buscando proteção contra a doença meningocócica. Entretanto, as técnicas disponíveis produziram polissacarídeos de baixo peso molecular oriundos de cultivos de longa duração e que não foram capazes de induzir anticorpos nos modelos animais utilizados (SCHERP & RAKE, 1945; KABAT, KAISER & SIKORSKI, 1945). Na década de 60, foram otimizados os procedimentos de cultivo de *N.meningitidis* e os processos de purificação dos polissacarídeos. Desta forma, introduziu-se o uso de cultivos de curta duração e a adição do detergente aniônico cetavlon para a precipitação de moléculas de carga negativa, como o polissacarídeo grupo C, no início do processo de purificação. Este procedimento garantiu a obtenção de moléculas de alto peso molecular, imunogênicas em animais e com pouca contaminação de ácidos nucléicos e proteínas (GOTSCHLICH, LIU & ARTENSTEIN, 1969). O processo de purificação descrito por Gotschlich, Liu & Artenstein, em 1969, foi recomendado para a produção de vacinas polissacarídicas pela OMS (WHO, 1981) e continua sendo amplamente utilizado até hoje.

Os polissacarídeos meningocócicos constituíram as primeiras vacinas bacterianas definidas quimicamente. São moléculas puras, isentas de massa bacteriana e atóxicas (DIFABIO, 1988). Estes compostos se mostraram imunogênicos em adultos e crianças acima

de 18 meses de idade e foram objeto de vários ensaios clínicos em países da Europa, Américas e África (FRASCH, 1995). Os polissacarídeos são antígenos TI-2 e a capacidade dos indivíduos responderem a eles, depende da maturidade imunológica relacionada com a idade. Estes antígenos não induzem memória imunológica. O polissacarídeo A, no entanto, induz resposta em lactentes com 3 meses de idade e efeito reforço após a segunda dose. Acredita-se que este efeito não caracteriza uma resposta imunológica do tipo secundário e sim uma maior capacidade desta molécula estimular linfócitos B sensibilizados por contatos anteriores com o polissacarídeo ou antígenos que apresentam reatividade cruzada com ele (FRASCH, 1995).

A duração dos anticorpos induzidos pelas vacinas também varia com a idade. Crianças com menos de 18 meses, após 1 ano da imunização, apresentam níveis de anticorpos comparáveis aos não imunizados. Gold et al. (1979) comprovaram a baixa imunogenicidade do polissacarídeo grupo C em um estudo envolvendo crianças nesta faixa etária, nos Estados Unidos. Ocorreu um rápido declínio na concentração de anticorpos formados após a imunização das crianças. Crianças maiores podem apresentar níveis de anticorpos elevados até 5 anos após a vacinação (FRASCH, 1995).

Ainda hoje as vacinas polissacarídicas contra *N.meningitidis* são produzidas e utilizadas no mundo, em epidemias e surtos epidêmicos. Existem as vacinas monovalentes (A e C), bivalentes (AC) produzidas em alguns países da Europa, entre eles a França, e tetravalentes (A, C, W135 e Y). Estas últimas são produzidas nos Estados Unidos, Bélgica e França. No Brasil, Bio-Manguinhos é o único produtor de vacinas anti-meningocócicas monovalentes (A e C) ou bivalentes (AC).

Como a doença meningocócica tem prevalência em crianças de faixa etária inferior a 18 meses, a utilização de antígenos TI-2 como vacinas não induz proteção duradoura. Apesar de estar largamente comprovada a eficácia das vacinas polissacarídicas no controle de surtos e

epidemias em adultos, novas abordagens têm sido propostas para modificação da natureza da resposta imune induzida por estas moléculas. Além disto, vários estudos revelaram que o uso de repetidas doses de uma vacina contendo polissacarídeo C induziu hiporresponsividade imunológica em adultos e crianças (GOLD et al., 1975). Este fenômeno pode ser revertido pelo uso de uma vacina conjugada (RICHMOND et al., 2000; BORROW et al., 2001). Recentemente, Torling et al. (2003) mostraram um efeito similar para a vacina 23-valente polissacarídica contra pneumococo, administrada em idosos. O mecanismo responsável por esta hiporresponsividade ainda não foi elucidado, entretanto é possível que grandes doses dos polissacarídeos possam causar a apoptose de células B específicas do antígeno, reduzindo assim o número de células disponíveis para resposta a uma subsequente inoculação ou a pré-existência de IgM específica do polissacarídeo possa causar um efeito imunomodulador, através da ligação a receptores Fc inibitórios (DANZIG, 2004; MELTZER & GOLDBLATT, 2006). Os casos de tolerância evidenciados reforçam a substituição do MenPSC pelo polissacarídeo conjugado a proteínas carreadoras, para a obtenção de um antígeno T-dependente, como componente vacinal (RICHMOND et al., 1999; 2000; ENGLISH et al., 2001; JOKHDAR et al., 2003).

1.4.2. Vacinas polissacarídicas conjugadas

A conjugação química de polissacarídeos a carreadores protéicos tem sido empregada para moléculas de diferentes origens bacterianas com a transformação destes antígenos em T-dependentes, conseqüentemente capazes de induzir memória imunológica. Esta abordagem é baseada no conceito de hapteno-carreador utilizado por Avery & Goebel, para aumentar a imunogenicidade de um polissacarídeo, através da ligação covalente desta molécula a uma proteína, com produção de anticorpos direcionados contra a porção glicídica da molécula (AVERY & GOEBEL, 1929; 1931; PAUL, SISKIND & BENACERRAF, 1966; KATZ et al.,

1970; MITCHISON, 1971). Existem três importantes características da resposta humoral ao hapteno presente no conjugado: existência de células B específicas do hapteno e células T específicas da proteína carreadora, ligação covalente entre os dois componentes e a interação entre células B e T deve ter restrição pelas moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II, ou seja, células T auxiliares cooperam apenas com linfócitos B que expressam moléculas MHC de classe II reconhecidas como próprias (MITCHISON, 1971). O hapteno é responsável pela captação eficiente do carreador e os dois tipos de linfócitos reconhecem epítomos diferentes no mesmo complexo antigênico. As características de resposta humoral secundária obtida pela cooperação entre as células B e T, isto é memória, aos antígenos conjugados, são decorrentes da ação das células T CD4 auxiliares e citocinas liberadas, como a mudança de classe de imunoglobulinas e maturação da afinidade dos anticorpos após estimulação antigênica repetida. Estes mecanismos ocorrem em regiões específicas de órgãos linfóides conhecidas como centros germinativos, onde ocorre a polarização de folículos secundários, regiões ricas em células B, próxima à zona rica em células T. Os anticorpos selecionados com alta afinidade são mais eficientes para neutralizar a infectividade de microrganismos (McHEYZER-WILLIAMS & McHEYZER-WILLIAMS, 2005).

A abordagem de conjugação foi aplicada na obtenção e licenciamento de vacinas contra *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), na década de 80, onde o polissacarídeo foi conjugado ao toxóide tetânico (SmithKline) ou a OMVs de *N.meningitidis* grupo B (Merck) (ENGLISH et al., 2001). Estudos clínicos, com vacinas conjugadas contra Hib, mostraram que as preparações antigênicas induziram resposta T-dependente em crianças, com elevados títulos de anticorpos e alta avidéz ao polissacarídeo. Estas preparações produziram memória imunológica e proteção duradoura nas populações avaliadas. Em curto prazo, a ampla utilização destas vacinas reduziu, em mais de 90%, a incidência das doenças causadas por Hib

em populações vacinadas de países desenvolvidos e também diminuiu o estado de portador assintomático, diminuindo a transmissão do microrganismo (RICHMOND et al., 1999; 2000; ENGLISH et al., 2001). Este tipo de resposta é reconhecido como imunidade de rebanho e é responsável pelo controle efetivo das doenças causadas por bactérias encapsuladas que colonizam a naso-faringe dos hospedeiros. Vários estudos mostraram que poucas vacinas tiveram tanto sucesso, como a vacina conjugada contra Hib, apesar do alto custo (PELTOLA, 2000; MÄKELA et al., 2003). Recentemente um aumento de falha vacinal foi descrito, na população com memória imunológica induzida pela vacina conjugada, mas com baixos títulos de anticorpos. Estes achados demonstram que o estabelecimento de memória pode não ser suficiente para fornecer proteção contra doença invasiva causada por bactéria encapsulada (McVERNON et al., 2003; KELLY, POLLARD & MOXON, 2005).

Posteriormente houve um interesse crescente nas vacinas conjugadas contra outras bactérias encapsuladas como *Streptococcus pneumoniae* (*S.pneumoniae*) e *Salmonella typhi* (CHU et al., 1983; PEETERS et al., 1992; SAXENA & DIFABIO, 1993; 1994; ESKOLA, 2001). Em um grande estudo para avaliação de uma vacina conjugada licenciada, contendo 7 sorotipos de *S.pneumoniae*, demonstrou-se uma eficácia de 97,4% contra doença pneumocócica invasiva e 64,7% contra otite media (BLACK et al., 2000). Outras vacinas conjugadas, contendo 9 ou 11 sorotipos de pneumococos, encontram-se em estudos clínicos de Fase III (WHO, 2006). Alguns estudos têm demonstrado a eliminação do estado de portador assintomático de pneumococos através da utilização destas vacinas (OBARO et al., 1996; MBELLE et al., 1999; OBARO, 2001; WUORIMAA et al., 2001; PUUMALAINEN et al., 2003).

Os primeiros estudos para obtenção de vacinas conjugadas contra *N.meningitidis* foram realizados na década de 80, por Jennings & Lugowski (1981), que conjugaram os polissacarídeos A, B e C diretamente ao toxóide tetânico. Os conjugados obtidos com

polissacarídeos dos grupos A e C foram imunogênicos em animais. Posteriormente outros pesquisadores, trabalhando na obtenção de conjugados meningocócicos A e C com toxóide tetânico, comprovaram a resposta imunológica T-dependente através da observação de resposta secundária, memória imunológica e persistência da resposta obtida (BEUVERY et al., 1983a; 1983b). Foram propostas outras metodologias de obtenção de conjugados contendo polissacarídeos meningocócicos grupos A e C, utilizando o CRM₁₉₇, um mutante atóxico de *Corynebacterium diphtheriae*. Estes conjugados foram imunogênicos e seguros em voluntários adultos, induzindo anticorpos contra os dois polissacarídeos (CONSTANTINO et al., 1992). Posteriormente, testes clínicos preliminares com uma vacina experimental também composta de polissacarídeo grupo C e CRM₁₉₇, mostraram que a vacina é segura e imunogênica com a indução de memória imunológica em crianças e adolescentes (MacDONALD et al., 1998; RICHMOND et al., 1999; MacLENNAN et al., 2000; ENGLISH et al., 2001; BRAMLEY et al., 2001; RICHMOND et al., 2001a; RICHMOND et al., 2001b).

Vacinas conjugadas contra meningococo grupo C, recentemente licenciadas com base apenas em estudos clínicos de Fase II (imunogenicidade e segurança), têm sido empregadas no Reino Unido desde novembro de 1999, para imunizar crianças de diferentes faixas etárias e adolescentes. O esquema de vacinação, utilizando-se 3 doses, já reduziu em 93 e 90% o número de casos de doença meningocócica em crianças com idade entre 3 e 4 anos e adolescentes, respectivamente. A vacina conjugada também reduziu em 67% o estado de portador assintomático, conferindo imunidade de rebanho, com diminuição de 66 a 80% de mortes entre crianças e adolescentes não vacinados no período de 1998 a 2002 (LEACH et al., 1997; MacDONALD et al., 1998; CHOO et al., 2000; RAPPUOLI, 2001; RAMSAY et al., 2001; MILLER, SALISBURY & RAMSAY, 2002; BALMER, BORROW & MILLER, 2002; MAIDEN & STUART, 2002; BORROW et al., 2003; HARRIS, FINN & GRANOFF, 2003; JOSEPH et al., 2003; RAMSAY et al., 2003). O número de mortes anuais atribuídas à

doença meningocócica invasiva reduziu de 67 para 5 no período entre 1999 e 2001, no Reino Unido (BALMER, BORROW & MILLER, 2002). Entretanto, os resultados de persistência de anticorpos e memória imunológica com as vacinas conjugadas utilizadas, em crianças com 2, 4 e 6 meses têm sido conflitantes. Alguns estudos sugerem que a imunização primária, em um esquema acelerado, é adequada para o estabelecimento de memória em idades maiores, enquanto outros pesquisadores encontraram persistência de anticorpos e memória até 4 anos de idade ou a necessidade de dose reforço no segundo ano de vida (RICHMOND et al., 1999; BORROW et al., 2002; McVERNON et al., 2002; MacLENNAN et al., 2001; TROTTER et al., 2004). Resultados das análises de vigilância, após a introdução do uso de rotina da vacina conjugada no Reino Unido, sugeriram que a eficácia é baixa, 1 ano após a imunização primária com 3 doses (TROTTER et al., 2004). Provavelmente existe a necessidade de dose reforço porque a mudança do estado de colonização nasal do microrganismo para a promoção da doença invasiva é muito rápida, menos que 24 horas e este período é insuficiente para a montagem de uma resposta imune adequada a partir de células de memória, que levaria de 3 a 4 dias. Em função desta característica, deve existir um nível mínimo de anticorpos circulantes e sensibilização imunológica, para prevenção de bacteremia, até a resposta imune proveniente do estabelecimento de memória se tornar adequada (POLLARD, 2004; PICHICHERO, 2005; KELLY, POLLARD & MOXON, 2005; KELLY et al., 2006).

Pouca informação é disponível sobre a sub-classe de IgG induzida após a vacinação com vacinas conjugadas ou mesmo após infecção com o meningococo. A determinação das sub-classes de IgG poderia elucidar o tipo de resposta imune induzida pelos imunógenos. Enquanto vacinas polissacarídicas induzem IgG2 em adultos e IgG1 em crianças, as vacinas conjugadas deveriam provocar uma resposta predominantemente IgG1, porque envolvem ativação antigênica de células T auxiliares, que por sua vez induzem a mudança de classe de IgM para IgG1 (DIAKUN et al., 1997; JOSEPH et al., 2004). Em modelos murinos a resposta

à vacina polissacarídica é restrita aos isotipos IgM e IgG3 e mostra um perfil imune similar àquele observado no homem (RUBINSTEIN & STEIN, 1988a; 1988b), enquanto a vacina conjugada induz maior concentração de IgG1 (RUBINSTEIN et al., 1998; BUCHANAN et al., 2001).

Recentemente a vacina conjugada monovalente contra o grupo C foi introduzida em muitos programas nacionais de imunização em países como Irlanda, Espanha, Holanda, Bélgica, Austrália e Canadá (TIMEN & VAN STEENBERGEN, 2002; SALLERAS, DOMINGUEZ, CARDENOZA, 2003a, 2003b; SNAPE & POLLARD, 2005).

Além das vacinas monovalentes, foram também desenvolvidas vacinas conjugadas bivalentes contra os grupos A e C, utilizando o toxóide diftérico como proteína carreadora. As vacinas conjugadas, já licenciadas ou ainda sendo submetidas a ensaios clínicos, produzidas por diferentes produtores, estão descritas na Tabela 1. Em um estudo comparativo da imunogenicidade entre a vacina polissacarídica e conjugada em crianças jovens, foram encontrados níveis mais altos de anticorpos com atividade bactericida contra os dois grupos para cada dose da vacina conjugada (LIEBERMAN et al., 1996). Memória imunológica associada a esta vacina foi avaliada em 221 crianças inicialmente vacinadas com uma dose da vacina conjugada ou duas doses da vacina polissacarídica antes de 6 meses de idade e que foram revacinadas com uma das vacinas quando tinham 18 a 24 meses. Níveis de anticorpos significativamente mais altos após a revacinação foram observados em crianças inicialmente imunizadas com a vacina conjugada (LEACH et al., 1997). Outras vacinas conjugadas tetravalentes produzidas pelo Biocine e GlaxoSmithKline estão sendo avaliadas em estudos clínicos de Fase III e são promissoras para imunização de bebês (Tabela 1; PICHICHERO et al., 2005).

Finalmente em 2005, uma vacina conjugada tetravalente contra os grupos A, C, W135 e Y, utilizando o toxóide diftérico como proteína carreadora, foi produzida pela Sanofi

Pasteur e licenciada nos EUA (Tabela 1). A imunogenicidade e a segurança desta vacina foram avaliadas em diversas faixas etárias em 7 estudos onde 7642 e 3041 indivíduos adultos e adolescentes receberam a vacina conjugada e vacina polissacarídica tetravalente, respectivamente. Os títulos de anticorpos com atividade bactericida aumentaram mais de 4 vezes para todos os grupos, de forma comparável para as duas vacinas (KEYSERLING et al., 2005; PICHICHERO, 2005). Da mesma forma, as reações locais e sistêmicas foram similares, apesar da vacina conjugada induzir reações maiores no sítio de injeção, que lembram reações após vacinação contra tétano e difteria (PICHICHERO, 2005). Por outro lado, a vacina conjugada induziu resposta imune persistente até 3 anos após a imunização e sensibilizou os vacinados para memória, que foram então capazes de apresentar resposta de reforço para todos os grupos. Em outro estudo envolvendo 1398 crianças de 2 a 10 anos de idade, ambas as vacinas induziram soroconversão para todos os grupos, em mais de 90% dos vacinados. As crianças que receberam a vacina conjugada tiveram aumentos consistentes de 4 vezes nos títulos de atividade bactericida, persistência de resposta para todos os grupos durante 6 meses

Vacina	Produtor	Proteína carreadora	Estágio desenvolvimento
MenPSC-TT	Baxter	Toxóide Tetânico	Licenciada
MenPSC- CRM₁₉₇	Chiron	Proteína Diftérica CRM₁₉₇	Licenciada
MenPSC- CRM₁₉₇	Wyeth	Proteína Diftérica CRM₁₉₇	Licenciada
MenPSA-TT	Serum Institute of India	Toxóide Tetânico	Fase II/III
MenPSA/PSC-TD	Aventis Pasteur	Toxóide Diftérico	Fase III
MenPSA/PSC- CRM₁₉₇	Biocine	Proteína Diftérica CRM₁₉₇	Fase III
MenPSA/PSC-TT	GlaxoSmithKlein	Toxóide Tetânico	Fase III
MenPSA, PSC, PSY, PSW135-TT	Sanofi Pasteur	Toxóide Diftérico	Licenciada

Tabela 1. Vacinas conjugadas mono, bi e tetravalente existentes em diferentes estágios de desenvolvimento, utilizando diversos polissacarídeos de *N.meningitidis* e proteínas carreadoras.

e maior avidéz dos anticorpos. Estes resultados mostraram que a vacina conjugada provocou uma resposta humoral mais robusta quando comparada à vacina polissacarídica, resultante da maturação de afinidade da resposta imune, que é um indicador da indução de memória imunológica (PICHICHERO et al., 2005). Em outro estudo com crianças de 4 a 5 anos de idade, a vacina conjugada induziu títulos de IgG, com atividade funcional, de 2 a 20 vezes mais altos do que a vacina polissacarídica, com persistência de 2 anos (GRANOFF, MORGAN & WELSCH, 2005). Entretanto, esta vacina não induz imunogenicidade adequada em bebês (PICHICHERO et al., 2005).

1.5. Métodos de conjugação

Diversas estratégias químicas têm sido utilizadas para a obtenção de vacinas conjugadas. Podem ser utilizados diferentes tamanhos do polímero de carboidrato, contanto que seja mantida a antigenicidade. Desta forma, os oligossacarídeos ou polissacarídeos devem conter um número seqüencial e não modificado de unidades repetidas dentro da cadeia, com o objetivo de preservar a estrutura terciária adequada à indução de anticorpos que se ligarão ao polissacarídeo capsular nativo. Outro aspecto importante a ser considerado é a possibilidade do peso molecular do polissacarídeo poder afetar a eficiência de conjugação (DIFABIO, 1988).

Várias proteínas carreadoras podem ser utilizadas, como exemplos citam-se as proteínas imunogênicas já disponíveis como vacinas infantis como os toxóides tetânico e diftérico, CRM₁₉₇ ou proteínas derivadas do mesmo patógeno, como proteínas de OMVs de *N.meningitidis* grupo B e C. As proteínas homólogas têm a vantagem de fornecer proteção adicional contra o microrganismo (PELTOLA, 2000).

Existem vários métodos de conjugação, mas os que mais se aplicam à produção de vacinas são os métodos que não introduzem espaçadores entre os dois componentes a serem

conjugados, como a técnica da carbodiimida e aminação redutiva (HERMANSON, 1996). O método da carbodiimida caracteriza-se pela obtenção de conjugados com ligações múltiplas entre 2 antígenos polifuncionais, enquanto que na aminação redutiva, a proteína carreadora é substituída com várias cadeias de carboidrato, originando uma estrutura denominada de neoglicoproteína. Dependendo do tipo de grupo funcional presente nos componentes a serem conjugados e do peso molecular do polissacarídeo, pode-se proceder a escolha do método mais adequado. O primeiro método consiste na introdução de um grupo amino (NH_2) no polissacarídeo ativando-o com brometo de cianogênio (CNBr), para a produção de um isocianato intermediário que reage com a dihidrazida do ácido adípico (ADH). A conjugação ocorre com a ativação de grupos carboxílicos da proteína (ácido aspártico e ácido glutâmico) com N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDAC) e a posterior reação com os grupos hidrazidas do polissacarídeo (CHU et al., 1983). Este método foi desenvolvido por Robbins e col., nos Estados Unidos, na década de 80, para a produção da primeira vacina conjugada contra Hib (SCHNEERSON et al., 1980; CHU et al., 1983).

Um dos problemas desta reação é a quantidade de substituintes desnecessários gerados na proteína e no polissacarídeo. O uso de moléculas bifuncionais, como a hidrazida do ácido adípico, pode produzir um entrelaçamento entre as moléculas do polissacarídeo, criando estruturas de alto peso molecular. A carbodiimida produz uma série de produtos secundários, devido à reatividade e instabilidade do intermediário formado. Todos estes fatores podem induzir à obtenção de estruturas antigênicas novas e indesejáveis na molécula do conjugado, além de uma vacina que pode apresentar uma potência variável (DIFABIO, 1988).

Por outro lado, Beuvery et al. (1982; 1983a; 1983b; 1983c; 1985) obtiveram conjugados de polissacarídeos meningocócicos grupos A e C com o toxóide tetânico, pelo método da carbodiimida, com bom rendimento e sem a presença de anticorpos induzidos para novas estruturas formadas na ligação entre os componentes dos conjugados.

A técnica de aminação redutiva foi desenvolvida por Jennings & Lugowski (1981), no Canadá e introduz aldeídos terminais no polissacarídeo, através de hidrólise ácida ou alcalina, oxidação seletiva com periodato de sódio (NaIO_4) ou outros procedimentos, originando oligossacarídeos que reagem com grupamentos aminos presentes em proteínas (resíduos lisil), em presença de um agente que reduz as bases de Schiff geradas (JENNINGS & LUGOWSKI, 1981; ANDERSON et al., 1986). Jennings & Lugowski (1981) obtiveram a conjugação dos polissacarídeos grupos A, B e C de *N.meningitidis* com o toxóide tetânico, sendo que a reação envolvendo o polissacarídeo grupo A, que possui peso molecular intermediário, foi a menos eficaz. Eles basearam-se na estratégia do grupo monofuncional usado na conjugação de oligossacarídeos, para polissacarídeos meningocócicos de alto peso molecular, evitando assim, ligações cruzadas e minimizando a possibilidade de modificação química do polissacarídeo. Isto propicia a obtenção de imunógenos com estrutura mais definida e específica que podem ser avaliados por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Esta técnica tem demonstrado ser altamente sensível e reproduzível para o controle da identidade de polissacarídeos bacterianos utilizados na produção de vacinas (JONES & LEMERCINIER, 2002; WHO, 2004).

Entretanto, a reação de aminação redutiva pode ser menos eficaz com polissacarídeos de alto peso molecular, possivelmente devido ao tamanho da macromolécula (DIFABIO, 1988). Além disto, o método possui uma séria desvantagem relacionada ao longo tempo de reação necessário para a obtenção completa dos conjugados, podendo durar de dois a três dias (COSTANTINO et al., 1992; PAWLOWSKI, KÄLLENIUS & SVENSON, 2000; LEES, SEN & LOPEZACOSTA, 2006). A ineficiência da reação pode ser diminuída com a introdução de grupos hidrazida na proteína, que reajam mais favoravelmente com os grupos aldeídos gerados no polissacarídeo, através da reação com cloridrato de hidrazina. Estes grupos são mais reativos do que os grupos amino presentes na proteína carreadora e também

não estão comprometidos com o processo de destoxificação da toxina tetânica ao toxóide tetânico, após o tratamento com formaldeído. Uma vacina conjugada contra o grupo A, utilizando este procedimento de aaminação redutiva modificada, foi desenvolvida por especialistas do “Food and Drug Administration” (FDA), em parceria com a Organização Mundial da Saúde (OMS), através do “Meningitis Vaccine Project” (MVP) que tem apoio do “Program for Appropriate Technology in Health” (PATH) e Serum Institute of India, para a promoção de campanhas de vacinação na África. Esta vacina está sendo avaliada em estudos clínicos de Fase II em voluntários na Índia e será fornecida a baixos preços (LEE CHE-H & FRASCH, 2003; BORROW et al., 2006; GIRARD et al., 2006).

Após a reação de conjugação, os conjugados devem ser purificados utilizando-se métodos eficientes que sejam capazes de promover a separação dos componentes livres que não reagiram e dos sub-produtos de reação e que possam ser aplicados no escalonamento de produção para a obtenção de lotes com 2.000.000 de doses de vacina conjugada (WHO, 2004). Existem vários métodos propostos como a cromatografia de exclusão molecular, filtração molecular, etc. Um outro método possível de ser aplicado é a filtração tangencial que tem como característica a recirculação da suspensão a ser processada, tangencialmente à superfície filtrante e sob uma pressão de trabalho. Devido a essa pressão, parte do líquido atravessa a membrana, enquanto o material retido por ela permanece sob recirculação, com mínima deposição de sólidos sob a superfície da membrana (PALL LIFE SCIENCES, SCIENTIFIC & TECHNICAL REPORT). Uma das aplicações desta técnica é a separação de biomoléculas de acordo com as diferenças no tamanho molecular, tendo como vantagem a manutenção da concentração do produto purificado. Além disso, os sistemas de ultrafiltração permitem a realização de dois processos simultâneos: a diafiltração e a concentração do produto de interesse, o que significa uma economia de tempo, além de minimizar as perdas e

a manipulação do produto (PALL LIFE SCIENCES, SCIENTIFIC & TECHNICAL REPORT).

Após a etapa de purificação, os conjugados são avaliados em ensaios de controle de qualidade, que são extremamente dependentes de diferentes análises físico-químicas (JONES et al., 1996; WHO, 2004; JÓDAR, GRIFFITHS & FEAVERS, 2004; CUERVO et al., 2007). A resposta humoral induzida pelos conjugados deve ser avaliada através da determinação dos títulos de anticorpos produzidos contra o polissacarídeo e a proteína carreadora por ensaios imunoenzimáticos (ELISA) ou ensaios de soroneutralização, assim como a indução de isotipos de IgG (IgG1, IgG2a, IgG2b), que caracterizam os antígenos T-dependentes (MAWAS, FEAVERS & CORBEL, 2001; BUCHANAN et al, 2001; PÉREZ-MELGOSA et al., 2001). Torna-se ainda importante a avaliação da funcionalidade destes anticorpos através do ensaio da atividade bactericida e do índice de avidéz, que caracterizam memória imunológica (GOLDBLATT, 1997; GOLDBLATT, BORROW & MILLER, 2002) e têm assumido importância relevante na correlação com proteção à doença meningocócica (JÓDAR, CARTWRIGHT & FEAVERS, 2000; SIKKEMA et al., 2000; SANTOS et al., 2001, JÓDAR, GRIFFITHS & FEAVERS, 2004). Por outro lado, a resposta celular é extremamente importante para gerar e manter esta imunidade protetora. Células T auxiliares são necessárias para a geração e maturação das respostas humorais contra antígenos protéicos T-dependentes, propiciando memória imunológica. Enquanto a resposta celular e o perfil de citocinas induzidos pela doença meningocócica têm sido estudados de forma não extensiva, a resposta celular induzida pelas vacinas conjugadas não foi descrita na literatura (ROBINSON et al., 2002). Desde que este tipo de resposta é dependente das características dos conjugados, tipo de metodologia de conjugação e purificação empregada, natureza da proteína carreadora, uso de adjuvantes, etc., estas moléculas devem ser estudadas através de modelos experimentais, para a avaliação de células T auxiliares mobilizadas (Th1 ou Th2), citocinas

produzidas, plasmócitos de curta e longa duração e células B e T com fenótipo de células de memória através de marcadores de superfície previamente descritos como associados à memória (MAWAS, FEAVERS & CORBEL, 2001; BUCHANAN et al, 2001; PÉREZ-MELGOSA et al., 2001). A produção de citocinas pode ser avaliada por diferentes métodos, como métodos imunoenzimáticos (ELISA), método enzimático de detecção de “spots” (ELISPOT) e marcação intracelular com anticorpos específicos em ensaios de citometria de fluxo. ELISPOT é um método altamente sensível e reprodutível para a quantificação de respostas imunes mediadas por células B e T e tem sido utilizado para medir as respostas específicas a antígenos, após esquemas de vacinação (CZERKINSKY et al., 1983; SEDGWICK et al., 1983; MEIKLEJOHN et al., 2004). Da mesma forma, a técnica de citometria de fluxo também tem sido amplamente utilizada para o estudo de sub-populações celulares específicas mobilizadas por diferentes antígenos, através da marcação de moléculas de superfície com anticorpos conjugados a fluorocromos (VASCONCELOS et al., 2003; 2006).

O desenvolvimento de vacinas conjugadas de polissacarídeos meningocócicos vem acontecendo em diversos países desenvolvidos, com a utilização de tecnologias de ponta para a obtenção de produtos com alto valor agregado. A tendência mundial é a substituição das vacinas polissacarídicas pelas vacinas conjugadas nos programas nacionais de imunização, como alternativa promissora no controle da doença meningocócica. Entretanto, ainda não foram descritos no Brasil, estudos para a obtenção de uma vacina conjugada contra o *N.meningitidis* grupo C, que possa ser utilizada para a proteção da população brasileira contra a infecção causada por esta bactéria encapsulada.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O presente estudo propõe a obtenção de uma vacina conjugada utilizando o polissacarídeo de *N.meningitidis* grupo C com o toxóide tetânico, através do método modificado de aminação redutiva e suas respectivas caracterizações físico-químicas e avaliação imunológica.

2.1.1. Objetivos específicos

- Obtenção de conjugados em diferentes escalas e de um lote piloto da vacina conjugada liofilizada através do método modificado de aminação redutiva;
- Estabelecimento de métodos apropriados para a purificação dos conjugados;
- Caracterização físico-química dos conjugados estabelecendo: porcentagem do componente sacarídico livre, teor de açúcar e proteína, estabilidade e estrutura;
- Determinação da dose efetiva, através de estudos dose-resposta em camundongos Suíços;
- Determinação dos títulos de anticorpos produzidos (IgG) contra o polissacarídeo e proteína utilizando ensaios imunoenzimáticos (ELISA) e de soroneutralização, assim como de isotipos de IgG (IgG1, IgG2a, IgG2b) induzidos contra o polissacarídeo;
- Avaliação do índice de avidéz dos anticorpos induzidos contra o polissacarídeo;

- Determinação da atividade bactericida dos anticorpos induzidos contra uma cepa heteróloga;
- Determinação da capacidade ativadora de células B produtoras de IgG de baço (curta duração) e de medula (longa duração) de camundongos imunizados com os conjugados, através da técnica de ELISPOT;
- Determinação da capacidade ativadora de células T de baço de camundongos imunizados com os conjugados, através de citometria de fluxo;
- Determinação do tipo de células T auxiliares mobilizadas (Th1 ou Th2), através do perfil de citocinas produzidas analisadas por citometria de fluxo;
- Determinação de células B e T com fenótipo de células de memória, através da avaliação de marcadores de superfície por citometria de fluxo;
- Avaliação da proteção dos conjugados, utilizando camundongos imunizados e desafiados com cepa heteróloga de *N.meningitidis* grupo C, através da taxa de sobrevivência.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção e caracterização dos componentes a serem conjugados

3.1.1. Polissacarídeo grupo C (MenPSC)

O polissacarídeo grupo C foi produzido a partir de cultura da cepa vacinal 2135 de *N.meningitidis*, purificado e controlado de acordo com os procedimentos descritos para produção de vacina meningocócica, de acordo com Gotschlich, Liu & Artenstein (1969) e com os Requerimentos da Organização Mundial de Saúde (WHO, 1981), pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro/RJ. Os testes de controle de qualidade e a caracterização do polissacarídeo foram realizados utilizando diferentes métodos. A avaliação do perfil característico foi realizada por cromatografia de exclusão, utilizando-se coluna TSK-G[®] 4.000 Pwxl, solução de cloreto de sódio 0,85% como eluente, fluxo de 0,5mL/min e detecção em 206nm.

O doseamento do teor de ácido siálico presente no polissacarídeo foi realizado pelo método colorimétrico do resorcinol (SVENNERHOLM, 1957) e a determinação da identidade e pureza através de ressonância magnética nuclear de próton uni-dimensional (¹HRMN 1D), utilizando-se um equipamento Bruker Avance, 500 MHz (Bruker BioSpin, Germany) e temperatura de 37°C, no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear de Far-Manguinhos – Fiocruz. Para a análise de pureza em RMN, as amostras foram analisadas na concentração de 10mg dissolvidos em água deuterada (D₂O 99.96%) contendo dimetilsulfóxido 0,05% (DMSO 0,05%), utilizado como padrão de concentração conhecida (Cambridge Isotope Laboratories Inc.) (BHATTACHARJEE et al., 1975; LEMERCINIER & JONES, 1996; EGAN, 2000; WHO, 2004; JONES & LEMERCINIER, 2002; JÓDAR, GRIFFITHS & FEAVERS, 2004). O peso molecular foi avaliado por espectroscopia de espalhamento de luz (“Multi-Angle Laser Light Scattering”; MALLS), onde foram estudadas diversas

concentrações de MenPSC nativo diluído em solução de cloreto de potássio 0,4M e acetato de sódio 0,05M (TSUNASHIMA et al., 1978; TARAZONA & SAIZ, 2003). Estas análises foram realizadas no Laboratório de Termodinâmica e Cinética Aplicada (LATCA/EQ) da Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a coordenação do Prof. Krishnaswamy Rajagopal.

3.1.2. Toxóide Tetânico (TT)

O toxóide tetânico foi produzido, detoxificado, purificado e controlado através de procedimentos descritos nos Requerimentos da Organização Mundial de Saúde (WHO, 1990), pelo Instituto Butantan, São Paulo/SP. O lote de toxóide tetânico utilizado tem a pureza antigênica igual a 1892 Limite de floculação (Lf)/mg Nitrogênio protéico, que é um valor apropriado para ser utilizado no processo de conjugação (WHO, 2004). O teor de proteína foi avaliado pelo método de Bradford (1976).

3.2. Ativação do polissacarídeo e da proteína e obtenção dos conjugados

3.2.1. Oxidação do polissacarídeo

O polissacarídeo foi modificado quimicamente antes do processo de conjugação pela reação de oxidação com periodato de sódio, onde ocorreu a introdução de aldeídos terminais e a redução do tamanho da molécula (JENNINGS & LUGOWSKI, 1981). Vários lotes de MenPSC nativo, na concentração de 10mg/mL, foram tratados com periodato de sódio (23,4 mM) a 4°C, no escuro, para a geração de grupos aldeído (JENNINGS & LUGOWISKI, 1981). A reação foi interrompida com a introdução de glicerol, para consumo do excesso de periodato de sódio. MenPSC ativado foi purificado por diafiltração contra água destilada e concentrado através do sistema de ultrafiltração tangencial (Sistema Centramate, Pall

BioPharmaceuticals). A etapa de oxidação do MenPSC está descrita nas Figuras 4 e 9 [(1) – Ativação do MenPSC].

Etapa de oxidação do polissacarídeo grupo C (MenPSC)

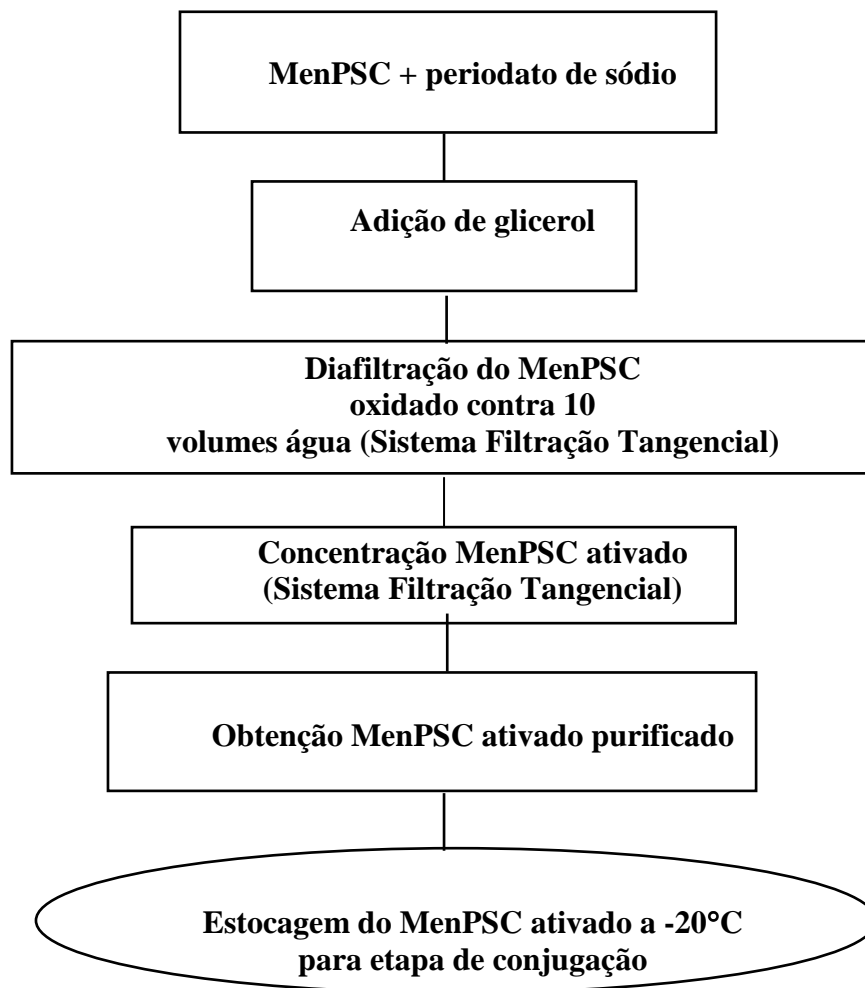


Figura 4. Fluxograma esquemático da ativação do polissacarídeo nativo para produção da vacina conjugada contra *N.meningitidis* grupo C.

A avaliação da integridade e introdução dos grupos aldeído no MenPSC ativado foi realizada por espectroscopia $^1\text{HRMN}$ 1D, sob as mesmas condições descritas para a análise do MenPSC nativo. O doseamento do teor de ácido siálico presente no polissacarídeo foi realizado pelo método colorimétrico do resorcinol (SVENNERHOLM, 1957).

3.2.2. Ativação da proteína

Toxóide Tetânico (3,5mg/mL) foi ativado pela introdução de grupos hidrazida através da metodologia da carbodiimida (EDAC), após tratamento com cloridrato de hidrazina, 50 vezes em excesso, à temperatura ambiente e sob condições ácidas (pH 6,1) (LEE CHE-H & FRASCH, 2003). O toxóide tetânico ativado (TTH) foi purificado pelo processo de diafiltração contra salina tamponada (PBS 0,02M), pH 7,4 e concentrado por ultrafiltração tangencial (Sistema Centramate – Pall BioPharmaceuticals). A etapa de ativação do TT está descrita nas Figuras 5 e 9 [(2) – Ativação do TT]. O produto obtido foi avaliado quanto ao teor de proteína através do método de Bradford (1976). Lotes de TTH purificados foram avaliados quanto à presença de resíduos de reagentes por diferentes métodos. A pesquisa de resíduos de EDAC foi realizada em sistema cromatográfico, utilizando-se as seguintes condições:

Coluna Supelco LC318, tampão de eluição contendo acetonitrila 2% (v/v), pH 3,25, fluxo de 1mL/min, detecção a 214 nm, concentração de EDAC padrão = 1,5 μ g/mL. O resultado é obtido pela comparação da área do pico de eluição da amostra que deve ser menor do que a área do pico de eluição do padrão. As análises foram realizadas pelo Laboratório de Controle Físico-Químico do Departamento da Qualidade de Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz (WHO, 2004).

Etapa de ativação do toxóide tetânico (TT)

Figura 5. Fluxograma esquemático da ativação do toxóide tetânico para produção da vacina conjugada contra *N.meningitidis* grupo C.

Para a avaliação do resíduo de hidrazina, foi utilizada uma metodologia validada através de voltametria em pulso diferencial ou polarografia (ANTUNES, 2004), em colaboração com o Laboratório de Contaminantes do Departamento de Química, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), Fundação Oswaldo Cruz.

3.2.3. Reação de conjugação

Diversos lotes de conjugados foram obtidos em diferentes escalas para a avaliação da reprodutibilidade do método de conjugação empregado. O lote 26 foi obtido em escala de 200 doses humanas (10 µg/0.5mL), os lotes 28, 29 e 30 foram obtidos em escala de 2.000 doses humanas e os lotes 37, 40 e 03/05 foram obtidos em escala de 20.000 doses humanas. Um destes lotes (lote 40) foi escolhido para a obtenção de um lote piloto da vacina conjugada MenPSC-TT liofilizada e foi submetido à avaliação da resposta imune induzida, através da determinação dos títulos de anticorpos, da funcionalidade destes anticorpos e da mobilização celular.

Os conjugados foram obtidos através da ligação covalente entre os aldeídos gerados no polissacarídeo ativado (50mg/mL) e os grupamentos hidrazida da proteína (60mg/mL), em presença de cianoborohidreto de sódio 1M (10mL), como agente redutor (método derivado da técnica de aminação redutiva descrita por JENNINGS & LUGOWSKI, 1981). A reação foi interrompida pela adição de dihidrazida do ácido adípico 0,5M (ADH; 50mL) para bloqueio dos grupos aldeído que não reagiram. A reação de conjugação foi monitorada por cromatografia de exclusão utilizando-se uma coluna TSK-G® 4.000 Pwxl, solução de cloreto de sódio 0,85% como eluente, fluxo de 0,5mL/min e detecção em 206nm e 280nm.

3.2.4. Purificação dos conjugados

Após bloqueio dos grupos funcionais que não reagiram, os conjugados foram purificados pelo processo de diafiltração contra PBS 0,02M, pH 7,4 e concentrado por ultrafiltração tangencial (Sistema Centramate – Pall BioPharmaceuticals). O desenvolvimento do processo de obtenção e purificação dos componentes e das vacinas conjugadas originou o depósito de um pedido de patente (SILVEIRA et al., 2005). O método foi aplicado para remoção do componente sacarídico livre e dos reagentes residuais usados no processo de conjugação (WHO, 2004; JÓDAR, GRIFFITHS & FEAVERS, 2004). A etapa de conjugação está descrita nas Figuras 6 e 9 [(3) – Reação de Conjugação].

3.2.5. Caracterização físico-química dos conjugados

3.2.5.1. Teor de açúcar livre

A determinação da porcentagem do componente sacarídico livre presente no conjugado foi feita através da padronização de um método de precipitação do conjugado, através da proteína, com o detergente desoxicolato de sódio (DOC) descrito por Lei et al. (2000). O ensaio foi realizado utilizando-se uma faixa de concentração de açúcar de 8 a 20 μ g/mL. A solução de açúcar (1mL) reagiu com 100 μ L de uma solução de DOC a 1%, com pH ajustado para 7,0 com HCl fumegante. Após reação em banho de gelo durante 30 min, foram adicionados 50 μ L de solução HCl 1N e a mistura foi centrifugada a 10.000 rpm durante 10 min. O sobrenadante contendo o MenPSC livre foi separado do precipitado e submetido (450 μ L) à reação de hidrólise ácida (50 μ L de HCl 1N) a 80°C durante 1h e 30 min, para a obtenção de unidades monossacarídicas. As amostras foram liofilizadas, ressuspendidas em água destilada e deionizada (Milli-Q) e analisadas em cromatografia de troca iônica (“high-performance anion-exchange chromatography with pulsed-amperometric detection”; HPAEC-

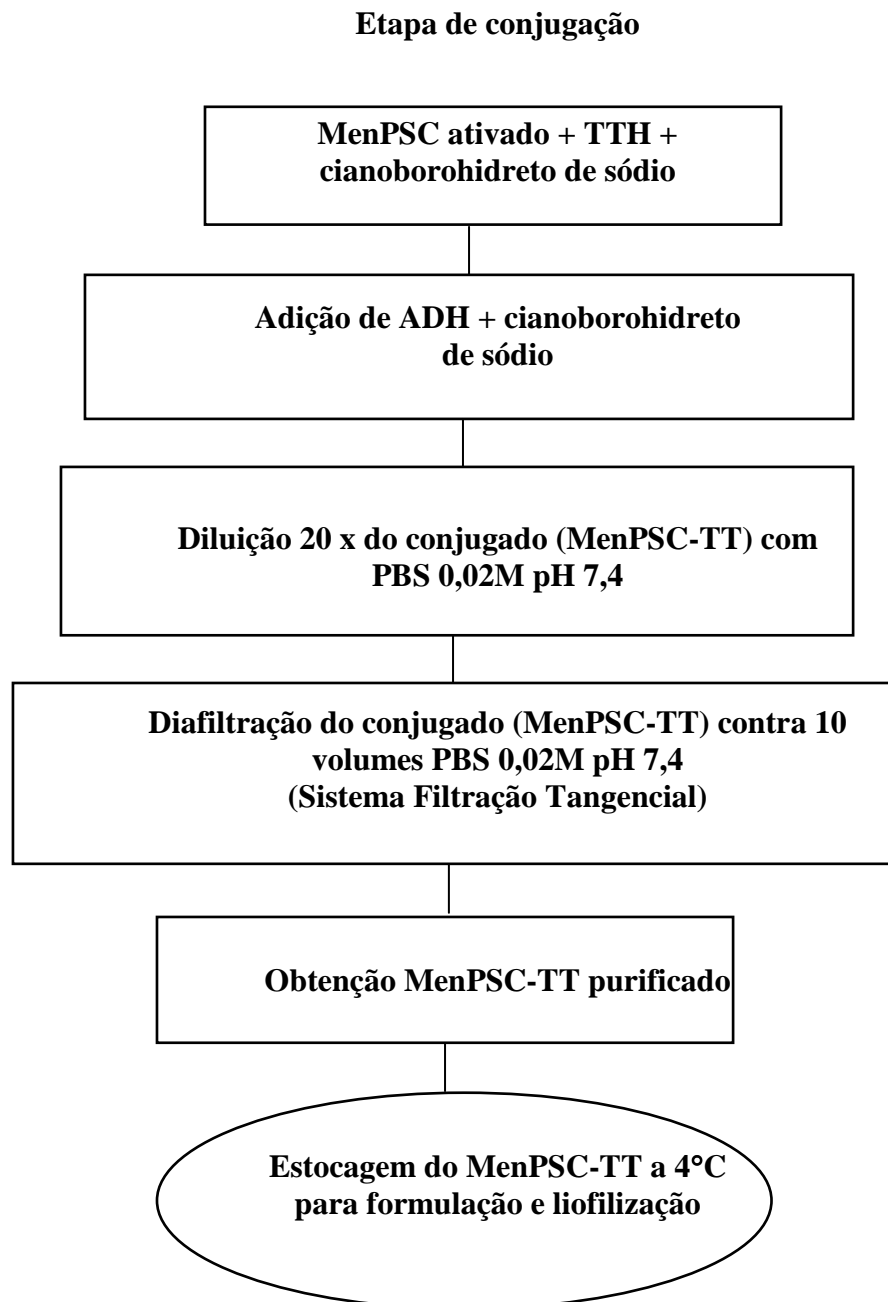


Figura 6. Fluxograma esquemático da produção da vacina conjugada contra *N.meningitidis* grupo C.

PAD; RICCI et al., 2001), onde sofrem um potencial eletroquímico durante a corrida, o qual é detectado por um detector amperométrico (eletroquímico), utilizando-se as seguintes condições:

Coluna CarboPac PA10, detector ED40 amperométrico, corrida isocrática com eluente NaOH + acetato de sódio (100mM), 10 min de corrida, fluxo = 1mL/min. Para a quantificação do teor de ácido siálico nas amostras foi construída uma curva utilizando um polissacarídeo caracterizado e selecionado como padrão “in-house”, nas concentrações de 0,1 a 6,0 µg/mL.

3.2.5.2. Razão açúcar:proteína (mg:mg)

A avaliação do teor de ácido siálico do polissacarídeo foi realizada pelo método colorimétrico de resorcinol (SVENNERHOLM, 1957) e do teor de proteína através do método de Bradford (1976), para o estabelecimento da razão entre os dois componentes, a qual é utilizada como marcador de conjugação (WHO, 2004; JÓDAR, GRIFFITHS & FEAVERS, 2004).

3.2.5.3. Espectroscopia ¹HRMN 1D

A análise da estrutura das vacinas conjugadas por espectroscopia ¹HRMN 1D foi realizada sob as mesmas condições descritas para a análise do MenPSC nativo e ativado (JONES et al., 1996; EGAN, 2000; HO et al., 2002), realizadas em Far-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz.

3.2.5.4. Resíduo de ADH

O resíduo de ADH presente nos conjugados foi analisado por cromatografia de exclusão utilizando-se uma coluna TSK-G[®] 2.500 Pwx1, solução de cloreto de sódio 0,2M

como eluente, fluxo de 1mL/min e detecção em 206nm. As análises foram realizadas na Divisão de Controle de Processos do Departamento de Vacinas Bacterianas de Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz (WHO, 2004).

3.2.5.5. Resíduo de cianeto

A dosagem de cianeto nos conjugados utilizou um método fotométrico empregando-se um kit Spectroquant, com sensibilidade de 0,002 a 0,5 ppm e fotômetro SQ-118, ambos fornecidos pela Merck. O método necessita de um volume de 10 mL de amostra, livre da interferência de proteína, que é retirada após tratamento em sistema Amicon[®] com membrana de corte de 100 KDa. O filtrado obtido é constituído de substâncias com peso molecular inferior a 100 KDa, como o íon cianeto. Este filtrado foi analisado após diluição em PBS 0,02M. Os outros componentes presentes nos conjugados foram avaliados e não interferem no doseamento. A técnica se divide em três etapas, onde o produto final é uma substância de cor violeta, cuja intensidade varia com a concentração de cianeto na amostra. Na primeira etapa, o íon cianeto reage com cloro formando cloreto de cianogênio. Este composto, por sua vez, reage com piridina formando o dialdeído glucônico (segunda etapa), que condensa com o ácido 1,3-dimetilbarbitúrico (terceira etapa) dando um corante violeta de polimetino. Esta reação é conhecida como reação de Konig, amplamente utilizada para dosagem de cianeto em amostras aquosas (UPADAHYAY & GUPTA, 1984). Logo após o término da reação pode-se avaliar a concentração de cianeto na amostra, que é dada em parte por milhão (ppm), não havendo necessidade de construção de curva padrão, pois o fotômetro dispõe de curvas específicas de cada teste (MERCK, Manual de Instruções do Fabricante). Para a avaliação da recuperação da concentração do íon cianeto, obtida pelo método, diferentes amostras de conjugado foram contaminadas com uma concentração conhecida de cianeto. Para tal utilizou-se como padrão o cianoborohidreto de sódio, o mesmo reagente utilizado no processo

de obtenção dos conjugados. Para avaliar a confiabilidade do método fotométrico proposto foi realizada a quantificação do teor de cianeto residual no produto a granel da vacina conjugada contra *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), produzida em Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz (lotes 013/05, 015/05, 021/05 e 022/05).

3.2.5.6. Controle de qualidade do produto a granel

O produto a granel da vacina conjugada (lote 03/05) foi avaliado por ensaios de controle de qualidade requeridos pela OMS (WHO, 2004). O produto foi testado para avaliação de esterilidade bacteriana e micótica, detecção do conteúdo de pirogênio em coelhos (*in vivo*) e avaliação do teor de endotoxina *in vitro* pelo teste cromogênico cinético de “*Limulus ameocyte lysate*” (LAL; PARK C-Y et al., 2005), onde o produto é aprovado com teor menor que 20 EU/ μ g de MenPSC. Além disso, é recomendada a avaliação da toxicidade específica (“drink test”), onde camundongos inoculados por via intra-peritoneal com diferentes diluições do produto a granel não devem perder peso durante 18h. Todos os ensaios foram realizados pelos Laboratórios de Controle Biológico e Microbiológico do Departamento da Qualidade de Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz (WHO, 2004).

3.3. Preparação de um lote piloto da Vacina Conjugada MenPSC-TT

3.3.1. Obtenção do lote piloto

Para avaliar a imunogenicidade em camundongos dos conjugados obtidos e também para determinar a sua estabilidade após estocagem, um lote correspondendo a 27.000 doses humanas (10 μ g/0.5mL; lote 40) foi utilizado para o envase de frascos contendo 5 doses, utilizando sacarose como estabilizador, em condições estéreis. Os frascos foram liofilizados utilizando um ciclo determinado pelo Setor de Liofilização de Bio-Manguinhos e foram estocados a 4°C.

3.3.2. Controle de qualidade do produto final

O produto final da vacina conjugada liofilizada foi avaliado por ensaios de controle de qualidade requeridos pela OMS (WHO, 2004). O produto foi avaliado no ensaio para detecção do teor de umidade residual, pelo método de Karl Fischer (WIELAND, 1987), onde o teor médio residual menor do que 2,5%, deve ser considerado satisfatório. Além deste teste, foram realizados testes de esterilidade, pirogênio *in vivo*, teor de endotoxina *in vitro* (LAL; PARK C-Y et al., 2005) e toxicidade inespecífica em cobaias e camundongos, onde os animais inoculados por via intra-muscular com diferentes diluições do produto final não devem perder peso durante 7 dias. A quantidade de sacarose foi avaliada em sistema cromatográfico utilizando as seguintes condições: coluna Shodex SC1011-sugar 8, água destilada e deionizada (Milli-Q) como eluente, detecção por índice de refração a 50°C, temperatura da coluna = 75°C, fluxo de 0,8 mL/min e curva padrão com concentração entre 10 e 50 mg/mL. As análises foram realizadas pelos Laboratórios de Controle Físico-Químico, Biológico e Microbiológico do Departamento da Qualidade de Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz (WHO, 2004).

3.4. Avaliação imunológica dos conjugados

3.4.1. Imunização dos animais

3.4.1.1. Imunogenicidade de lotes de conjugados obtidos em menor escala

Camundongos suíços de ambos os sexos com peso entre 12 a 17g foram fornecidos pelo Centro de Criação Animal da Fundação Oswaldo Cruz, sob aprovação do Comitê de Ética de Utilização Animal (CEUA), protocolo número P0142-02. Os animais, em grupos de 15, foram inoculados por via intra-muscular na pata traseira, com três doses, em intervalos de 21 dias, de lotes de conjugados (1µg de MenPSC-TT em 0,2 mL) obtidos em escala de 200

doses (lote 26) e 2.000 doses (lotes 29 e 30), utilizando hidróxido de alumínio como adjuvante (1 mg/dose). Grupos de animais controle foram inoculados com MenPSC nativo (5µg em 0,2 mL) e PBS (0,2 mL), sob as mesmas condições. Os animais, em grupos de 5, foram sangrados pelo plexo retro-orbital sob a ação de colírio anestésico (Anestalcon), nos tempos 0, antes de cada dose e 14 dias após a 3ª dose. Os tubos com gel separador contendo sangue foram submetidos à centrifugação a 4.000 rpm durante 15 min para a obtenção dos soros. Alíquotas de 100µL foram distribuídas em eppendorfs e conservadas a - 20°C até o uso.

3.4.1.2. Estudo dose-resposta

A imunogenicidade da vacina conjugada MenPSC-TT liofilizada (lote 40; 20.000 doses), reconstituída em solução de PBS contendo hidróxido de alumínio (1 mg/dose), foi avaliada em estudo dose-resposta, utilizando-se um protocolo de imunização aprimorado, com um intervalo menor entre as doses, o qual foi empregado nos outros ensaios com os animais. Quatro grupos de 15 camundongos suíços de ambos os sexos com peso entre 15 a 22g, foram inoculados por via intra-muscular na pata traseira, com três doses de 0,1, 1 e 10µg/dose (0,2 mL) da vacina conjugada ou com MenPSC nativo com hidróxido de alumínio (1 mg/dose), em intervalos de 15 dias. Os animais, divididos em três grupos de 5, foram sangrados pelo plexo retro-orbital sob a ação de colírio anestésico (Anestalcon), nos tempos 0, antes de cada dose e 20 dias após a 3ª dose. Os soros foram obtidos como anteriormente descrito.

3.4.2. Ensaio para determinação de títulos de anticorpos (ELISA)

3.4.2.1. IgG total

A detecção de títulos de IgG total contra o polissacarídeo em soros dos animais imunizados com diversos lotes de conjugados (lotes 26, 29 e 30) e da vacina conjugada

liofilizada (lote 40) foi realizada por testes imunoenzimáticos (ELISA) conforme descrito anteriormente (GHEESLING et al., 1994). Placas Immulon tipo II (Dynex) foram revestidas com 100 µL de uma mistura contendo MenPSC (5µg/mL) e albumina metilada humana (5µg/mL) em PBS pH 7,4, para fixação do polissacarídeo na placa, e incubadas durante 16h a 4°C. Após 4 lavagens com 200 µL de tampão de lavagem (Tampão TRIS em solução salina; TBS com Tween 20 0,05%) foram adicionadas as amostras de soro e de um soro padrão “in-house”, em diluições seriadas com fator de 2, com diluição inicial de 1:5000. As placas foram incubadas durante 16h, lavadas 4 vezes e incubadas com 100 µL do anticorpo anti-IgG camundongo conjugado à fosfatase alcalina (1/3000 diluído em PBS pH 7,4; anti-IgG de camundongo produzido em cabra, Sigma A-5153) durante 2h. Após um ciclo de lavagem, foi adicionado p-nitrophenil fosfato (1mg/mL) diluído em tampão de dietanolomina 9,7% (v/v), cloreto de magnésio 0,01% (p/v) e azida sódica 0,02% (p/v) e a placa foi incubada por 30 min. A absorbância foi lida a 405 nm. Os títulos de anticorpos das amostras foram calculados a partir de unidade arbitrária de ELISA atribuída ao soro padrão “in-house” (1000U/mL), utilizado para a obtenção da curva padrão. Os títulos foram calculados pelo programa Softmax PRO, analisados em parâmetro logístico 4 e transformados em logaritmo neperiano das unidades por mL (LnU/mL).

3.4.2.2. Sub-classes de IgG (IgG1, IgG2a, IgG2b)

A detecção de títulos de isotipos de IgG (IgG1, IgG2a, IgG2b) de anticorpos produzidos contra o polissacarídeo em soros dos animais imunizados com a vacina conjugada MenPSC-TT liofilizada (lote 40) foi realizada por testes imunoenzimáticos (ELISA) conforme etapas descritas para a detecção de IgG total, entretanto, utilizando-se os isotipos de IgG correspondentes, para a obtenção da curva padrão e anticorpo conjugado à fosfatase alcalina (anti-isotipos de IgG de camundongo obtidos em rato, BD Pharmigen) incubado

durante 1h. Após um ciclo de lavagem, foi adicionada estreptoavidina (1:1000 em PBS Tween) durante 1h. Posteriormente foi realizado outro ciclo de lavagem e adicionado o-phenilenediamina (OPD; 0,4mg/mL) diluído em tampão citrato-fosfato com perborato de sódio (1 cápsula em 100mL de água deionizada). A placa foi incubada por 45 min e a absorbância foi lida a 450 nm (GHEESLING et al., 1994; HO et al., 2002). Os títulos das amostras foram calculados conforme descrito no item anterior e também foram transformados em logaritmo neperiano das unidades por mL (LnU/mL).

3.4.2.3. Índice de avidéz

A avidéz de anticorpos anti-IgG específicos de diferentes concentrações da vacina conjugada (lote 40; 0,1, 1 e 10µg/dose) foi estudada utilizando o método de eluição com o tiocianato de amônio, agente desnaturante capaz de dissociar 50% dos complexos antígeno-anticorpo (Ag-Ac) de baixa afinidade, de acordo com GOLDBLATT (1997). As microplacas revestidas com 4 µg/mL de MenPSC foram incubadas com uma diluição pré-determinada das amostras de soro, capaz de induzir uma absorbância de 0,8 a 1,0, durante 16h a 4°C. Para cada soro diferentes concentrações de tiocianato de amônio (0, 0,25, 0,5 e 0,75M) foram adicionadas. As placas foram então incubadas por 15 min à temperatura ambiente, seguida por um ciclo de lavagem. O restante do ensaio foi desenvolvido como descrito para a detecção de IgG total. A concentração de tiocianato de amônio necessária para reduzir a absorbância em 50% representa o índice de avidéz, o qual foi calculado conforme descrito abaixo de acordo com GOLDBLATT (1997) e cuja representação encontra-se na figura 19:

$$AI = \frac{(\log 50 - \log A) \times (B - A)}{\log B - \log A} + A$$

Onde,

AI = Índice de Avidéz

\log de 50 = 1,70

A = a menor concentração de tiocianato de amônio capaz de promover uma redução da absorvância inferior a 50%

B = a maior concentração de tiocianato de amônio capaz de promover uma redução da absorvância superior a 50%.

3.4.3. Ensaio para determinação da atividade bactericida do soro (SBA)

Soros de animais imunizados com diferentes lotes de conjugados (lotes 26, 29 e 30) e da vacina conjugada liofilizada (lote 40), em diluições seriadas com fator de 2, foram incubadas com 50 a 70 unidades formadoras de colônias (UFC/mL) de suspensão bacteriana de *N.meningitidis* grupo C (cepa heteróloga N1002/90), crescida em fase logarítmica, em agar “Tryptic Soy Agar” (TSA). Em cada poço foi adicionado soro de cobaia macho, como fonte de complemento, destituído de atividade bactericida intrínseca detectável. As placas foram incubadas a 37°C por 30 min e o número de UFC foi contado. Títulos de SBA são expressos como a recíproca da diluição do soro capaz de induzir $\geq 50\%$ lise bacteriana, quando comparado ao número de células alvo, presentes antes da incubação com o soro e complemento (MILAGRES et al., 1994). Os títulos SBA dos lotes de conjugados obtidos em escalas menores estão expressos em \log_2 para facilitar a confecção do gráfico. Títulos de SBA ≥ 8 são considerados protetores porque são correlacionáveis com proteção à doença meningocócica, utilizando-se soro de coelho neonato como fonte de complemento (SIKKEMA et al., 2000; SANTOS et al., 2001, JÓDAR, GRIFFITHS & FEAVERS, 2004; BORROW, BALMER & MILLER, 2005).

3.4.4. Ensaio de soroneutralização

A imunogenicidade do toxóide tetânico utilizado como proteína carreadora na vacina conjugada MenPSC-TT (lote 40) foi avaliada em ensaio de soroneutralização. Grupos de 15 camundongos suíços de ambos os sexos com peso entre 12 a 17g foram inoculados via intramuscular na pata traseira, com três doses, em intervalos de 15 dias, do lote da vacina conjugada liofilizada (lote 40; 1µg de MenPSC-TT em 0,2 mL), utilizando hidróxido de alumínio (1 mg/dose). Os animais, em grupos de 5, foram sangrados pelo plexo retro-orbital sob a ação de colírio anestésico (Anestalcon) 20 dias após a 3ª dose. Os tubos com gel separador contendo sangue foram submetidos à centrifugação a 4.000 rpm durante 15 min para a obtenção dos soros. Alíquotas de 100µL foram distribuídas em eppendorfs e conservadas a - 20°C até o uso.

Foram realizados 2 ensaios de soroneutralização, onde utilizou-se camundongos albinos suíços pesando entre 19 a 25g. No primeiro ensaio, foram preparadas misturas contendo uma dose desafio da toxina tetânica de referência (1L+/10/animal) e diferentes diluições do soro de referência, resultante da imunização com uma vacina de referência contra Difteria e Tétano (DT) (1:4 a 1:20) e soros sob teste, respectivamente, após imunização com vacina conjugada MenPSC-TT liofilizada (lote 40; 1:4 e 1:5), vacina conjugada contra Hib (PRRP-TT; 1:4 e 1:5). Após reação de soroneutralização a 37°C durante 60 minutos, grupos de 10 animais foram inoculados, via subcutânea, com volume de 0,2 mL/animal. Em paralelo, um grupo controle foi inoculado com a dose desafio da toxina tetânica aferida (1L+/10). No segundo ensaio, outros grupos de 10 animais foram inoculados, sob as mesmas condições, mas utilizando diferentes diluições dos soros de referência (1:8, 1:12, 1:15 e 1:20) e daqueles após imunização com vacina conjugada MenPSC-TT liofilizada (lote 40; 1:8, 1:12, 1:15 e 1:20), vacina conjugada contra Hib (1:20). Os animais foram observados por 96h quanto à ocorrência de contratura tetânica ou morte em cada grupo (IWAKI et al., 2003). Os resultados foram utilizados para o cálculo da Dose Efetiva 50% (DE₅₀), diluição capaz de proteger 50%

dos animais, através do programa PROBIT. Posteriormente os valores de DE₅₀ foram utilizados para calcular a potência de cada soro através da fórmula: recíproco da DE₅₀ do soro teste ÷ recíproco da DE₅₀ da vacina de referência × UI/mL da vacina de referência. A antitoxina de referência, a toxina tetânica aferida e o procedimento operacional padrão (POP; número 653440014) para a realização do ensaio da potência da fração tetânica foram fornecidos pelo Departamento de Imunologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz (INCQS).

3.4.5. Ensaio desafio

Quatro grupos de 15 camundongos suíços de ambos os sexos com peso entre 12 a 17g foram inoculados via intra-muscular na pata traseira, com três doses, em intervalos de 15 dias, de lotes de conjugados (1µg de MenPSC-TT em 0,2 mL) obtidos em escala de 200 doses (lote 26) e 2.000 doses (lote 29), e 20.000 doses (lote 40), utilizando hidróxido de alumínio (1 mg/dose). Grupos de animais controle foram inoculados com PBS (0,2 mL), sob as mesmas condições. Os animais foram mantidos no infectório durante 1 ano e foram estudados no ensaio de desafio com cepa heteróloga de *N.meningitidis* grupo C (N1002/90), utilizando um modelo de infecção hiperferrêmico (SIFONTES et al., 1997). O peso representativo de um destes animais imunizados com o conjugado (lote 40) e mantidos no infectório durante 1 ano, aproximadamente 89g, está apresentado na Figura 7. Os animais foram inoculados via intraperitoneal, com 9 mg de ferro-dextran (Sigma) em 0,5 mL de suspensão, imediatamente antes do desafio com 0,5 mL da suspensão bacteriana (4×10^6 UFC/mL), também via intraperitoneal. A suspensão desafio correspondeu em média a 5 – 10 x Dose Letal 50 (DL₅₀), dose da suspensão bacteriana capaz de induzir 50% de morte dos animais, que foi determinada a cada ensaio para avaliação da virulência da suspensão. Os animais foram

acompanhados por 72h para avaliação das taxas de sobrevivência (JESSOUROUN, 2001; JESSOUROUN et al., 2004).



Figura 7. Peso em gramas de um camundongo imunizado por via intra-muscular com 3 doses da vacina conjugada MenPSC-TT (lote 40; 20.000 doses), mantido no infectório durante 1 ano e desafiado com suspensão bacteriana

3.4.6. ELISPOT

Grupos de camundongos suíços de ambos os sexos com peso entre 12 a 17g foram inoculados via intra-muscular na pata traseira, com 3 doses em intervalos de 21 dias dos lotes 29 e 30 do conjugado, obtidos em escalas menores ou em intervalos de 15 dias da vacina conjugada MenPSC-TT liofilizada (lote 40; 1 μ g/0,2 mL), MenPSC (5 μ g/0,2 mL) e PBS (0,2 mL), com hidróxido de alumínio (1mg/dose). Os animais foram desafiados com suspensão bacteriana (1 a 5 x 10⁶ UFC/mL da cepa heteróloga de *N.meningitidis* grupo C (N1002/90) após diferentes tempos de imunização (12, 19 e 14 meses) e os sobreviventes foram utilizados para retirada de células de baço e medula em diversos períodos após o desafio (13 e 30 dias), para pesquisa de células B de curta e longa duração produtoras de IgG, respectivamente (BERNASCONI, TRAGGIAI & LANZAVECCHIA, 2002; MEIKLEJOHN et al., 2004).

Placas de nitrocelulose com 96 cavidades (MAHA S4510; Millipore) foram revestidas com 100µL/poço de diferentes estímulos (MenPSC + albumina metilada, para fixação do antígeno na placa; 5µg/mL em PBS estéril), TT (4µg/mL em Tris-HCl estéril) e conjugado 40 (4µg/mL em Tris-HCl estéril) e incubadas durante 16h a 4°C. No dia seguinte as placas de nitrocelulose foram lavadas 2 vezes com 200µl de meio RPMI incompleto (0,06% de L-glutamina; 0,2% de bicarbonato de sódio; 0,00762% de penicilina) e bloqueadas com 200µl de meio RPMI completo (0,06% de L-glutamina; 0,2% de bicarbonato de sódio; 10% de soro fetal bovino, SFB; 0,00762% de penicilina) a 37° C durante 2 horas. Os animais imunizados foram sacrificados em câmara de CO₂ para a retirada dos baços. As células esplênicas foram homogenizadas mecanicamente com recipiente com tela de aço inoxidável para serem dissociadas, usando meio RPMI completo. Da mesma forma, as células da medula foram coletadas do fêmur dos animais sacrificados, em meio RPMI completo. A suspensão celular esplênica ou medular foi centrifugada a 4° C (1500 rpm por 10 min). Após este período o sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em solução hemolisante (Tris-HCl 0,16M com cloreto de amônia 0,16M, pH 7,2; 3ml/baço) durante 3 min. Foram então acrescentados 10 mL de meio RPMI completo à suspensão celular e, após nova etapa de centrifugação a 4° C (1500 rpm por 10 min), foram realizadas mais 2 etapas de lavagem. As células do baço e medula foram ressuspensas em meio RPMI completo para a detecção de células viáveis, utilizando-se o corante azul de tripan (0,1%, diluição 1:10). A suspensão celular esplênica foi diluída em meio RPMI completo até a concentração de 1, 2, 4 ou 8 x 10⁵ células/mL e adicionada na placa sensibilizada com o antígeno (200µL/poço). Da mesma forma, a suspensão medular também foi diluída em meio RPMI completo até a concentração de 8 x 10⁵ células/mL e plaqueada (200µL/poço). As placas foram incubadas durante 16h, a 37°C e 5% CO₂. No dia seguinte as placas foram lavadas 4 vezes com PBS 0,05%/Tween 20 0,02% (PBS/T20), foram adicionados 100µl/poço do anticorpo monoclonal anti-IgG

biotinilado diluído 1:10.000 em PBS/T20 com soroalbumina bovina (BSA) 0,1% e procedeu-se então a incubação à temperatura ambiente, durante 2h. Foi realizado novo ciclo de lavagem com PBS/T20 (4 vezes), a adição de 100µl/poço do conjugado (estreptavidina marcada à peroxidase) diluído em PBS/T20 1/1000 e incubação por 1 hora a 37°C. Finalmente as placas foram submetidas a novo ciclo de lavagem com PBS/T20 (4 vezes) e 1 vez com PBS e reveladas com a adição da solução de de 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) em dimetilformamida e tampão acetato 0,1M na presença de 12µL de água oxigenada 30%, durante 25 min, de acordo com protocolo descrito anteriormente (ANTHONY & LEHMANN, 2003). As placas foram rinsadas em água corrente, secadas durante 16h e os pontos corados de marron pelo AEC (“spots”) foram contados utilizando-se um leitor de ELISPOT (ImmunoSpot® Series I Analyser, Cellular Technology Ltd., Cleveland, Ohio, USA), com programa ImmunoSpot 3,2. Inicialmente, para o estabelecimento das condições do ensaio, relativas à concentração de células totais e dos estímulos na placa, foram utilizados 3 poços para cada amostra. Posteriormente, nos ensaios utilizando-se apenas MenPSC-TT como estímulo na placa, foram utilizados 12 poços para cada amostra. O número de células produtoras de IgG contra cada estímulo foi utilizado para o cálculo da média e todos os “spots” foram normalizados para o número de células que formam “spots” (CPS) por 1×10^7 de células totais. Estes valores foram obtidos pela subtração da média dos valores de poços de controle negativo, ou seja, sem a presença de células (CZERKINSKY et al., 1983; SEDGWICK et al., 1983; MEIKLEJOHN et al., 2004).

3.4.7. Cultura de esplenócitos para marcação intracelular de citocinas e de superfície por citometria de fluxo

Quatro grupos de camundongos suíços de ambos os sexos com peso entre 12 a 17g foram inoculados via intra-muscular na pata traseira, com 2 ou 3 doses, com hidróxido de alumínio (1 mg/dose), em intervalos de 15 dias, de:

Grupo 1 – Vacina conjugada MenPSC-TT liofilizada (lote 40; 1µg/0,2 mL)

Grupo 2 – MenPSC (5µg/0,2 mL)

Grupo 3 – TTH (3,5µg/0,2 mL)

Grupo 4 – PBS (0,2 mL)

Três animais de cada grupo foram sacrificados 10 dias após a 2^a ou 3^a dose para a retirada dos baços. Outros 10 animais por grupo foram inoculados com uma fonte de ferro exógena (ferro-dextran, 9mg em 0,5 mL/animal) e desafiados com uma suspensão bacteriana (1×10^7 UFC/mL), via intra-peritoneal. Após 10 dias os animais que sobreviveram ao desafio foram sacrificados para a retirada dos baços para o estudo de citocinas intracelulares produzidas por células T e marcadores de superfície de diferentes sub-populações celulares, em ensaios de citometria de fluxo. 15 animais de cada grupo foram mantidos no infectório durante 4 meses e foram submetidos ao mesmo protocolo descrito abaixo, para o estudo de marcadores de superfície de células com fenotipo de células de memória. As análises foram realizadas na Divisão de Medicina Experimental da Coordenação de Pesquisa do Instituto do Câncer (INCA), sob a coordenação da Prof^a. Adriana Bonomo.

As células foram homogenizadas mecanicamente com recipiente com tela de aço inoxidável para serem dissociadas usando meio RPMI completo (0,06% de L-glutamina; 0,2% de bicarbonato de sódio; 10% SFB; 0,00762% de penicilina). A suspensão celular foi centrifugada a 4° C (1500 rpm por 10 min). Após este período o sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em 3ml/baço de solução hemolisante Tris -HCl 2M pH 7,5 e deixadas reagindo por 3 min. Foram acrescentados 10 mL de meio RPMI completo à suspensão celular e após nova etapa de centrifugação a 4° C (1500 rpm por 10 min), foram

realizadas mais 2 etapas de lavagem. As células esplênicas foram ressuspensas em meio RPMI completo e foram contadas utilizando azul de tripan (0,1%, diluição 1:10) para a detecção de células viáveis. A suspensão celular foi diluída em meio RPMI completo até a concentração de 3×10^6 células/mL e plaqueadas (1mL/poço). A ativação das células foi realizada com o conjugado (lote 40; 4µg/mL; 12µl/poço). As placas foram incubadas a 37°C e 5% CO₂ durante 5, 12 e 16h para a determinação do melhor tempo de incubação.

3.4.7.1. Marcação intracelular para detecção de citocinas

O protocolo de marcação intracelular utilizado foi descrito por Vasconcelos et al. (2003; 2006). Monensina (5µl/poço da solução 600µM) foi adicionada 5h antes do término do período de ativação, para evitar o transporte de vesículas e liberação subsequente da citocina produzida. Após o período de incubação as células foram centrifugadas a 450 X g (2000 rpm) durante 5 min e fixadas em paraformaldeído 2% (200µl/tubo). Posteriormente, após 5 min, foi realizada uma centrifugação, seguida de lavagem com PBS 0,01M pH 7,4-7,6 (400µl/tubo). Após nova etapa de centrifugação, uma solução de saponina 0,3% em PBS (10µl/tubo) foi adicionada, seguida de anticorpos monoclonais conjugados com ficoeritrina (PE; BD Biosciences), para detecção de citocinas intracelulares: anticorpo anti-IL-4, anti-IFN-γ e anti-IL-10 (0,5µl/poço). Todos os anticorpos foram obtidos em ratos. Os tubos foram agitados em vortex e reagiram durante 30 min sob abrigo da luz. Após este período foi adicionada solução de saponina 0,3% (200µl/tubo) para a retirada dos anticorpos não aderidos. As suspensões celulares foram centrifugadas e ressuspensas em PBS 0,01M pH 7,4 – 7,6 (1ml/tubo) para leitura no citômetro (MAWAS, FEAVERS & CORBEL, 2001; BUCHANAN et al, 2001; PÉREZ-MELGOSA et al., 2001). Foi realizada marcação dupla para detecção de citocinas intracelulares e das células T produtoras destas moléculas, através da marcação de superfície com anticorpos anti-CD4 e anti-CD8, de acordo com o protocolo descrito a seguir. As células

marcadas com fluorescência (10.000 eventos), presentes na “janela” de células linfóides, selecionadas por tamanho e granulosidade, foram adquiridas com equipamento FACSCalibur™, utilizando o software CellQuest™ (BD Biosciences) para as análises. Os resultados são representados como percentagem de células T que produzem as citocinas. O sinal obtido com a liberação espontânea de citocinas na ausência do antígeno foi subtraído em cada experimento.

3.4.7.2. Marcação de superfície

O protocolo de marcação de superfície utilizado foi descrito por Vasconcelos et al. (2003; 2006). A suspensão de células esplênicas foi bloqueada com 10µl/poço soro normal de camundongo (SNC; inativado a 56°C durante 30 min e diluído 2% em PBS 0,01M pH 7,4 – 7,6) e adicionou-se os seguintes anticorpos monoclonais conjugados com diferentes fluorocromos (BD Biosciences): anticorpo anti-CD4⁺ (0,5µl/tubo) conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC), anti-CD8⁺ (1,25µl/tubo) conjugado com proteína clorofil peridina (PERCP), anti-CD27 (0,5µl/tubo) conjugado com ficoeritrina (PE), anti-IgD (0,5µl/tubo) conjugado com FITC, anti-CD69 (diluição 1:50; 1µl/tubo) conjugado com PE, anti-CD44 (diluição 1:100) conjugado com biotina e revelado com estreptoavidina PE (1µl/tubo). Todos os anticorpos foram obtidos em ratos, com exceção do anticorpo anti-CD69, que foi obtido em hamster. Os tubos foram agitados em vortex, deixados 15 min sob abrigo da luz, lavados com PBS 0,01M pH 7,4 – 7,6 (400µl/tubo) e centrifugados a 450 X g (2000 rpm) durante 5 min. Finalmente foi adicionado paraformaldeído 2% (200µl/tubo) e os tubos foram conservados a 4°C para leitura no citômetro. As células marcadas com fluorescência (10.000 eventos), presentes na “janela” de células linfóides, selecionadas por tamanho e granulosidade, foram adquiridas com equipamento FACSCalibur™, utilizando o software CellQuest™ (BD Biosciences) para as análises. A intensidade de fluorescência

inespecífica obtida com o controle de isotipos foi considerada em cada experimento (SALLUSTO et al., 1999; BERNASCONI, TRAGGIAI & LANZAVECCHIA, 2002; GOLDBLATT, BORROW & MILLER, 2002; GEGINAT, LANZAVECCHIA & SALLUSTO, 2003; VASCONCELOS et al., 2003; 2006).

3.5. Estabilidade da vacina conjugada MenPSC-TT liofilizada

A avaliação da estabilidade da vacina conjugada liofilizada (lote 40), em tempo real, após 0, 11 e 22 meses de estocagem a 4°C, foi realizada através do grau de despolimerização obtido por cromatografia de exclusão, utilizando coluna TSK-G[®] 4.000 Pwxl (detecção em 206nm). Os títulos de IgG total contra o polissacarídeo, presentes em soro de camundongos imunizados com três doses da vacina piloto (1µg/dose), em intervalos de 15 dias, também foram determinados por ELISA, como descrito anteriormente no ítem 3.4.2.1. Este ensaio foi utilizado como parâmetro de estabilidade da vacina conjugada após 6 e 15 meses de estocagem (detecção de IgG total antes de cada dose e um mês após a 3ª dose) e após 26 meses de estocagem, com detecção dos títulos de anticorpos apenas um mês após a última dose (JONES et al., 1996; EGAN, 2000; HO et al., 2002).

3.6. Análises estatísticas

Para fins de análise os títulos de atividade bactericida do soro (SBA) foram transformados logaritmicamente (Ln). A significância das diferenças nos níveis de anticorpos entre os grupos, seus títulos SBA e da frequência de células B produtoras de IgG presentes no baço e medula de animais imunizados, foi obtida por Análise de Variância Multifatorial (ANOVA), seguida pelo teste “Least significant difference” (LSD), para a comparação dos grupos com os controles. Os índices de avides (IAs) dos anticorpos foram comparados para cada concentração da vacina pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis. Os coeficientes de

correlação de Pearson foram determinados nas análises de correlação entre títulos de IgG ou IAs e títulos SBA. Para a comparação da significância das diferenças detectadas nos percentuais de células marcadas nos ensaios de citometria de fluxo, foi utilizada ANOVA Multifatorial, seguida pelo teste Bonferroni. Foi utilizado o teste W (Wilcoxon) de Mann-Whitney para a comparação entre os títulos de IgG1 e IgG2b induzidos pela vacina conjugada e de títulos de IgG induzidos após 6 e 15 meses de estocagem a 4°C. O software Statgraphics[®] Plus Version 4.1 (USA) foi utilizado em todos os cálculos estatísticos. Os testes estatísticos utilizaram um intervalo de confiança de 95% e o limite para significância estatística foi determinado para $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Detecção e caracterização estrutural dos componentes intermediários e conjugados

O polissacarídeo nativo (MenPSC) avaliado por espectroscopia de espalhamento de luz apresentou um peso molecular de 928 KDa. A identidade do MenPSC nativo, produzido como descrito nos Requerimentos da OMS, foi avaliada por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (^1H RMN) (Figura 8). Os picos na faixa de 5,0 a 5,2 ppm correspondem aos átomos de hidrogênio H-7 e H-8 do MenPSC *O*- e *N*-acetilado. Os deslocamentos químicos observados na faixa de 3,3 a 4,2 ppm são relacionados aos átomos de hidrogênio H-4, H-5, H-6, H-9, H-9', H-7' e H-8' do MenPSC não acetilado (Figura 8). Os picos relacionados ao H-3 equatorial são detectados na faixa que compreende 2,5 a 2,8 ppm e os deslocamentos químicos observados na faixa de 1,5 a 1,8 ppm, correspondem ao H-3 axial. Os picos correspondentes ao N-acetil e O-acetil têm deslocamentos químicos em 2,0 e 2,2 ppm, respectivamente. Os picos observados em 1,2 e na faixa de 3,3 a 4,2 ppm são relativos aos deslocamentos químicos dos grupos CH_3 e CH_2 do etanol, respectivamente. Pode-se observar também o pico de HDO em 4,6 ppm. O espectro de ^1H RMN contém todas as espécies cujas ressonâncias têm sido designadas aos átomos individuais presentes na unidade repetida do açúcar (ácido siálico) e são consistentes com a estrutura publicada em diversos artigos (BHATTACHARJEE et al., 1975; JONES et al., 1996; LEMERCINIER & JONES, 1996; JONES & LEMERCINIER, 2002).

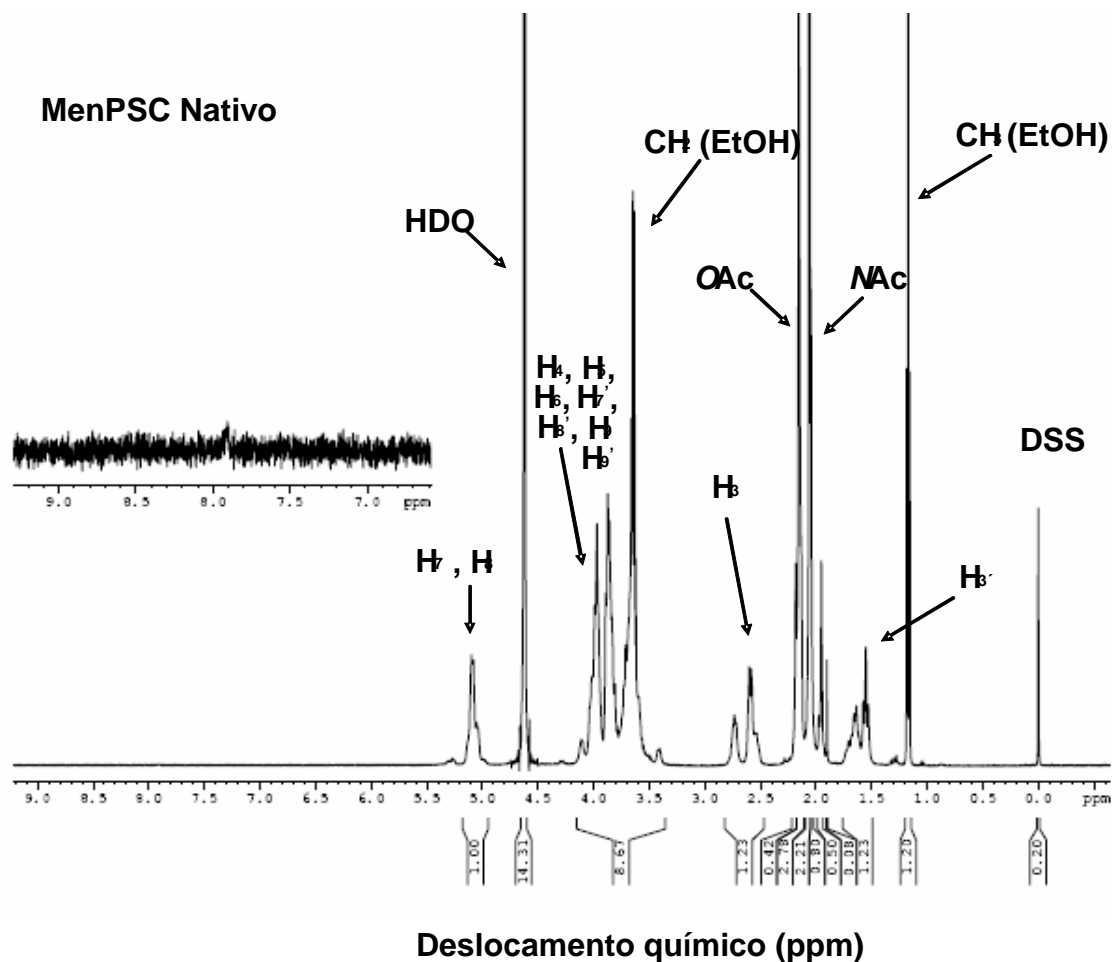


Figura 8. Espectro ^1H RMN 1D do MenPSC nativo - 500 MHz, 37°C.

A ativação do MenPSC nativo com periodato de sódio está ilustrada na Figura 9 [(1) – Ativação do MenPSC]. O espectro de ^1H RMN do MenPSC ativado apresenta os mesmos assinalamentos descritos acima para o MenPSC nativo, mostrando que a estrutura do polissacarídeo permanece inalterada após o tratamento com o periodato de sódio (Figura 9). Por outro lado, o espectro também mostra que deslocamentos químicos próximos a 8,4 ppm estão presentes, correspondendo a ressonâncias de novos grupos terminais formados durante a reação de oxidação com periodato de sódio (Figura 10). Os deslocamentos químicos podem

ser observados como um sinal com baixa intensidade em 8,4 ppm, consistente com o grupo aldeídico. Podem ser vistos ainda, dois pequenos picos relativos aos grupos CH₃ e CH₂ provenientes do etanol em 1,2 e entre 3,3 a 4,2 ppm e um novo pico com deslocamento químico em 5,0 ppm correspondente ao aldeído hidratado (Figura 10).

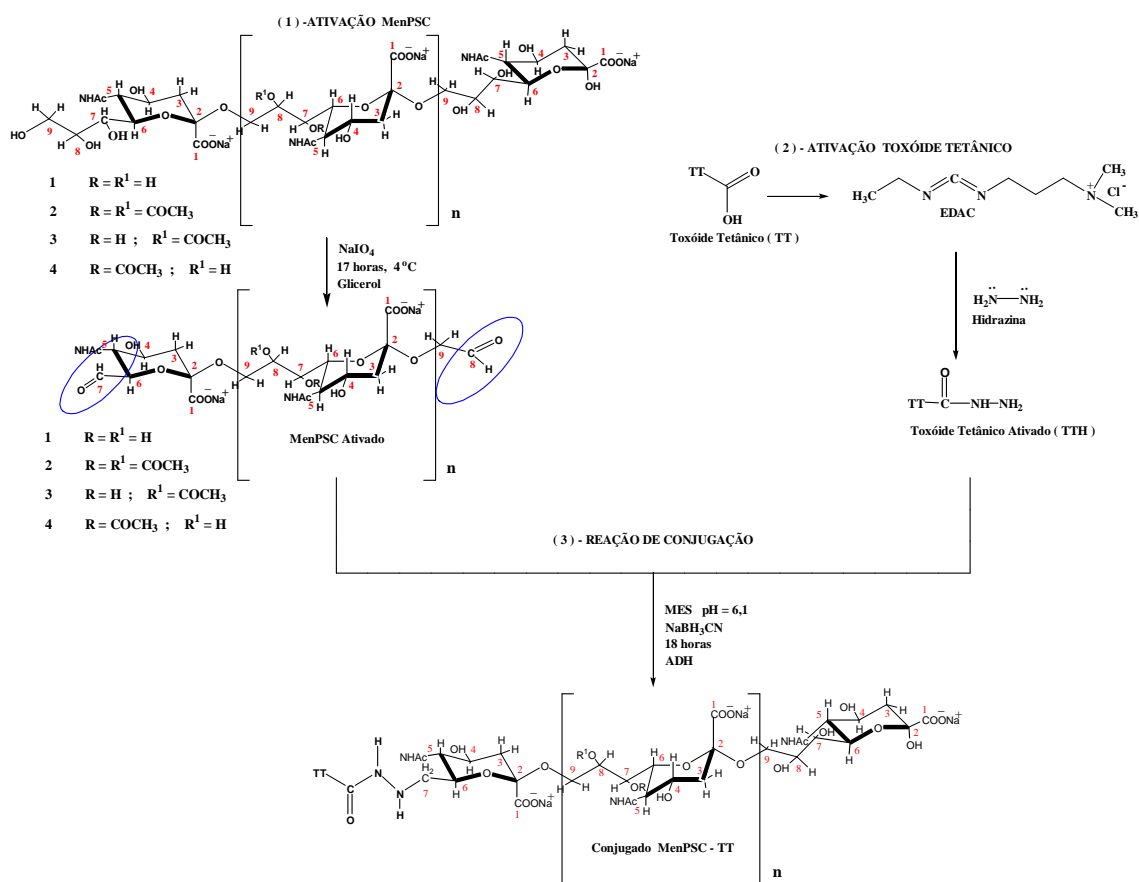


Figura 9. Esquemas reacionais da ativação do MenPSC nativo, TT e da conjugação entre o MenPSC ativado e TTH por aminação reductiva.

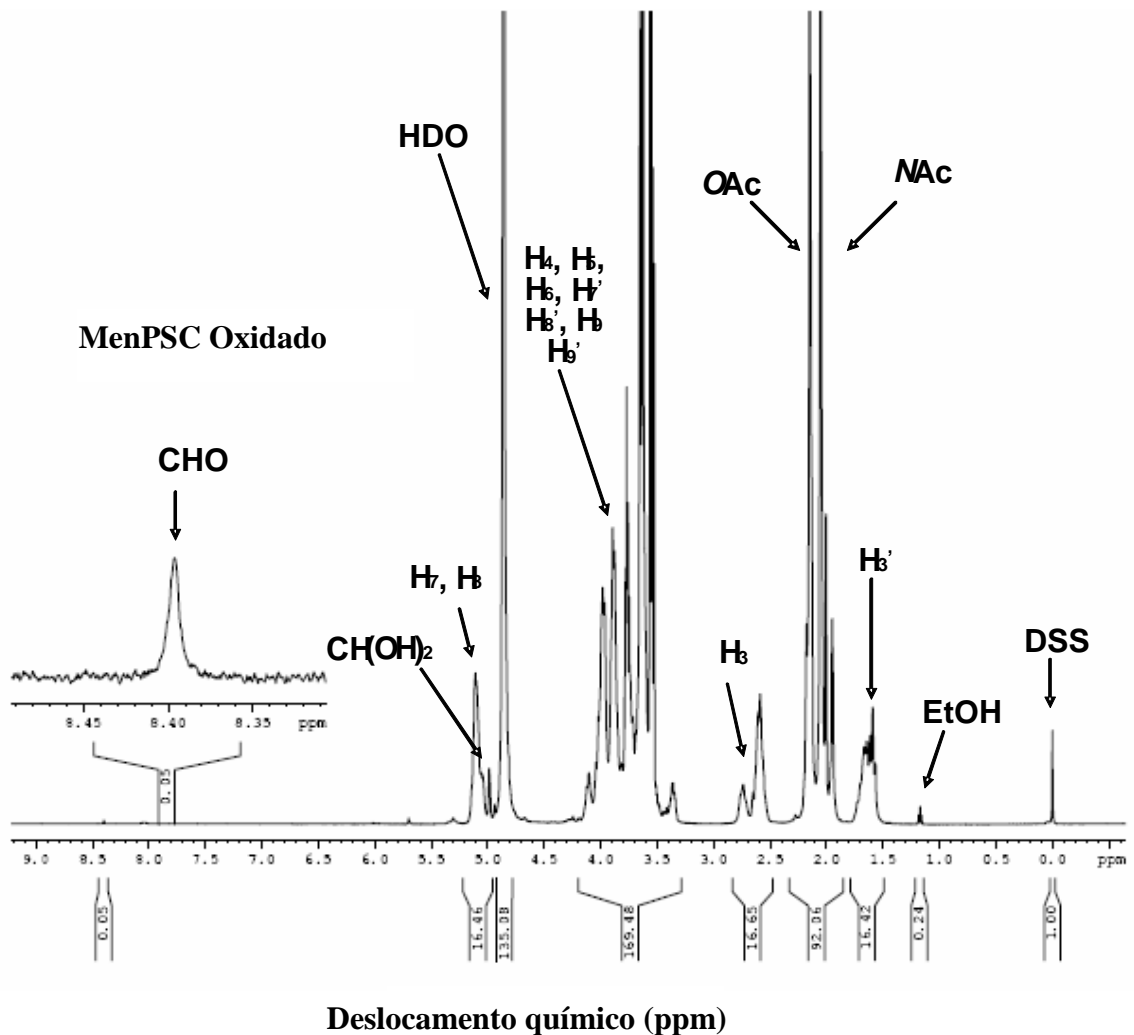


Figura 10. Espectro ^1H RMN 1D do MenPSC ativado - 500 MHz, 37°C .

Estes resultados demonstraram a eficiência da introdução de grupamentos funcionais para a reação posterior com grupos amino presentes na proteína (TTH). Os perfis de eluição do MenPSC nativo, ativado não purificado e purificado utilizando-se sistema de filtração tangencial estão mostrados na Figura 11. Os resultados demonstram que a reação de oxidação, utilizando-se o periodato de sódio, promove a clivagem oxidativa, com a obtenção de

moléculas menores, com maior tempo de retenção em cromatografia de exclusão (19,8 min) do que a molécula nativa (13,6 min). Além disto, pode ainda ser observado no perfil de eluição do MenPSC ativado a eficiência do processo de purificação devido à remoção do impurezas presentes no pico referente ao MenPSC ativado não purificado, correspondendo aos reagentes adicionados na reação de oxidação (Figura 11).

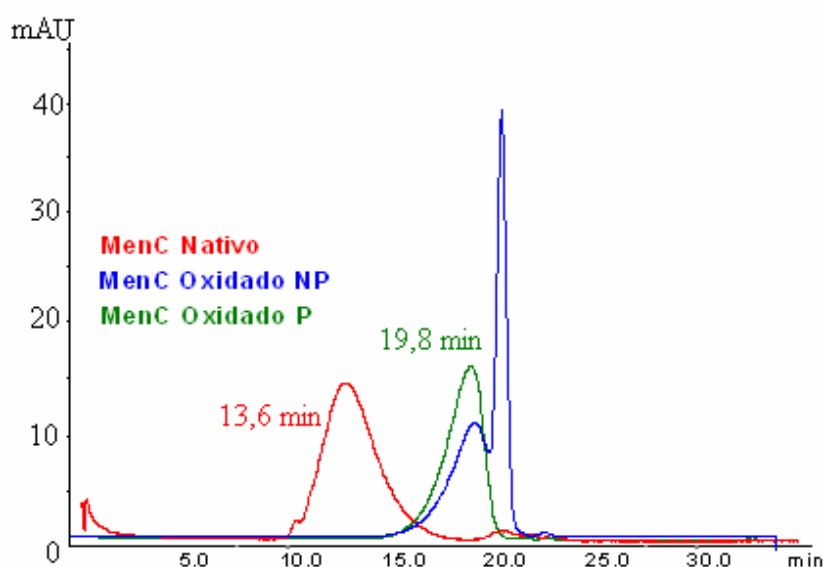


Figura 11. Perfil de eluição do MenPSC nativo, MenPSC oxidado não purificado (NP) e MenPSC oxidado purificado (P), em cromatografia de exclusão (TSK 4000 Pwxl; 206 nm).

A reação de ativação do TT com cloridrato de hidrazina (TTH) está ilustrada na Figura 9 [(2) – Ativação do TT]. Pode-se observar que os perfis de eluição das moléculas nativa e ativada são similares em cromatografia de exclusão, apresentando tempos de retenção de 15,7 e 15,8 minutos, respectivamente (Figura 12). A etapa de purificação utilizando-se sistema de filtração tangencial foi capaz de remover os resíduos de EDAC e diminuir o teor de hidrazina a níveis muito baixos (0,362 mg/L), no TTH (lote 02/04). Após a purificação, TTH reagiu

com MenPSC ativado, dando origem ao conjugado MenPSC-TT através de uma metodologia de conjugação nova e altamente eficiente [Figura 9 (3) – Reação de Conjugação].

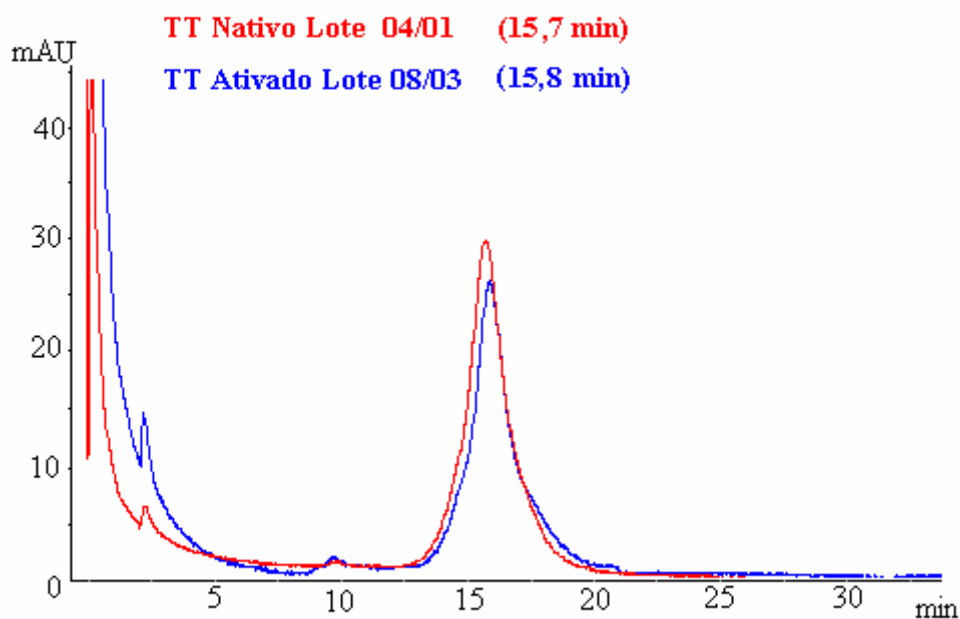


Figura 12. Perfil de eluição do TT nativo (lote 04/01) e do TT ativado (TTH; lote 08/03) em cromatografia de exclusão (TSK 4000 Pwxl; 280 nm).

Quatro lotes de conjugado MenPSC-TT foram produzidos em diferentes escalas, contendo de 200 a 2.000 doses humanas (10 μ g/dose), pelo método modificado de aminação redutiva, onde o MenPSC ativado foi acoplado ao TTH em presença de cianoborohidreto de sódio, como agente redutor. O sucesso da reação de conjugação foi avaliado pelo perfil do produto reacional em cromatografia de exclusão, que apresentou um tempo de retenção menor correspondente ao perfil de eluição de um produto com maior peso molecular (14,5 min), claramente diferente dos perfis apresentados pelo polissacarídeo e proteína (Figura 13). Pode-se observar a presença de um ombro no perfil de eluição do conjugado não purificado, correspondente ao polissacarídeo não conjugado e a resíduos de reagentes (Figura 13).

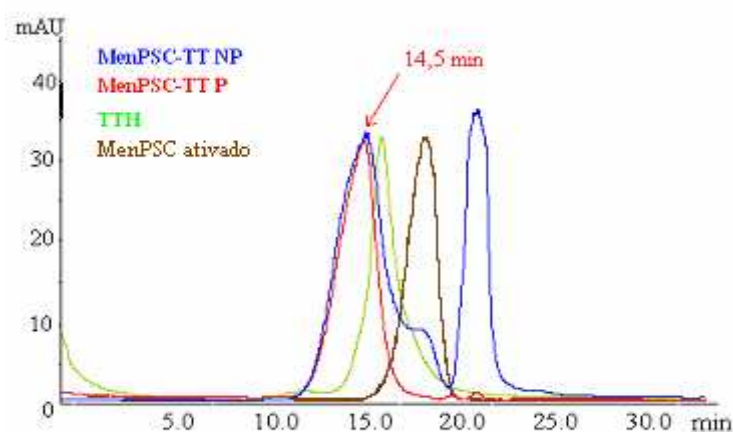


Figura 13. Perfis de eluição do conjugado MenPSC-TT não purificado (NP), conjugado MenPSC-TT purificado (P), MenPSC ativado e TT ativado (TTH) em cromatografia de exclusão (TSK 4000 Pwxl; 206 e 280 nm).

Entretanto, após a utilização do sistema de filtração tangencial na etapa de purificação, observa-se a remoção de substâncias indesejadas no perfil do conjugado purificado. A formação do conjugado foi também demonstrada pelo desaparecimento dos deslocamentos químicos em 8,4 ppm, presentes no espectro do MenPSC ativado e correspondentes aos grupos aldeído (Figura 14), comprovando a participação destes grupos na reação de conjugação com a proteína. O espectro de RMN do MenPSC-TT também apresenta os mesmos assinalamentos descritos acima para o MenPSC nativo e o MenPSC ativado. Além disso, outros assinalamentos entre 0,5 a 1,8 e 6,0 a 8,0 ppm, correspondentes aos prótons alifáticos e aromáticos da proteína, foram incorporados, respectivamente (Figura 14). O pico observado na faixa de 4,4 a 4,7 ppm corresponde à água residual presente na molécula mesmo após ter sido realizada a supressão da água para a análise em RMN.

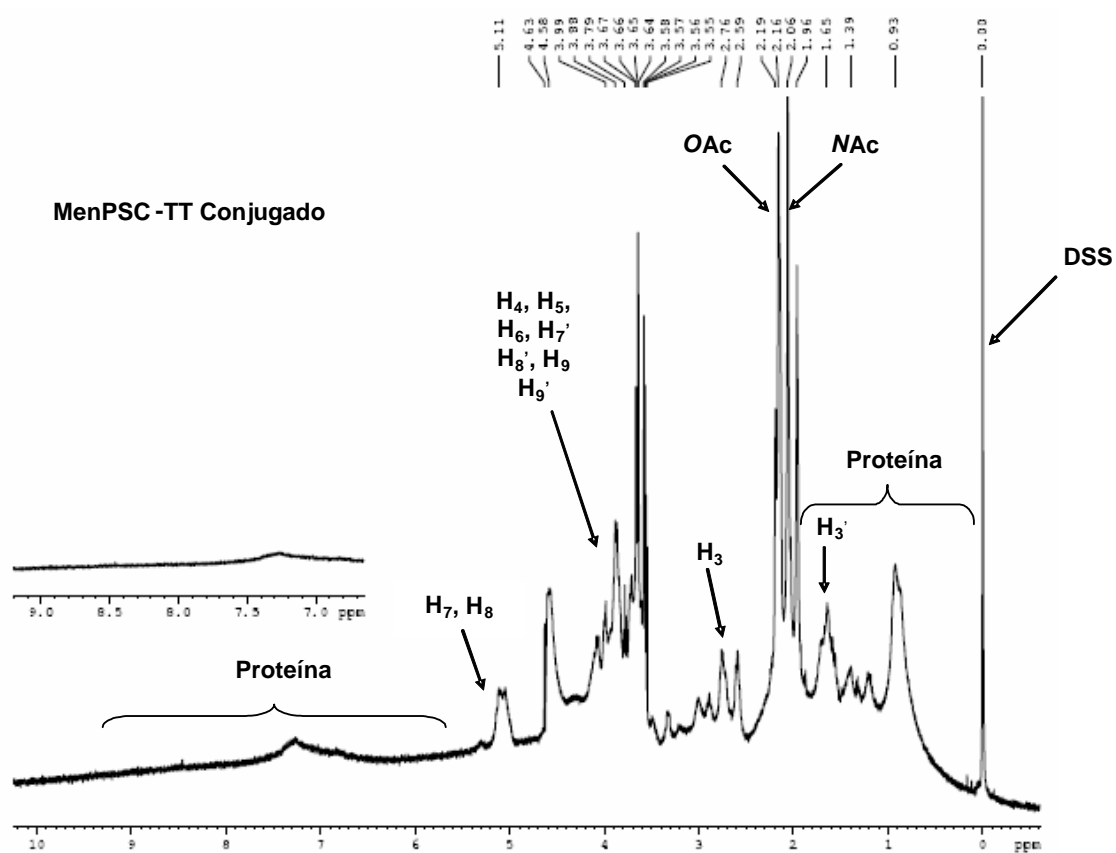


Figura 14. Espectro $^1\text{HRMN}$ 1D do MenPSC conjugado - 500 MHz, 37°C .

Os lotes de conjugado MenPSC-TT obtidos nas escalas de 200 e 2.000 doses humanas (lotes 26, 28, 29 e 30) foram avaliados quanto ao teor de açúcar e proteína presentes, o que possibilitou o cálculo das razões (mg:mg) entre o polissacarídeo e proteína. Estes valores variaram de 0,2 a 0,5 (Tabela 2). Posteriormente, com o objetivo de avaliar as condições padronizadas para a obtenção dos conjugados, foi realizado o escalonamento para a produção de lotes com 20.000 doses humanas. As razões de açúcar e proteína também estão apresentadas na Tabela 2. Os dois lotes obtidos possuem razões na faixa determinada anteriormente, para as escalas menores. Estes lotes também mostraram perfis de eluição similares, em cromatografia de exclusão, demonstrando a reprodutibilidade da reação de conjugação, com um fator de escalonamento de 10 (Figura 15).

Conjugados (Lotes)	Razão MenPSC:TT (mg:mg)	Nº de doses (10 µg/dose humana)
26	0,24	205
28	0,47	2.665
29	0,49	2.000
30	0,43	2.028
37	0,23	13.724
40	0,29	27.300
03/05	0,26	22.922

Tabela 2. Características de vários lotes da vacina conjugada MenPSC-TT, obtidos em escalas de 200 (lote 26), 2.000 (lotes 28, 29 e 30) e 20.000 (lotes 37, 40 e 03/05) doses humanas (10 µg/dose).

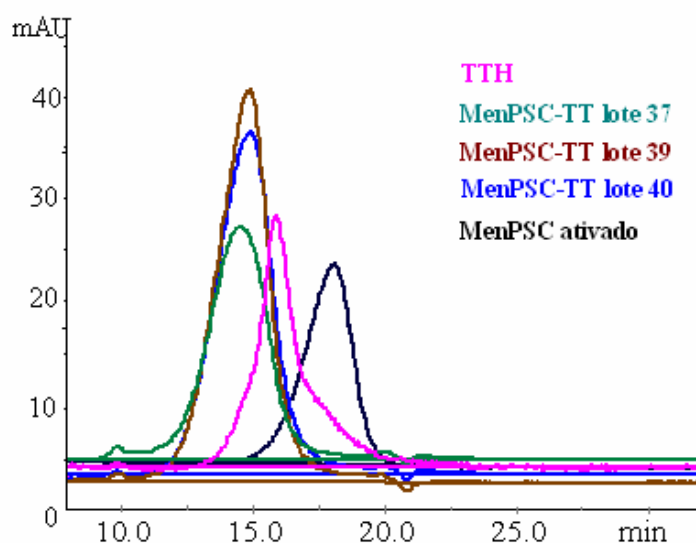


Figura 15. Perfis de eluição de diferentes lotes da vacina conjugada MenPSC-TT, obtidos em escala de 20.000 doses, MenPSC ativado e TT ativado (TTH) em cromatografia de exclusão (TSK 4000 Pwxl; 280 nm).

4.2. Testes de controle de qualidade do produto a granel e da vacina conjugada MenPSC-TT

Foram realizados diversos métodos físico-químicos para o controle de qualidade do produto a granel de conjugados. Não foi detectada a presença de resíduos de cianeto quando o produto a granel (lote 03/05) foi avaliado em um teste fotométrico padronizado (UPADAHYAY & GUPTA, 1984). As concentrações obtidas para amostras de produto a granel da vacina conjugada contra Hib, produzida em BioManguinhos, foram similares aos valores descritos em laudos externos de análise (lotes 013/05 e 015/05 = 5ppb; lotes 021/05 e 022/05 = 10ppb), sugerindo a possibilidade de utilização do método proposto para outras vacinas conjugadas que utilizam reagentes constituídos de íons cianeto no processo de produção. Os outros ensaios de controle do produto a granel, utilizando-se o lote 03/05, estão apresentados na Tabela 3. A vacina conjugada mostrou uma razão açúcar:proteína compatível com aquelas descritas para outros lotes de conjugados.

O método de quantificação do teor de açúcar livre no conjugado, através da precipitação ácida com um detergente, mostrou um percentual de recuperação de 95 a 98%, após a contaminação do lote de conjugado com quantidades conhecidas de açúcar. O percentual de açúcar livre no lote estudado foi de 15,6%. Por outro lado, não foi detectado nenhum resíduo de ADH, reagente adicionado para interrupção da reação de conjugação (Tabela 3). Nos outros testes preconizados pela OMS, relativos à inocuidade apresentada pelo produto a granel, o lote estudado foi aprovado em todos, incluindo o teste LAL que mostrou um baixo teor de endotoxina (0,115 EU/ μ g MenPSC). Estes resultados demonstraram a possibilidade da utilização do lote de conjugado na etapa de formulação e obtenção do produto final (Tabela 3).

Controle de Qualidade Produto a Granel	
(Lote 03/05)	
Teor de polissacarídeo	0,146 mg/mL
Teor de proteína	0,57 mg/mL
Razão açúcar:proteína (mg:mg)	0,26
Teor de açúcar livre	15,6 %
Resíduo de ADH (HPLC)	Não Detectado
Esterilidade	Aprovado
Pirogênio <i>in vivo</i>	Aprovado
LAL	0,115 EU/μg MenPSC
Toxicidade específica para o polissacarídeo	Aprovado
(“drink test”)	

Tabela 3. Testes de controle de qualidade utilizados para avaliação do conjugado MenPSC-TT (produto a granel, lote 03/05).

Um dos lotes obtidos na escala de 20.000 doses (lote 40) foi utilizado para a obtenção de uma vacina conjugada liofilizada, em frascos contendo 5 doses humanas (50μg/frasco; 20μg/mL). O lote piloto da vacina foi avaliado utilizando-se ensaios de controle de qualidade recomendados pela OMS, para a produção de vacinas conjugadas contra meningococo sorogrupo C. O ciclo de liofilização utilizado possibilitou a formação de uma pastilha branca e homogênea com teor de umidade satisfatório (Tabela 4). O teor de açúcar e sacarose também foram satisfatórios, quando comparados com as concentrações teóricas de 20μg/mL e 34mg/mL, respectivamente (Tabela 4). Todos os demais resultados de ensaios de controle de qualidade do produto final da vacina conjugada liofilizada foram satisfatórios, incluindo o teste LAL que mostrou um valor menor que 20 EU/μg MenPSC (< 0,0625 EU/μg MenPSC), que é o valor de referência recomendado pela OMS, sugerindo que a vacina conjugada possui baixo teor de endotoxina e é biologicamente segura (Tabela 4).

Controle de Qualidade Produto Final	
(Lote 40)	
Umidade residual	1,15%
Sacarose (HPLC)	32,45 mg/mL
Polissacarídeo	19,11 µg/mL
Razão polissacarídeo:proteína	0,3
Esterilidade	Aprovada
Pirôgênio <i>in vivo</i>	Aprovada
LAL	< 0,0625 EU/µg MenPSC
Toxicidade inespecífica	Aprovada

Tabela 4. Testes de controle de qualidade utilizados para avaliação da vacina conjugada MenPSC-TT liofilizada (produto final, lote 40).

4.3. Resposta humoral da vacina conjugada MenPSC-TT

4.3.1. Títulos de IgG induzidos contra o MenPSC e atividade bactericida do soro

A avaliação preliminar da imunogenicidade de diferentes lotes de conjugados obtidos em escalas de 200 e 2.000 doses foi realizada através da determinação de anticorpos IgG específicos e da funcionalidade destes anticorpos. As amostras do soro de camundongos imunizados com três doses, em intervalos de 21 dias, foram analisadas por ELISA e em ensaios de avaliação da atividade bactericida (Figura 16 e 17). Todos os lotes de conjugado induziram altos títulos de IgG após a 1ª dose, similares entre si mas com diferenças significativas quando comparados com os títulos de anticorpos induzidos nos grupos controles, representados pelo MenPSC nativo e PBS (Figura 16; $p < 0,05$).

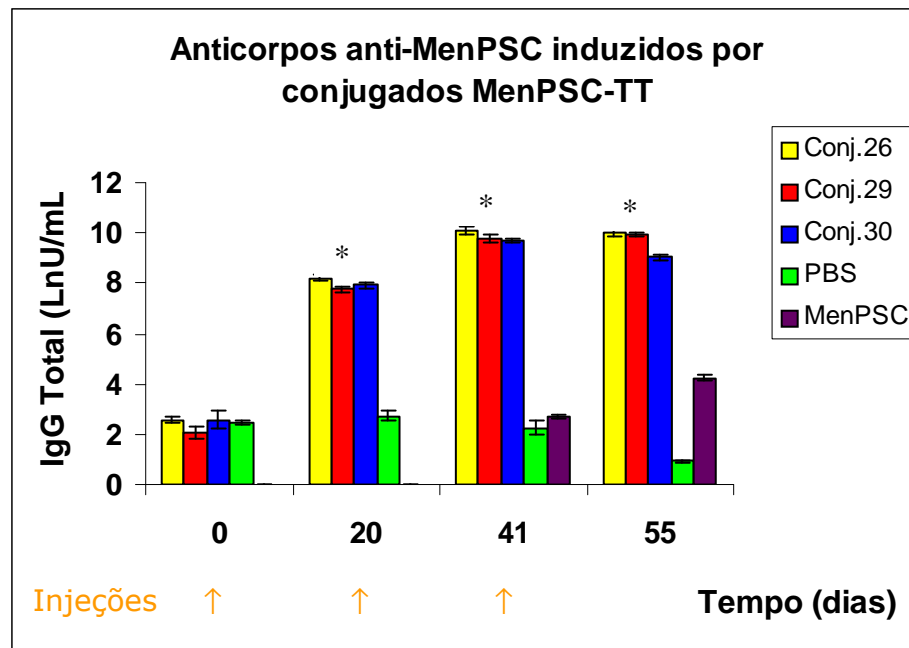


Figura 16. IgG total de camundongos imunizados por via intra-muscular com 3 doses de conjugados obtidos em escalas de 200 e 2.000 doses humanas, em intervalo de 21 dias. Os valores estão expressos em Ln de unidades de Elisa por mL (LnU/mL) e correspondem à média de 4 análises \pm erro padrão. ANOVA (Teste LSD, * $p < 0,05$).

Da mesma forma, os anticorpos produzidos apresentaram títulos de atividade bactericida similares, entretanto significativamente mais elevados do que àqueles observados nos grupos controles (1:512 vs 1:2), apenas após a 2^a dose e que se mantiveram após a 3^a dose (Figura 17; $p < 0,05$). Estes títulos foram quase 200 vezes superiores à diluição de 1:8, após a terceira dose, que corresponde ao título considerado protetor contra a doença meningocócica, quando utiliza-se soro de coelho como fonte de complemento (BORROW, BALMER & MILLER, 2005).

Diferentes concentrações do lote piloto da vacina conjugada (lote 40), obtida em escala maior de 20.000 doses, foram inoculadas em camundongos para o estudo dose-resposta. Os animais também foram imunizados com três doses, em intervalos de 15 dias e sangrados antes da cada dose e 20 dias após a última dose. Os soros foram analisados para determinação de anticorpos IgG específicos, atividade bactericida, sub-classes de IgG e

avidez dos anticorpos. Baixos títulos de anticorpos foram detectados por ELISA nos soros pré-ímmunes de todos os grupos (Tabela 5). Os títulos de IgG das amostras obtidas de animais

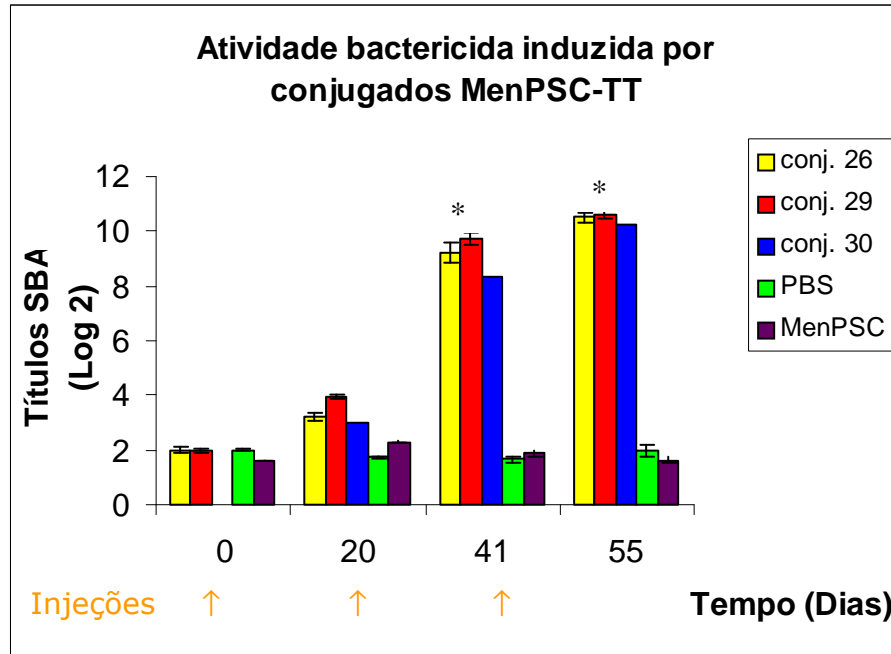


Figura 17. Atividade bactericida do soro (SBA) de camundongos imunizados por via intramuscular com 3 doses de conjugados obtidos em escalas de 200 e 2.000 doses humanas, em intervalo de 21 dias. Ceba heteróloga 1002/90 de *N.meningitidis* sorogrupo C. Os valores estão expressos em log 2 e correspondem à média de 4 análises \pm erro padrão. ANOVA (Teste LSD, * $p < 0,05$).

imunizados com o MenPSC nativo não mostraram aumento com injeções subsequentes. Entretanto, todas as concentrações da vacina conjugada induziram um aumento significativo nos títulos de IgG após a 1ª injeção, mostrando efeito reforço após a 2ª injeção com indução de memória, superior ao aumento de 4 a 8 vezes, quando comparados aos títulos induzidos pelo MenPSC nativo (Tabela 5; $p < 0,05$). A 3ª dose das três concentrações da vacina levou ao aumento de 2 vezes dos títulos de IgG. A atividade bactericida de anticorpos induzidos pelas três concentrações da vacina conjugada foi determinada utilizando-se soro de cobaias machos como fonte de complemento (Tabela 5). Amostras de soro obtidas após a 1ª injeção da vacina não induziram títulos bactericidas. Todos os animais imunizados com a vacina conjugada (lote 40) apresentaram valores de atividade bactericida detectáveis (acima de 1:8) após a 2ª dose com títulos significativamente mais altos para os grupos imunizados com 1 e 10 μ g/dose.

Estes títulos mostraram um aumento de 12 a 20 vezes dos títulos induzidos pelo MenPSC nativo e podem ser correlacionados com títulos considerados protetores para a doença meningocócica ($p < 0,05$). Da mesma forma que no ensaio de ELISA, a 3ª dose induziu um aumento de 2 a 5,5 vezes nos títulos de atividade bactericida, em comparação com a 2ª dose (Tabela 5).

Dose	Pré-imune		Após 1ª Dose		Após 2ª Dose		Após 3ª Dose	
	IgG	SBA	IgG	SBA	IgG	SBA	IgG	SBA
Conjugado (0,1µg/dose)	1,05	2,00	4,15*	2,00	6,57*	21,86	7,44	48,50
Conjugado (1µg/dose)	0,65	2,00	4,18*	2,00	7,89*	82,14*	9,04	451,94
Conjugado (10µg/dose)	0,10	2,00	3,48*	2,00	7,45*	49,52*	8,69	103,97
MenPSC Nativo	0,55	2,00	1,66	2,00	1,99	4,00	2,00	2,00

Tabela 5. IgG total e atividade bactericida do soro (SBA) de camundongos imunizados por via intra-muscular com diferentes concentrações da vacina conjugada MenPSC-TT, em intervalos de 15 dias. Estudo dose-resposta. Títulos de IgG total estão expressos em Ln de unidades de Elisa por mL (LnU/mL). Títulos SBA estão expressos como a recíproca da diluição do soro que induziu $\geq 50\%$ lise bacteriana e foram log-transformados para os cálculos. ANOVA (Teste LSD; * $p < 0,05$).

4.3.2. Sub-classes de IgG

Em função dos resultados do estudo dose-resposta com a vacina conjugada liofilizada, onde 1 µg/dose foi suficiente para induzir resposta adequada em camundongos suíços, esta concentração foi utilizada para a detecção dos isotipos de IgG induzidos contra o

polissacarídeo por ELISA (Figura 18). A vacina foi capaz de induzir títulos elevados de IgG1 e IgG2b, sem a detecção de IgG2a. O título de IgG2b foi significativamente diferente, principalmente após a 1ª dose da vacina (Figura 18, $p < 0,05$).

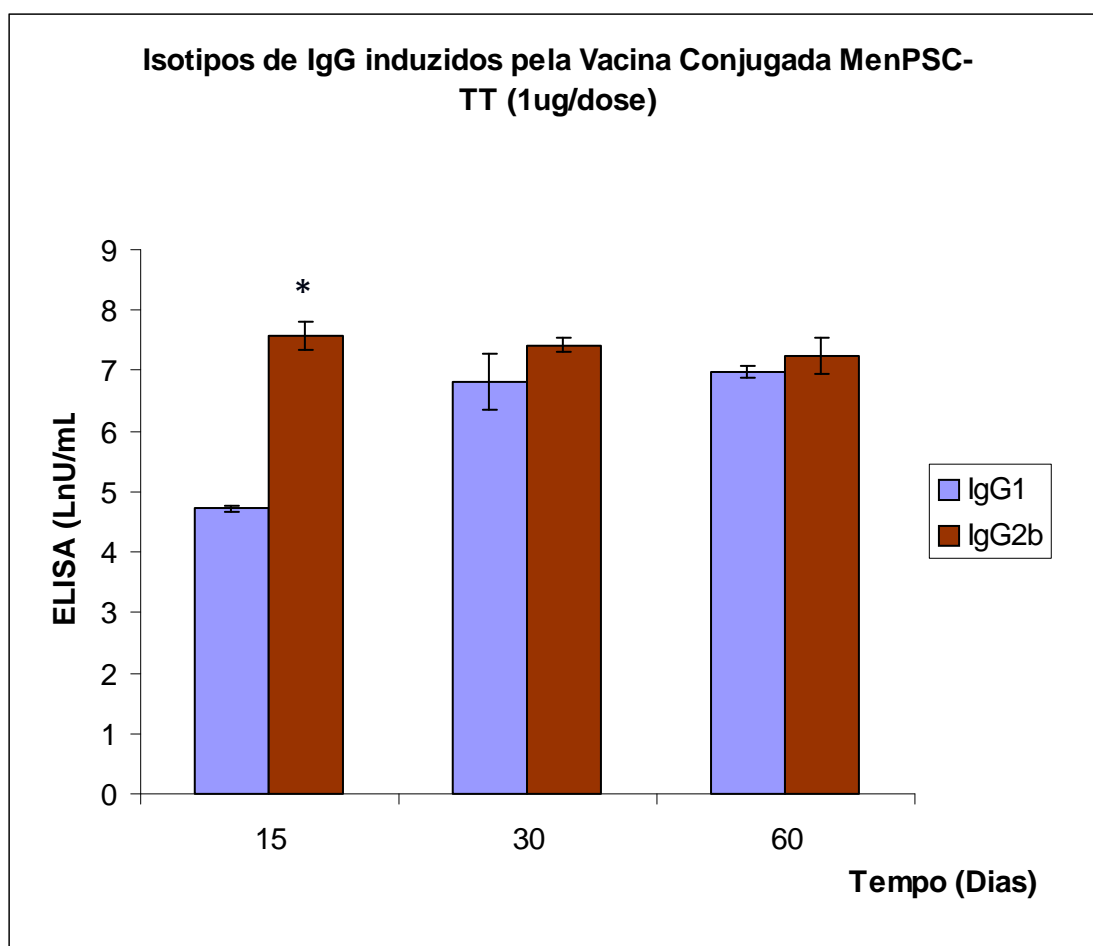


Figura 18. Isotipos de anticorpos IgG anti-MenPSC (ELISA) de camundongos imunizados por via intra-muscular com 3 doses (1 µg/dose) da vacina conjugada MenPSC-TT, em intervalos de 15 dias (lote 40). Os títulos de IgG total estão expressos em Ln de unidades de Elisa por mL (LnU/mL) e correspondem à média de 6 análises \pm erro padrão, após a 1ª dose (T15 dias), após a 2ª dose (T30 dias) e 30 dias após a 3ª dose (T60 dias). Teste W de Mann-Whitney; $p < 0,05$.

4.3.3. Índice de avides dos anticorpos

Na maioria das amostras de soros pré-ímmunes de animais imunizados com diferentes concentrações da vacina conjugada liofilizada (lote 40), os títulos de anticorpos contra o polissacarídeo estão abaixo do limite de detecção (absorbância de 0,8 a 1,0). Desta forma, os

índices de avidez (IAs) não puderam ser calculados porque não alcançariam o mínimo de 50% de redução da absorbância, conforme representação gráfica apresentada na Figura 19. Entretanto, os grupos de animais imunizados com 0,1 and 1 μ g por dose apresentaram um aumento significativo na avidez dos anticorpos IgG, após a 3^a dose (Figura 20). Os IAs destes dois grupos foram de 1 e 1,28, respectivamente, 20 dias após a última dose ($p < 0,05$). Embora o grupo imunizado com 10 μ g tenha induzido altos títulos de IgG com atividade bactericida, o IA foi mais baixo do que aqueles induzidos pelas outras concentrações da vacina conjugada. Estes resultados demonstram que ocorreu o processo de maturação da afinidade dos anticorpos IgG, após repetidas injeções de baixas concentrações da vacina conjugada.

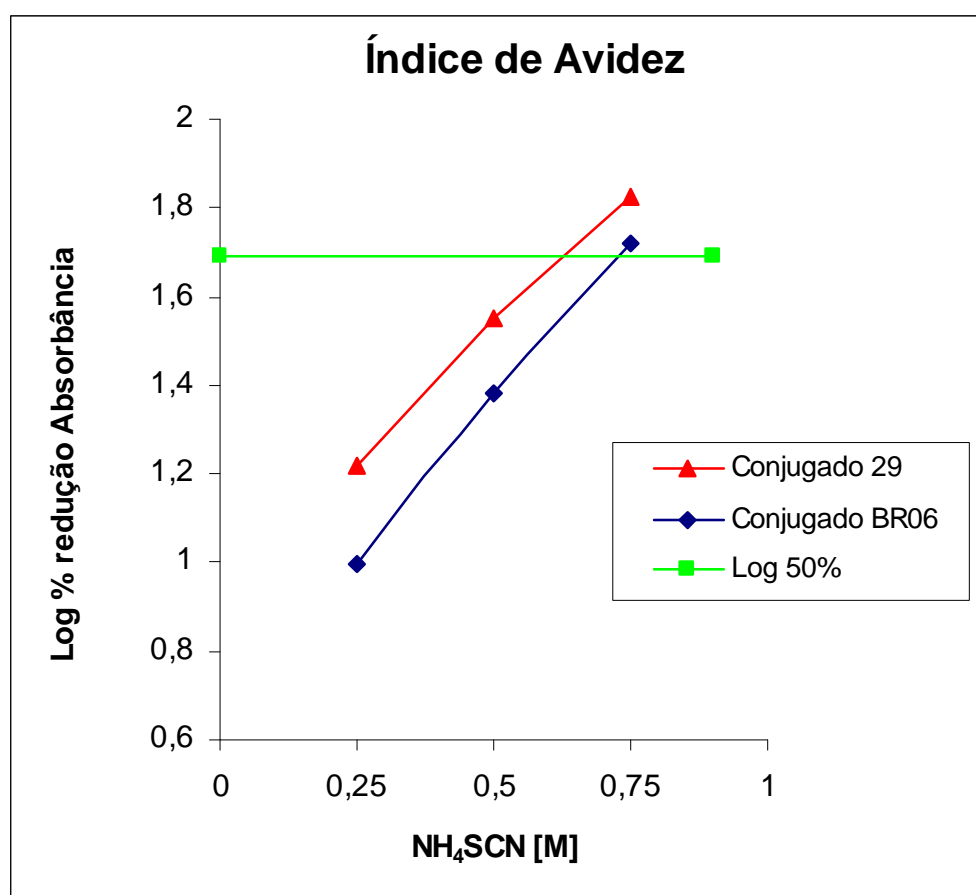


Figura 19. Gráfico representativo do cálculo dos índices de avidez (IAs) de anticorpos IgG anti-MenPSC (ELISA) camundongos imunizados por via intra-muscular com 3 doses de diferentes conjugados MenPSC-TT (lotes 29 e BR06) (Goldblatt, 1997).

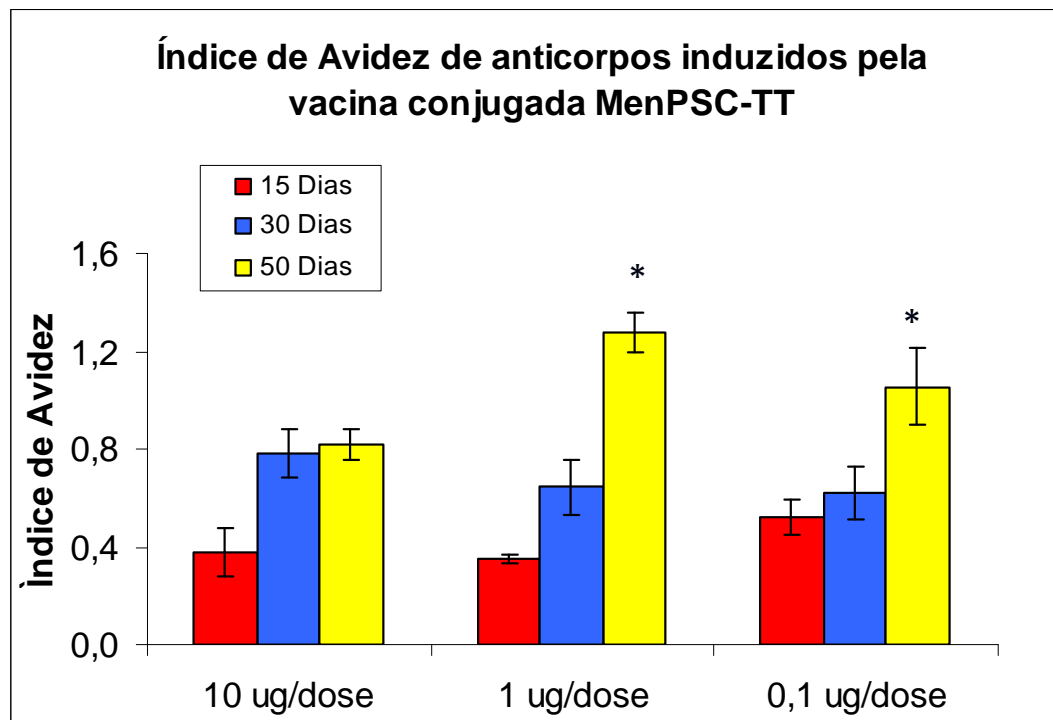


Figura 20. Avidéz de anticorpos IgG anti-MenPSC de camundongos imunizados por via intramuscular com 3 doses de diferentes concentrações da vacina conjugada MenPSC-TT. Índice de Avidéz (IA) calculado pela concentração de tiocianato de amônio necessária para reduzir a absorvância em 50%. Os valores correspondem à média de 6 análises \pm erro padrão, após a 1ª dose (T15 dias), após a 2ª dose (T30 dias) e 20 dias após a 3ª dose (T60 dias). Teste Kruskal-Wallis (* $p < 0,05$).

Para investigar a relação entre os títulos de anticorpos IgG determinados por ELISA, os títulos de atividade bactericida e IA, foram determinados coeficientes de Pearson. Alta correlação foi encontrada entre os resultados de ELISA e atividade bactericida ($r = 0,91$), enquanto a correlação entre os valores de ELISA de alta avidéz e atividade bactericida foi mais baixa ($r = 0,70$).

4.3.4. Ensaio de soroneutralização

A avaliação da resposta imune da vacina conjugada MenPSC-TT (lote 40) induzida contra o componente tetânico foi realizada utilizando-se um teste de soroneutralização *in vivo*, onde os soros dos camundongos imunizados com vacinas contendo a fração tetânica são testados, em diferentes diluições, contra uma dose desafio de toxina tetânica de referência.

Todos os animais que foram inoculados apenas com a toxina tetânica, como controle positivo, não sobreviveram e morreram dentro das 96 horas de observação. Entretanto, os camundongos inoculados com diferentes diluições de soros de animais imunizados com uma vacina DT de referência no primeiro ensaio de titulação, sobreviveram até a diluição de 1:12 e apresentaram uma DE_{50} de 1:14,28, com potência de 2UI/mL (Tabela 6). As vacinas conjugadas MenPSC-TT e PRRP-TT (contra Hib) que utilizam a mesma proteína carreadora foram capazes de induzir a proteção dos camundongos nas diluições estudadas de 1:4 e 1:5, apresentando DE_{50} superior a 1:5 e potência maior que 0,7 UI/mL. Na segunda titulação, foram estudadas diluições diferentes e pode ser observada uma pequena diferença na DE_{50} apresentada pelo soro de referência (1:12,66), apesar de mantida a mesma potência (Tabela 6). Entretanto, podem ser observadas DE_{50} superiores para as duas vacinas conjugadas, com potências maiores que 3,16 UI/mL, demonstrando a presença de anticorpos anti-TT em quantidade adequada para a promoção da soroneutralização da toxina tetânica (Tabela 6).

Grupos	Titulação I		Titulação II	
	DE_{50}	Potência (UI/mL)	DE_{50}	Potência (UI/mL)
Vacina Referência DT (2UI/mL)	1:14,28	2,0	1:12,66	2,0
	> 1:5	> 0,70	> 1:20	> 3,16
Vacina PRRp-TT (contra Hib)	> 1:5	> 0,70	> 1:20	> 3,16
Vacina MenPSC-TT	> 1:5	> 0,70	> 1:20	> 3,16

Tabela 6. Proteção de camundongos desafiados com toxina tetânica e soros de animais imunizados com diferentes vacinas conjugadas com toxóide tetânico como proteína carreadora (ensaio de soroneutralização). Camundongos suíços de ambos os sexos (19 a 25g) inoculados com 0,2 mL por via sub-cutânea de cada diluição do soro neutralizado com toxina tetânica (37°C, 60 min), de acordo com protocolo do INCQS. Toxina de Referência: dose desafio inoculada por cada animal = 1L+/10. Grupos controle: Toxina Tetânica diluída 1:20; L+/10 = 0,02 mL/animal; Anti-Toxina Tetânica de Referência (Vacina DT),

concentração 2UI/mL. Cálculo da Potência: DE_{50} da vacina teste \div DE_{50} da vacina de referência \times UI/mL da vacina de referência.

4.3.5. Ensaio desafio

Para avaliação da proteção conferida por vários lotes de conjugados foi padronizado um ensaio de desafio, utilizando-se uma cepa heteróloga de *N.meningitidis* sorogrupo C e uma fonte exógena de ferro. Três lotes de conjugados, obtidos em diferentes escalas, foram capazes de proteger mais que 88% dos animais desafiados após um ano de imunização, enquanto animais imunizados com MenPSC apresentaram uma taxa de proteção igual a 20%. Entretanto, todos os animais do grupo inoculado com PBS, morreram após o desafio com a bactéria (Tabela 7).

Grupos	Total animais desafiados (nº animais mortos)	% Proteção
Conjugado 26 ^a	9 (0)	100
Conjugado 29 ^b	9 (1)	88,9
Conjugado 40 ^c	10 (0)	100
MenPSC	10 (8)	20
PBS	8 (8)	0

Tabela 7. Proteção de camundongos desafiados com suspensão bacteriana após 1 ano de imunização por via intra-muscular com 3 doses de lotes de conjugados MenPSC-TT, obtidos em diferentes escalas e MenPSC, em intervalos de 15 dias. ^aLote de conjugado obtido em escala de 200 doses humanas; ^bLote de conjugado obtido em escala de 2.000 doses humanas e ^cLote de conjugado obtido em escala de 20.000 doses humanas. Avaliação durante 72h após inoculação de Ferro-Dextran (9mg/animal; i.p.) e desafio com *N.meningitidis* Sorogrupo C (cepa N1002/90; $4,5 \times 10^6$ UFC/ml, correspondente a 5-10 DL₅₀).

4.4. Resposta celular da vacina conjugada MenPSC-TT

4.4.1. ELISPOT

Animais imunizados com diferentes lotes de conjugados MenPSC-TT, MenPSC ou PBS (grupo controle) foram utilizados para a identificação de células B produtoras de IgG, presentes no baço e medula, em resposta a diferentes antígenos adsorvidos na placa de ELISPOT. O maior número de células produtoras de “spots” (CPS) presentes no baço, específicas para o conjugado MenPSC-TT (lote 40) e MenPSC e na medula, específicas para

o conjugado MenPSC-TT, está demonstrado na Figura 21, em comparação com poços controles (com células de animais imunizados com PBS e sem células).

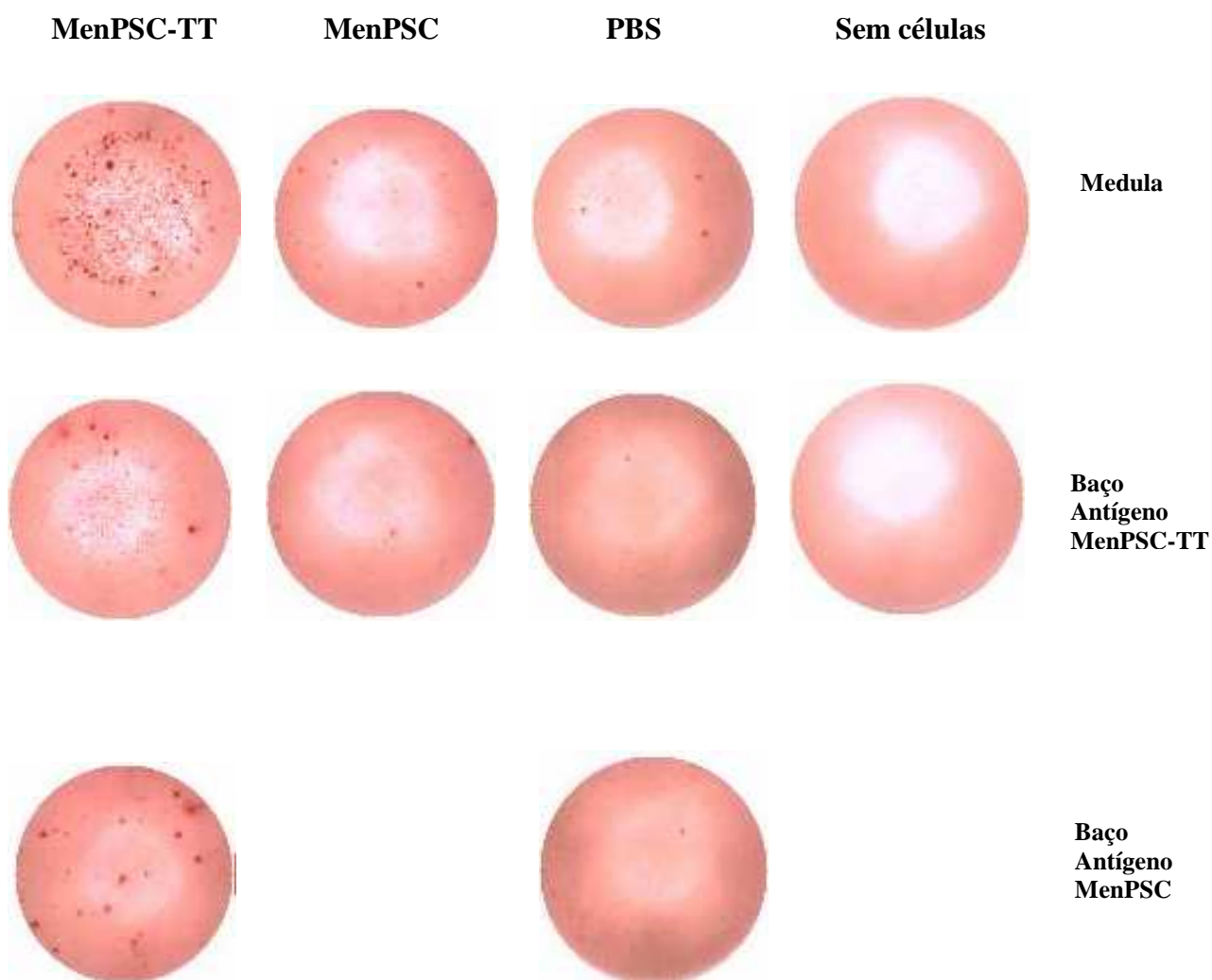


Figura 21. Identificação de células B produtoras de IgG presentes em medula e baço de animais imunizados por via intra-muscular com 3 doses de conjugado MenPSC-TT (lote 40; 1µg/dose) ou MenPSC (5µg/dose) e PBS e desafiados 14 meses após a imunização com suspensão bacteriana, utilizando-se 8×10^5 células totais/mL, em resposta à estimulação específica (MenPSC-TT e MenPSC) e inespecífica (controle sem células) (ELISPOT). Cepa heteróloga utilizada no desafio = $4,5 \times 10^6$ UFC/mL de *N.meningitidis* sorogrupo C (N1002/90). Ensaio realizado 13 dias após o desafio.

Pode-se observar a frequência similar de CPS de baço de animais imunizados com MenPSC-TT (lote 29; 12 meses de imunização) em resposta aos 2 antígenos na placa (MenPSC, MenPSC-TT), significativamente diferente da frequência de células observada com os respectivos controles (células de animais imunizados com PBS; Figura 22; $p < 0,05$). A

resposta observada quando o TT foi utilizado como antígeno foi similar aos controles dos outros antígenos (MenPSC e MenPSC-TT), mas apresentou diferença significativa com o seu respectivo controle (Figura 22; $p < 0,05$). Com a concentração de 8×10^5 células/mL foram observadas as maiores freqüências de CPS em resposta a todos os antígenos, com diferenças significativas em relação às outras concentrações e por isto ela foi escolhida como a concentração padrão, utilizada nos ensaios subseqüentes (Figura 22; $p < 0,05$).

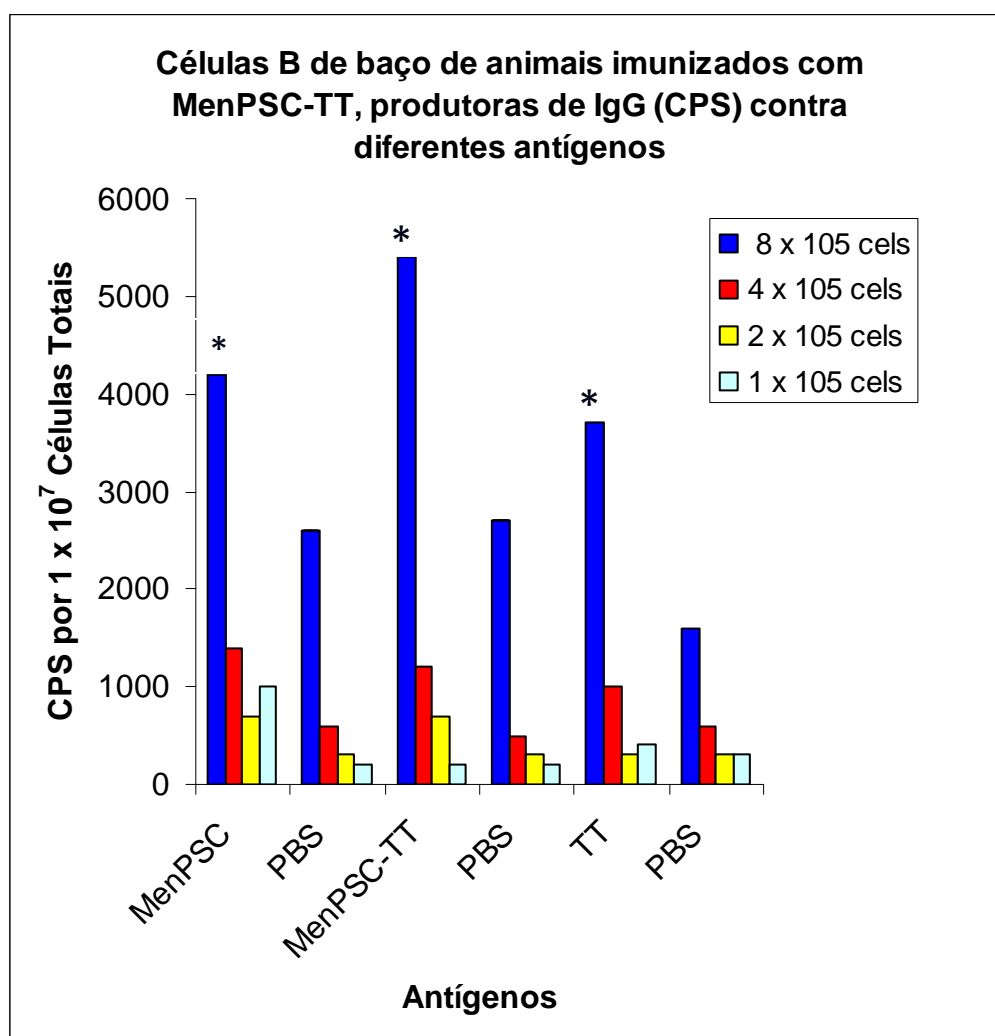


Figura 22. Freqüência de células B produtoras de IgG (“spots”; CPS), contra diferentes estímulos, presentes em baço de animais imunizados por via intra-muscular com 3 doses do conjugado MenPSC-TT (lote 29) ou PBS, em intervalos de 21 dias e desafiados 12 meses após com suspensão bacteriana, utilizando-se diferentes concentrações de células totais (ELISPOT). Freqüência de células em poços controle (sem células) = 54 CPS por 1×10^7 células totais. Cepa heteróloga utilizada no desafio = $1,1 \times 10^7$ UFC/mL de *N.meningitidis* sorogrupo C (N1002/90). Ensaio realizado 1 mês após o desafio. Os valores correspondem à média de 15 análises. ANOVA (Teste LSD; * $p < 0,05$ para comparação das freqüências de CPS de animais imunizados com a freqüência de células em poços controle).

A frequência de CPS de células do baço e medula de animais imunizados com outro lote de conjugado MenPSC-TT (lote 30; 19 meses de imunização) foi estudada e os resultados estão apresentados nas Figuras 23 e 24, respectivamente. A frequência de CPS destes animais em resposta ao antígeno MenPSC-TT adsorvido na placa foi maior do que aquela observada para o seu respectivo controle (células de animais imunizados com PBS), apenas nas células da medula ($p < 0,05$). Entretanto, as frequências de CPS observadas em resposta aos outros 2 antígenos não apresentaram diferenças significativas quando comparadas aos respectivos controles, em ambos tipos de células utilizados (Figuras 23 e 24; $p > 0,05$).

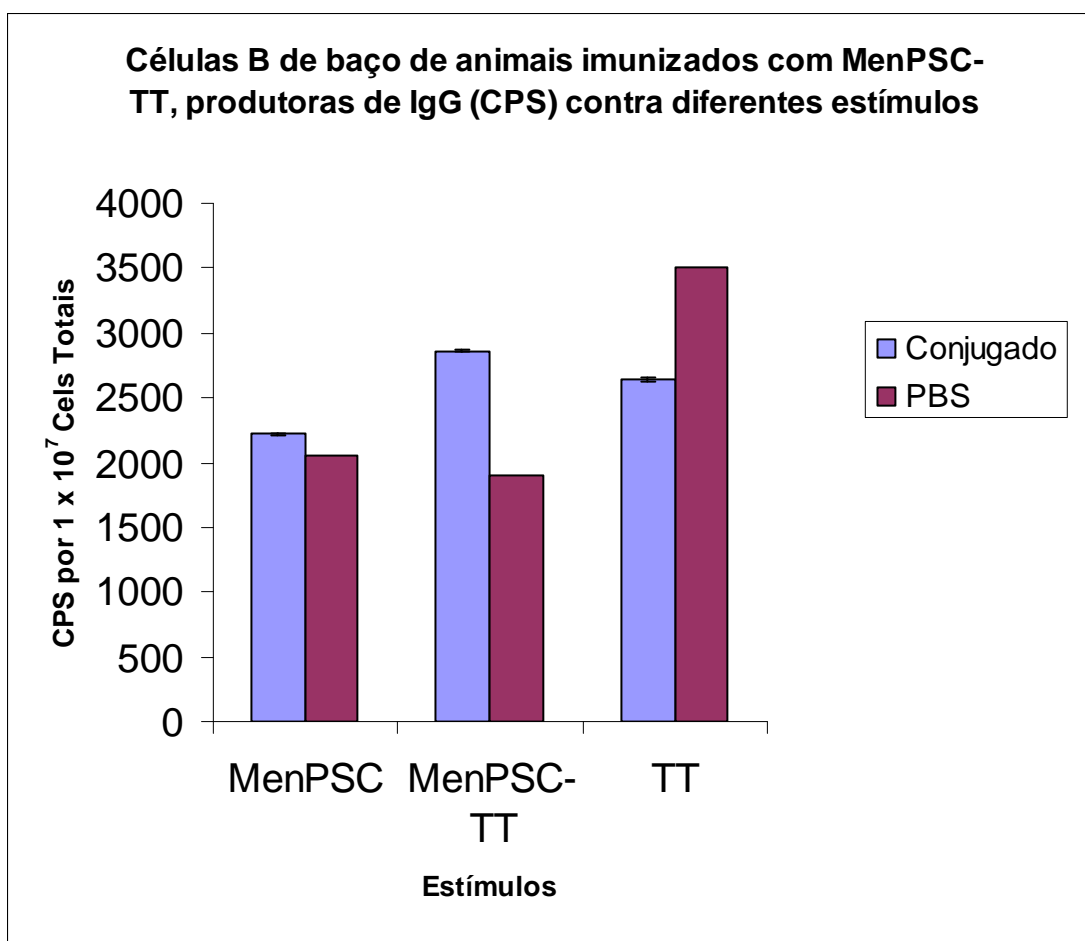


Figura 23. Frequência de células B produtoras de IgG (“spots”; CPS), contra diferentes antígenos, presentes em baço de animais imunizados por via intra-muscular com 3 doses do conjugado MenPSC-TT (lote 30) ou PBS, em intervalos de 21 dias e desafiados 19 meses após com suspensão bacteriana, utilizando-se 8×10^5 células totais/mL (ELISPOT). Cepa heteróloga utilizada no desafio = 1×10^6 UFC/mL de *N.meningitidis* sorogrupo C (N1002/90). Ensaio realizado 13 dias após o desafio. Os valores correspondem à média de 15 análises. ANOVA (Teste LSD, $p > 0,05$).

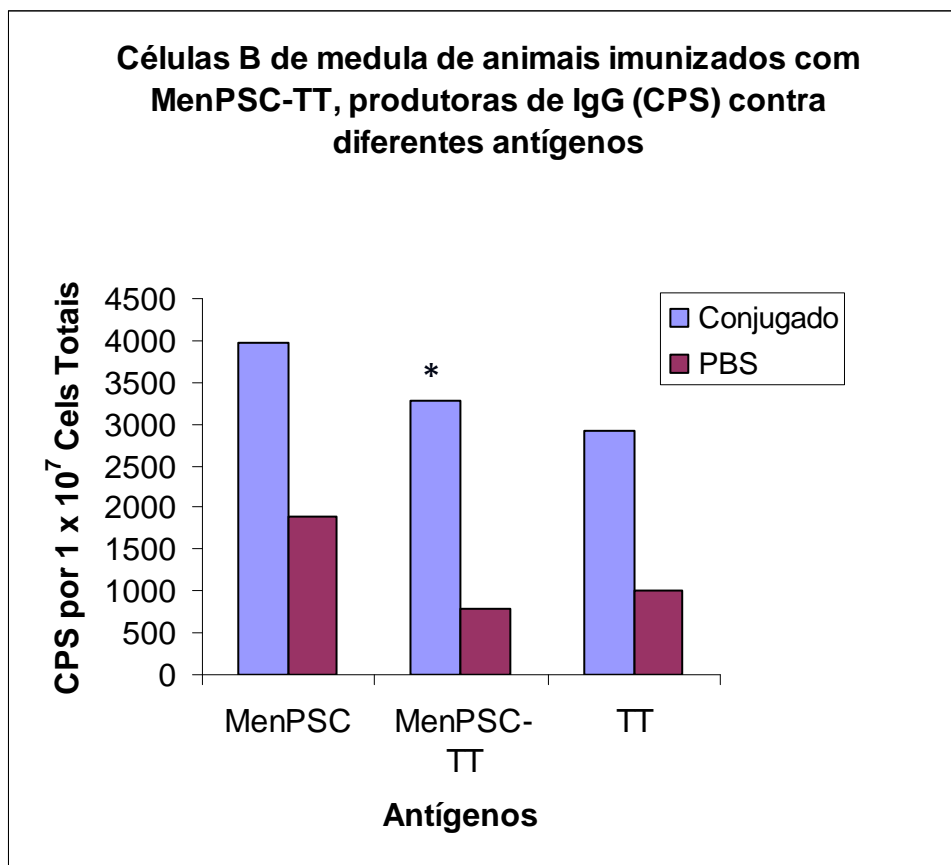


Figura 24. Frequência de células B produtoras de IgG (“spots”; CPS), contra diferentes antígenos, presentes na medula de animais imunizados por via intra-muscular com 3 doses do conjugado MenPSC-TT (lote 30) ou PBS, em intervalos de 21 dias e desafiados 19 meses após com suspensão bacteriana, utilizando-se 8×10^5 células totais/mL (ELISPOT). Cepa heteróloga utilizada no desafio = 1×10^6 UFC/mL de *N.meningitidis* sorogrupo C (N1002/90). Ensaio realizado 13 dias após o desafio. Os valores correspondem à média de 15 análises. ANOVA (Teste LSD; * $p < 0,05$ quando comparado com respectivo controle).

Em outro ensaio, grupos de animais imunizados com a vacina conjugada MenPSC-TT liofilizada (lote 40; 14 meses de imunização) e MenPSC foram avaliados por ELISPOT, 13 dias após o desafio com a suspensão bacteriana. A magnitude de resposta foi maior para o grupo imunizado com a vacina conjugada MenCPS-TT do que com MenCPS nativo para as células do baço (2.900 vs 450 por 1×10^7 células) e para células da medula (6.850 vs 567 por 1×10^7 células; $p < 0,05$; Figura 25). A comparação da resposta obtida para os dois tipos de células mostrou uma diferença significativa na frequência de CPS nas células da medula, provavelmente relacionadas aos plasmócitos de longa duração.

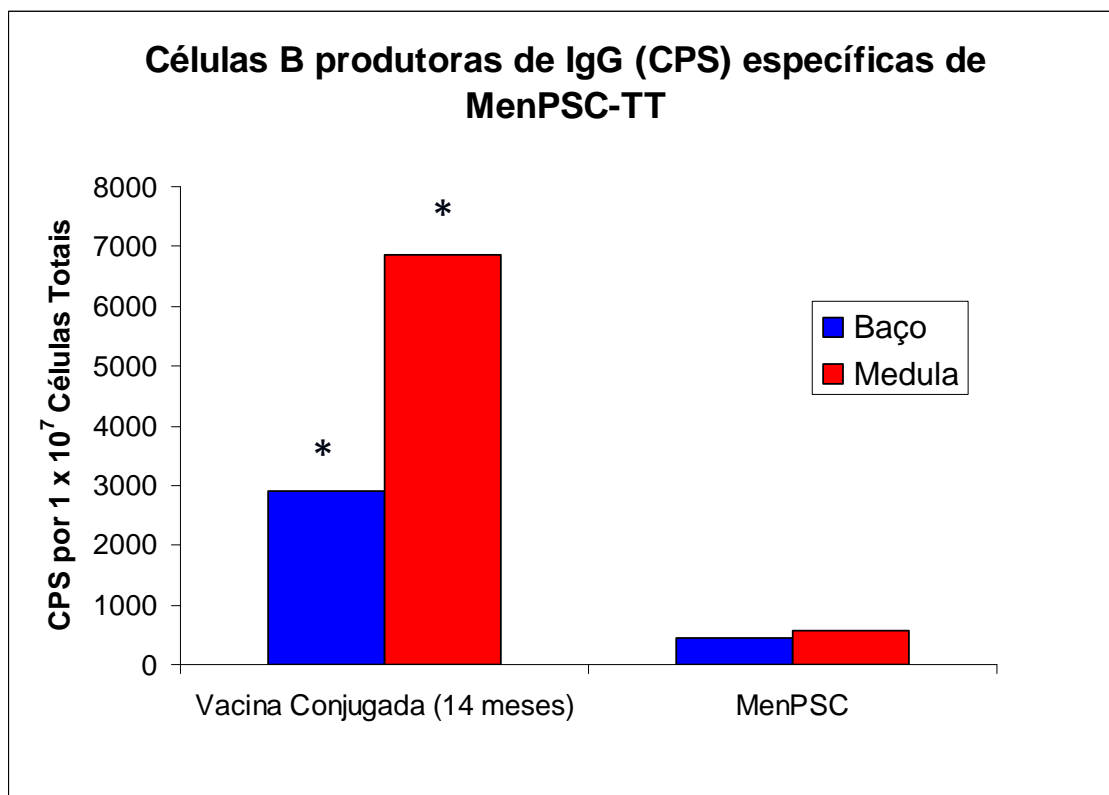


Figura 25. Frequência de células B produtoras de IgG (“spots”; CPS), contra MenPSC-TT, presentes no baço e medula de animais imunizados por via intra-muscular com 3 doses da vacina conjugada MenPSC-TT liofilizada (lote 40; 1µg/dose) ou MenPSC (5µg/dose), em intervalos de 15 dias e desafiados 14 meses após a imunização com suspensão bacteriana, utilizando-se 8×10^5 células totais/mL (ELISPOT). Frequência de células em poços controle (sem células) = 0 (Baço), 0 (Medula) CPS por 1×10^7 células totais. Cepa heteróloga utilizada no desafio = $4,5 \times 10^6$ UFC/mL de *N.meningitidis* sorogrupo C (N1002/90). Ensaio realizado 13 dias após o desafio. Os valores correspondem à média de 15 análises. ANOVA (Teste LSD; * $p < 0,05$).

4.4.2. Citometria de fluxo

O nível de citocinas intracelulares nas células do baço de animais imunizados com 2 ou 3 doses da vacina conjugada MenPSC-TT, MenPSC, TTH e PBS foi estudado, após estimulação *in vitro* com um lote de conjugado (lote 40; 4µg/poço) em diferentes períodos de incubação, pela técnica de citometria de fluxo. O número de células, em percentuais, produtoras de IFN- γ , observado para as células dos animais imunizados com 2 doses da vacina conjugada foi expressivo, quando comparado com aqueles apresentados pelas células de animais imunizados com MenPSC e TTH (5,36, 0,73 e 0, respectivamente). Entretanto, a análise estatística englobando todos os resultados dos ensaios realizados não apresentou

diferenças significativas entre os percentuais observados (resultados não apresentados; ANOVA, Teste Bonferroni; $p > 0,05$). Da mesma forma, os resultados das outras análises de citocinas (IL-10 e IL-4) não apresentaram significância estatística entre os grupos estudados (resultados não apresentados; ANOVA, Teste Bonferroni; $p > 0,05$).

Os ensaios de marcação de moléculas de superfície para a detecção de células T auxiliares (CD4 ou CD8) ativadas (CD69) nos animais imunizados com a vacina conjugada, nos dois esquemas de imunização, com e sem desafio também não apresentaram relevância estatística (resultados não apresentados; ANOVA, Teste Bonferroni; $p > 0,05$). O mesmo aconteceu com a avaliação de células T com fenótipo de memória, através da marcação com CD44 (resultados não apresentados; ANOVA, Teste Bonferroni; $p > 0,05$). Entretanto, pode-se observar nas Figuras 26 e 27, que a vacina conjugada MenPSC-TT induziu significativos percentuais de marcação de células linfóides com fenótipo $CD27^+IgD^-$, superiores àqueles apresentados pelo grupo controle, quando os animais foram desafiados com suspensão bacteriana, mas foram similares àqueles obtidos com os animais imunizados apenas com MenPSC nativo.

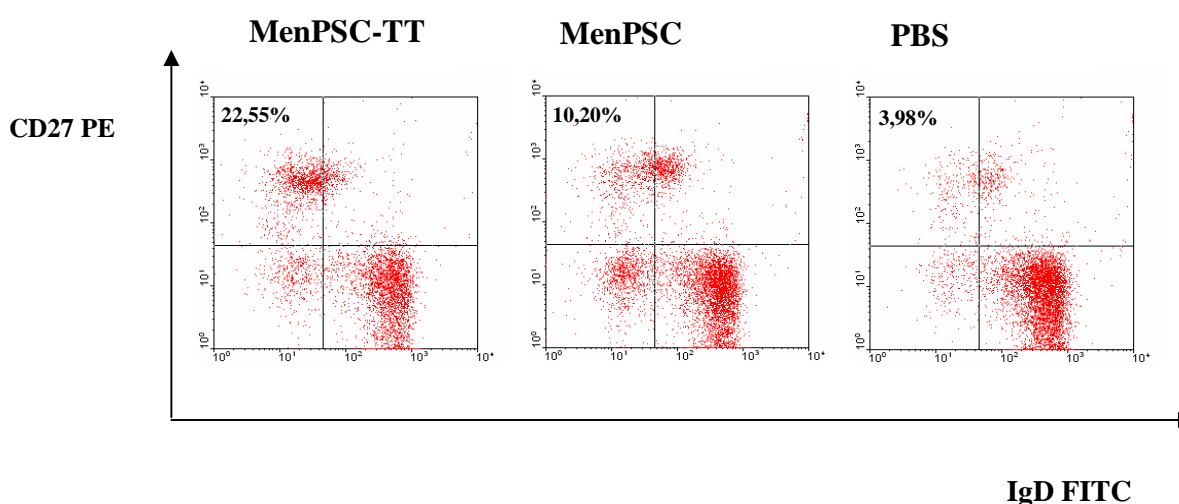


Figura 26. Percentual de sub-população de células linfóides com fenótipo de $CD27^+IgD^-$ em resposta ao conjugado MenPSC-TT, presentes no baço de animais imunizados por via intramuscular com 3 doses da vacina conjugada MenPSC-TT liofilizada (lote 40; $1\mu\text{g}/\text{dose}$), MenPSC ($5\mu\text{g}/\text{dose}$) ou PBS, em intervalos de 15 dias e desafiados 4 meses após a imunização, com cepa heteróloga de *N.meningitidis* sorogrupo C (N1002/90), em citometria de fluxo. Representação de um animal por grupo imunizado. Marcação do quadrante em relação à população de células CD27 e IgD negativas.

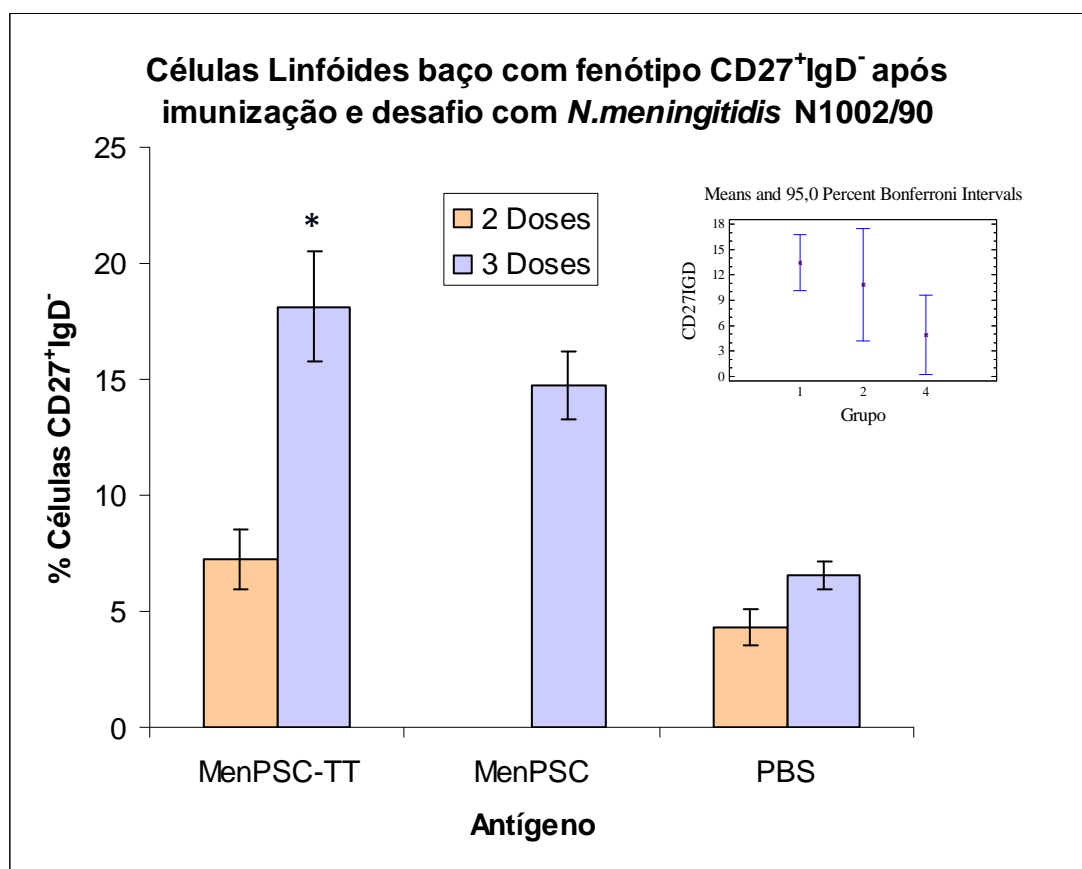


Figura 27. Percentual de sub-população de células linfóides com fenótipo de CD27⁺IgD⁻ em resposta ao conjugado MenPSC-TT, presentes no baço de animais imunizados por via intramuscular com 2 ou 3 doses da vacina conjugada MenPSC-TT liofilizada (Grupo 1, lote 40; 1µg/dose), MenPSC (Grupo 2, 5µg/dose) ou PBS (Grupo 4), em intervalos de 15 dias e desafiados 4 meses após a imunização, com cepa heteróloga de *N.meningitidis* sorogrupo C (N1002/90), em citometria de fluxo. Os valores correspondem à média de 3 animais ± erro padrão. ANOVA “Means Plot” (Teste Bonferroni; * p<0,05, para comparação entre as células dos animais do grupos 1 e 4).

Entretanto, os valores obtidos com o polissacarídeo apresentaram uma dispersão maior, de acordo com os valores de erro-padrão e pela análise estatística utilizada (ANOVA), apresentados na Figura 27, utilizando um intervalo de confiança de 95%. Os percentuais induzidos por 3 doses da vacina foram superiores àqueles verificados com 2 doses (ANOVA, Teste Bonferroni; p<0,05). Por outro lado, os percentuais obtidos com os animais apenas imunizados e não desafiados com a bactéria não apresentaram diferença estatística quando comparados entre si (Figura 28, p>0,05). Outra marcação estudada foi uma sub-população

celular com fenótipo $CD27^+IgD^+$, onde também não foram observadas diferenças significativas entre os percentuais (resultados não apresentados; ANOVA, Teste Bonferroni; $p>0,05$).

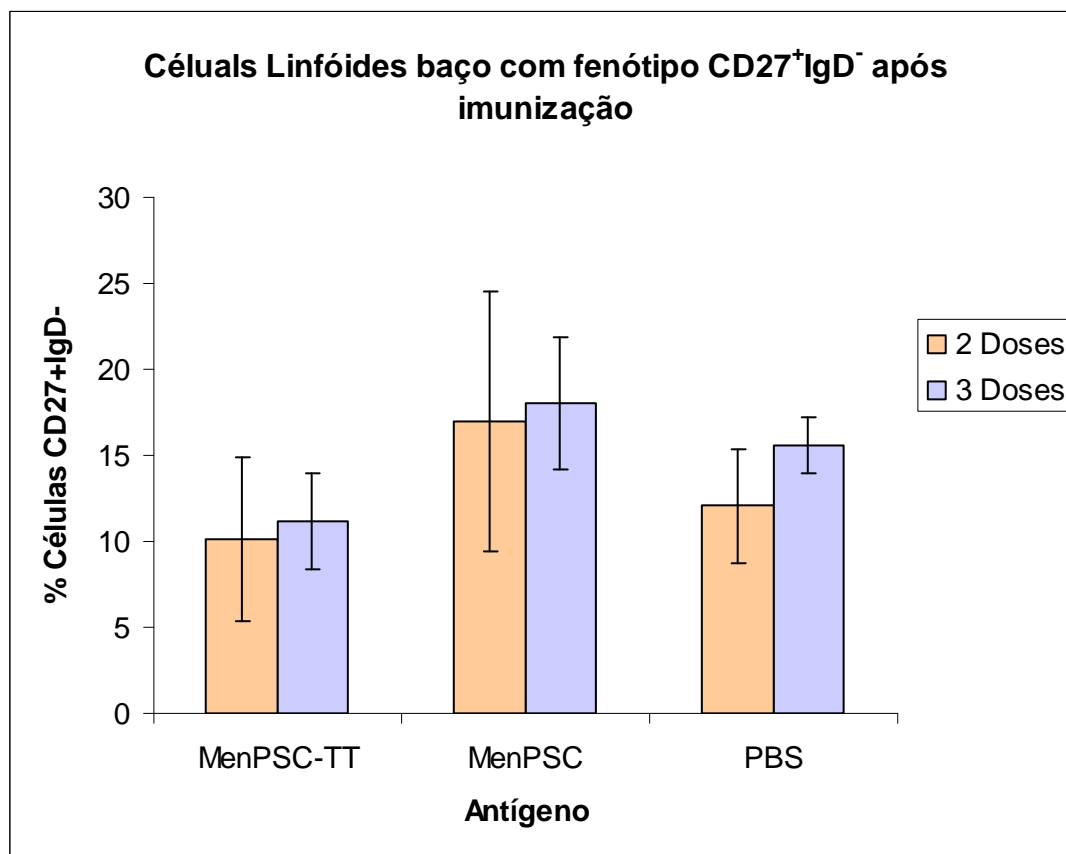


Figura 28. Percentual de sub-população de células linfóides com fenótipo de $CD27^+IgD^-$ em resposta ao conjugado MenPSC-TT, presentes no baço de animais imunizados por via intramuscular com 2 ou 3 doses da vacina conjugada MenPSC-TT liofilizada (lote 40; $1\mu g/dose$), MenPSC ($5\mu g/dose$) ou PBS, em intervalos de 15 dias, em citometria de fluxo. Os valores correspondem à média de 3 animais \pm erro padrão. ANOVA (Teste Bonferroni; $p>0,05$).

4.5. Estabilidade da vacina conjugada MenPSC-TT

A estabilidade da vacina conjugada liofilizada foi estudada após estocagem a $4^{\circ}C$ durante 11 e 22 meses. Os perfis de eluição em cromatografia de exclusão da vacina em ambos os tempos foram similares àquele analisado no tempo zero, com relação à despolimerização do polissacarídeo (Figura 29). Em adição, os títulos de IgG presentes no soro de animais imunizados com a vacina estocada a $4^{\circ}C$ durante 6, 15 e 26 meses não foram

significativamente diferentes (Figura 30; Teste W de Mann-Whitney; $p = 0,69$). Estes resultados sugerem que a vacina liofilizada é estável por mais que 2 anos, quando estocada a 4°C.

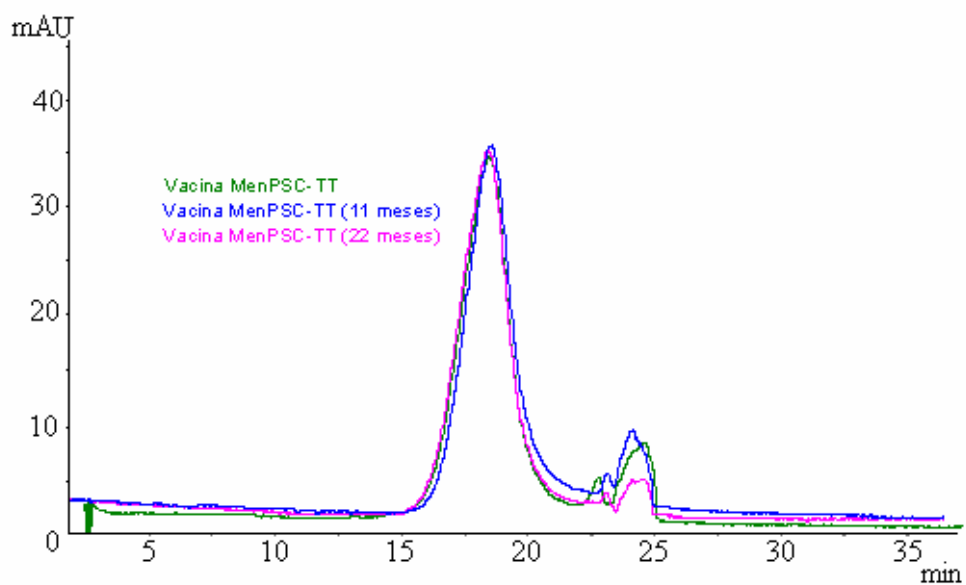


Figura 29. Estabilidade da Vacina Conjugada MenPSC-TT liofilizada (lote 40) estocada durante 0, 11 e 22 meses a 4°C após envase e liofilização, avaliada através do perfil de eluição em cromatografia de exclusão (TSK 4.000 P_{WXL}; 206 nm)

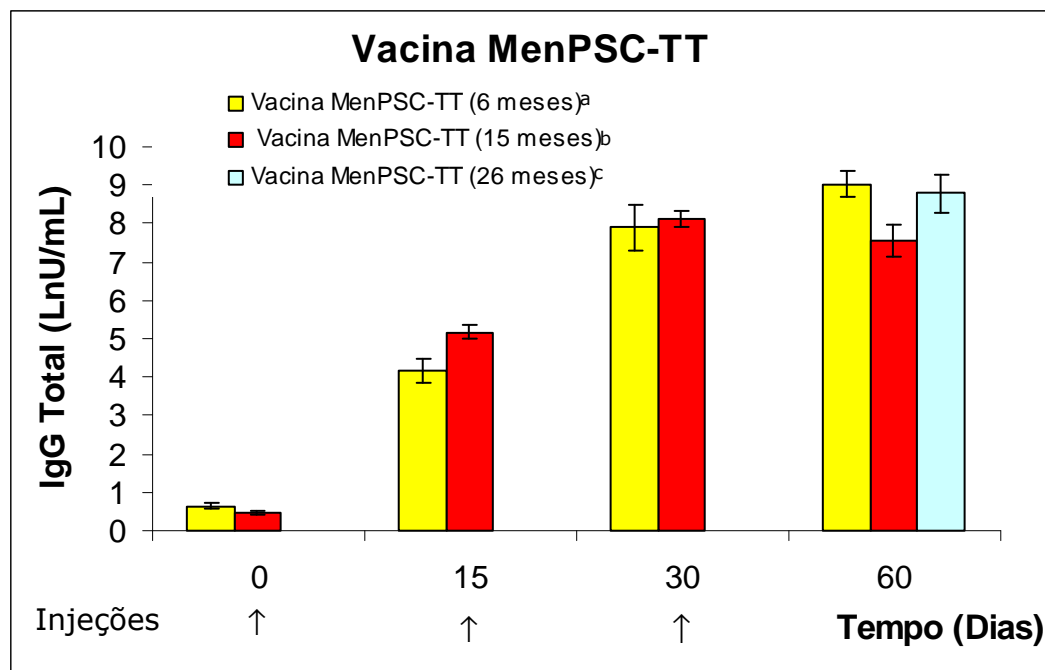


Figura 30. Estabilidade da vacina conjugada MenPSC-TT liofilizada (lote 40) estocada durante 6, 15 e 26 meses a 4°C após envase e liofilização, avaliada pela determinação de IgG total (ELISA) no soro de animais imunizados por via intra-muscular com 3 doses, em intervalos de 15 dias. ^{a,b}Títulos de IgG medidos antes de cada dose e um mês após a 3ª dose. ^cTítulos de IgG medidos apenas um mês após a 3ª dose. Os títulos estão expressos em Ln de unidades de Elisa por mL (LnU/mL) e correspondem à média de 3 análises ± erro padrão. Teste W de Mann-Whitney; $p > 0,05$.

5. DISCUSSÃO

A conjugação química de polissacarídeos bacterianos com proteínas carreadoras é um procedimento efetivo para melhorar a resposta imunológica contra os polissacarídeos capsulares e conseqüentemente, para a prevenção das doenças causadas por bactérias encapsuladas como *N.meningitidis*, *H.influenzae* e *S.pneumoniae*. Neste estudo foi descrito o desenvolvimento, caracterização físico-química e a imunogenicidade de uma vacina brasileira conjugada contra *N.meningitidis* grupo C, utilizando toxóide tetânico ativado com hidrazina, como proteína carreadora.

A técnica de aminação redutiva tem sido utilizada para a obtenção de conjugados eficazes, cuja estrutura é conhecida como neoglicoproteína. Nesta estrutura existe apenas um sítio reativo no polímero de carboidrato e nenhuma ligação cruzada da proteína (LEES, SEN & LOPEZACOSTA 2006). Jennings & Lugowski (1981) utilizaram pela primeira vez esta metodologia para a produção de conjugados com os polissacarídeos meningocócicos dos grupos A, B e C. Muitas vacinas conjugadas eficazes produzidas por esta técnica são atualmente licenciadas (LEES, SEN & LOPEZACOSTA 2006). Entretanto, a técnica de aminação redutiva tem uma séria desvantagem relacionada ao tempo da reação de acoplamento. A reação tem se mostrado ineficiente, demorando de 2 a 3 dias para a completa conjugação (JENNINGS & LUGOWSKI, 1981; COSTANTINO et al., 1992; PAWLOWSKI, KÄLLENIOUS & SVENSON, 2000; LEES, SEN & LOPEZACOSTA, 2006). No presente trabalho foram obtidos lotes de conjugados MenPSC-TT após 18h de reação entre os grupos aldeído do MenPSC ativado e os grupos hidrazida do TT ativado (LEE CHE-H & FRASCH, 2003). A rapidez da reação foi obtida pela introdução dos grupos hidrazida, que são altamente reativos, aos grupos carboxil presentes na proteína carreadora. Estes grupos reagem mais favoravelmente com os grupos aldeídos presentes no polissacarídeo ativado do que os grupos amino que estariam disponíveis para a reação, antes do processo de ativação da proteína.

Além da menor reatividade dos grupos amino presentes no TT, existe o comprometimento dos mesmos com o procedimento de destoxificação da toxina tetânica ao toxóide tetânico, após o tratamento com formaldeído.

As vacinas conjugadas em geral consistem de uma mistura complexa de moléculas heterogêneas, que não são facilmente caracterizadas, como as vacinas contra *H.influenzae* tipo b (Hib). Além disto, tem sido observado que vacinas conjugadas com CRM₁₉₇ formam grandes agregados quando submetidas a temperaturas de 20 a 55°C, durante 5 semanas (CRANE, BOLGIANO & JONES, 1997). Por outro lado, as vacinas obtidas por aminação redutiva são mais facilmente caracterizáveis, porque as moléculas têm uma estrutura definida, o que possibilita o monitoramento das etapas de ativação e conjugação do MenPSC por espectroscopia de RMN. A técnica de RMN tem sido descrita como altamente sensível e reprodutível para o controle da identidade, integridade e pureza de polissacarídeos bacterianos utilizados na produção de vacinas (JONES & LEMERCINIER, 2002). Neste estudo, os espectros de RMN obtidos também foram extremamente importantes no controle da identidade das moléculas estudadas e no monitoramento e caracterização das etapas de oxidação do polissacarídeo (introdução de grupamentos aldeído ausentes no polissacarídeo nativo) e conjugação química (introdução de regiões de grupos aromáticos e alifáticos, presentes na proteína carreadora). Estas análises também demonstraram a integridade das moléculas obtidas após as reações de ativação e conjugação do polissacarídeo, conforme a manutenção de assinalamentos característicos da molécula nativa. Vários estudos têm utilizado a técnica de RMN para o controle de qualidade de vacinas conjugadas (JONES & LEMERCINIER, 1996; CUELLO et al., 2007).

Em relação ao controle físico-químico da etapa de ativação do polissacarídeo, foi realizada anteriormente a padronização de um método para a quantificação do teor de grupo aldeído do MenPSC ativado (BASTOS, 2005). Três lotes de MenPSC ativado, sob as mesmas

condições utilizadas no presente estudo, foram avaliados pelo ensaio de formaldeído, utilizando o reagente de Purpald (QUENSENBERRY & LEE, 1996). As amostras apresentaram quantidades similares de grupo aldeído, superiores a 220nM, as quais foram 10 vezes maiores que a quantidade presente em dois lotes de MenPSC nativo (menos que 20nM), demonstrando o sucesso da introdução dos grupos funcionais para a reação com grupos amino presentes no TTH (BASTOS, 2005).

Uma vacina conjugada contra *N.meningitidis* grupo A foi desenvolvida utilizando a mesma metodologia de conjugação proposta neste estudo, por pesquisadores do FDA, como resultado de trabalho colaborativo entre OMS e OPAS, para a promoção de campanhas de vacinação no cinturão da meningite, em países da África (LEE CHE-H & FRASCH, 2003; GIRARD et al., 2006). Esta vacina foi estudada em voluntários adultos saudáveis na Índia, em estudo de Fase I duplo cego e randomizado, para avaliação da reatogenicidade. A vacina foi considerada segura e imunogênica e se encontra em estudos clínicos de Fase II (BORROW et al., 2006).

Para a produção de vacinas conjugadas é desejável a utilização de métodos que propiciem uma taxa máxima de conjugação em curto período, com a obtenção reduzida de sub-produtos indesejáveis e com altos rendimentos de polissacarídeo conjugado. Além disto, devem ser empregados métodos que possam ser aplicados em escalas maiores de produção para a obtenção de lotes de vacina com maior número de doses. Neste sentido foi desenvolvido um procedimento para a produção de lotes com escalas de 200 a 20.000 doses de vacina, o qual se mostrou reprodutível e consistente. Além disto, foi realizada a otimização das etapas de purificação dos componentes e dos conjugados, utilizando-se um sistema de ultrafiltração tangencial adequado à obtenção de volumes menores de vacina, com membranas de diferentes cortes compatíveis com o tamanho da molécula estudada (SILVEIRA et al., 2005). Este sistema mostrou-se altamente eficiente na remoção de sub-produtos das reações

de ativação do MenPSC e TT. Da mesma forma, promoveu a remoção de resíduos de reagentes da reação de conjugação e do polissacarídeo não conjugado, possibilitando a obtenção de produtos purificados, com menor grau de diluição. Outra vantagem adicional do sistema de filtração tangencial é a facilidade de ser aplicado na produção de grandes lotes de vacina em condições industriais, devido à possibilidade de utilização de sistemas com a mesma geometria e funcionamento (PALL LIFE SCIENCES, SCIENTIFIC & TECHNICAL REPORT). Existem outras metodologias de purificação propostas pela OMS, como cromatografia de exclusão molecular, etc., que são trabalhosas, demoradas e não são práticas para aplicação industrial (WHO, 2004).

A cromatografia de exclusão molecular tem sido um método bastante eficiente no monitoramento da consistência lote a lote da produção de vacinas conjugadas, além de avaliar a estabilidade destas vacinas (PLUMB & YOST, 1996; VON HUNOLSTEIN, PARISI & RECCHIA, 1999). No presente estudo, as reações de ativação dos componentes MenPSC e TTH e obtenção dos lotes de conjugado MenPSC-TT foram monitoradas por cromatografia de exclusão molecular, utilizando-se uma coluna adequada para a análise de açúcares e comprimentos de onda (206 e 280 nm) capazes de detectar a presença da parte sacarídica e protéica nas moléculas dos conjugados. Com este sistema cromatográfico foi possível assegurar a eficiência dos processos de ativação, conjugação e purificação das moléculas.

O controle de qualidade em processo, do produto a granel e produto final de vacinas conjugadas é grandemente dependente de análises físico-químicas das moléculas obtidas, para avaliação do peso molecular, porcentagem do componente sacarídico livre, teor de açúcar e proteína para o estabelecimento da razão entre os dois componentes, estabilidade do conjugado através do grau de despolimerização durante armazenamento e estrutura do conjugado por RMN (JONES et al., 1996; LEMERCINIER et al., 1997). Neste estudo foram padronizados vários ensaios para avaliação da pureza das moléculas obtidas após reações

químicas e etapas de purificação, conforme recomendações da OMS para a produção de vacinas conjugadas contra *N.meningitidis* grupo C (WHO, 2004). Desta forma, foram realizados ensaios para avaliação de resíduos de contaminantes na molécula de TTH, após a reação de ativação. Não foi detectada a presença de carbodiimida por cromatografia de exclusão molecular, em procedimento utilizado rotineiramente no controle de outras vacinas conjugadas. Em adição, foram detectadas pequenas quantidades de hidrazina, através do método desenvolvido e validado utilizando polarografia. Na literatura têm sido descritos valores considerados não tóxicos para resíduos de hidrazina presentes no organismo após inalação durante 2 ou 8h (0,03 a 0,6 e 0,5 a 1 ppm, respectivamente). Entretanto, não está especificado um limite máximo para a presença de hidrazina como contaminante em produtos injetáveis, o que dificulta a interpretação do resultado. Desta forma, limites máximos aceitáveis em vacinas conjugadas deverão ser estabelecidos pelos órgãos regulatórios como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e FDA, em um futuro próximo.

As análises realizadas para a avaliação de contaminantes no produto a granel da vacina conjugada MenPSC-TT (lote 03/05) mostraram a ausência de resíduos de dihidrazida do ácido adípico, utilizando cromatografia de exclusão molecular, através de um procedimento utilizado rotineiramente no controle de outras vacinas conjugadas. Para a detecção de cianeto foi padronizado um método fotométrico, descrito anteriormente (UPADAHYAY & GUPTA, 1984). O método proposto mostrou-se com sensibilidade adequada (0,002 – 0,5 ppm) para a detecção das concentrações de cianeto nas amostras, sem a presença de interferentes provenientes da reação de conjugação. O produto a granel do conjugado MenPSC-TT não apresentou resíduo de cianeto, enquanto as concentrações obtidas para amostras do produto a granel da vacina conjugada contra Hib foram similares aos valores descritos em laudos externos de análise. Estes resultados sugerem a possibilidade de utilização do método para outras vacinas conjugadas que utilizem reagentes constituídos de íons cianeto no processo de

produção. Para avaliação completa da possibilidade do emprego do método no controle de processo de vacinas conjugadas, devem ser realizados ensaios de validação utilizando-se reagente padrão de cianeto.

Em relação aos outros testes preconizados pela OMS, para avaliação da inocuidade apresentada pelo produto a granel, o lote estudado foi aprovado em todos os ensaios realizados, demonstrando a possibilidade da utilização do mesmo na etapa de formulação e obtenção do produto final (WHO, 2004). Finalmente, o produto final da vacina conjugada MenPSC-TT foi aprovado nos testes físico-químicos de controle de qualidade para o doseamento do teor de polissacarídeo conjugado, sacarose e umidade, demonstrando o sucesso e adequação das etapas de envase e liofilização. Da mesma forma, a vacina conjugada MenPSC-TT liofilizada (lote 40) apresentou resultados satisfatórios nos ensaios biológicos do produto final, incluindo um baixo teor de endotoxina detectada pelo teste *in vitro* (LAL), sugerindo que a mesma possui composição segura em animais (WHO, 2004).

A taxa de polissacarídeo livre presente no conjugado foi de 15,6%. Os requerimentos da OMS não estabelecem um valor máximo permitido de polissacarídeo livre na vacina conjugada contra meningococo grupo C. Apesar deste fato, a taxa encontrada está de acordo com limites preconizados para algumas vacinas conjugadas contra Hib, onde um máximo de 20% do polissacarídeo PRRP livre é aceito (CUERVO et al., 2007). Beuvery et al. (1983a) obtiveram um conjugado PSC-TT pelo método da carbodiimida, com 10% de açúcar livre. Entretanto, os pesquisadores estudaram a adição de quantidades de polissacarídeo grupo C livre, na resposta IgG ao conjugado PSC-TT e não encontraram qualquer supressão da resposta ao componente polissacarídeo do conjugado. Em outros estudos, Cuello et al. (2006) encontraram um conteúdo médio de 21% de açúcar livre, para conjugados de PSC. De qualquer forma, a avaliação do teor de açúcar livre é de extrema importância no desenvolvimento destas vacinas, já que tem sido demonstrada tolerância imunológica após

repetidas injeções da vacina polissacarídica meningocócica contra o grupo C, em adultos e crianças, o que inviabiliza a utilização desta vacina e de vacinas conjugadas com altos percentuais de açúcar livre (RICHMOND et al., 2000; JOKHDAR et al., 2003).

Os lotes de conjugados produzidos mostraram baixos níveis de açúcar, conforme as taxas de razão açúcar:proteína apresentadas (0,2 a 0,5). Estas taxas são similares às taxas descritas em outros estudos, que também utilizaram aminação redutiva como técnica de conjugação (ANDERSON et al., 1986; WANG et al., 2003; CARMENATE et al., 2005). Futuramente, com a consolidação do processo de produção de lotes maiores, serão estabelecidos os limites aceitáveis desta razão e os mesmos serão utilizados para avaliar a consistência de produção em escala industrial (JÓDAR, GRIFFITHS & FEAVERS, 2004).

O peso molecular do polissacarídeo nativo avaliado por espectroscopia de espalhamento de luz (MALLS) foi correspondente a 928 KDa. Em estudos prévios, foi encontrado um valor similar de 908 KDa, utilizando-se cromatografia de exclusão molecular e dextranas com peso molecular conhecido (BASTOS, 2005). Estes valores estão compatíveis com resultados descritos na literatura que relacionam uma faixa de peso molecular entre 700 a 2.000 KDa para o polissacarídeo do grupo C (JUMEL, HO & BOLGIANO, 2002). O peso molecular de diferentes lotes de MenPSC ativado também foi determinado anteriormente, pelo mesmo sistema de cromatografia de exclusão, onde observou-se um intervalo de 7,4 a 8,3 KDa, após a reação de oxidação com periodato de sódio, sob as mesmas condições descritas no presente estudo (BASTOS, 2005). Estes polissacarídeos apresentaram uma acentuada diferença quanto ao volume de eluição, em relação às amostras nativas, mostrando um padrão de eluição característico para a molécula oxidada, decorrente do processo de clivagem oxidativa seletiva com periodato de sódio (BASTOS, 2005). Por outro lado, neste mesmo estudo não foi possível a avaliação adequada do peso molecular do TT e conseqüentemente do conjugado MenPSC-TT, porque houve uma super-estimação dos

valores observados (BASTOS, 2005). Outros estudos têm demonstrado a limitação da cromatografia de exclusão molecular na determinação do peso molecular de glicoconjugados, com a obtenção de valores superiores. Os pesquisadores sugeriram a utilização da mesma técnica cromatográfica, associada à detecção por espectroscopia de espalhamento de luz (SEC-MALLS) (WEN, ARAKAWA & PHILO, 1996; JUMEL, HO & BOLGIANO, 2002).

Para assegurar a eficácia de vacinas, os produtores devem promover o asseguramento da qualidade, consistência lote a lote e a estabilidade de cada vacina produzida. Alguns métodos físico-químicos têm sido descritos como úteis na determinação da integridade e estabilidade estrutural de vacinas conjugadas e podem inclusive ser correlacionado com ensaios biológicos (BOLGHIANO et al., 2001; CUERVO et al. 2007). Como exemplo cita-se a cromatografia de exclusão molecular, onde pode ser observada uma diminuição da área correspondente à eluição do conjugado. A estabilidade da vacina conjugada MenPSC-TT liofilizada estocada a 4°C durante diferentes períodos foi avaliada através do perfil cromatográfico em cromatografia de exclusão e pela determinação de títulos de IgG, após a imunização de camundongos. A vacina conjugada permaneceu estável por mais de 2 anos após os processos de envase e liofilização, sem nenhuma alteração de área no perfil cromatográfico, correspondente à eluição da molécula conjugada. Além disto, os títulos de IgG induzidos pela vacina no momento da produção e envase se mantiveram similares àqueles observados após diferentes períodos de armazenamento. Estudos prévios têm demonstrado que o TT como proteína carreadora é mais estável que CRM₁₉₇ e que conjugados que utilizam a proteína tetânica, podem permanecer imunogênicos mesmo em altas temperaturas (BOLGHIANO et al., 2001; HO, BOLGHIANO & CORBEL, 2001). Cuervo et al. (2007), estudaram a relação existente entre testes físico-químicos e biológicos no asseguramento da estabilidade de uma vacina conjugada de oligossacarídeos sintéticos de Hib com TT, através de cromatografia de exclusão, avaliação de teor de açúcar livre, títulos de IgG contra o

polissacarídeo e atividade bactericida dos anticorpos. Os autores concluíram que existe uma boa correlação entre a porcentagem da área do pico cromatográfico da vacina e o teor de açúcar livre, entre os títulos de IgG e a atividade bactericida e entre os títulos de IgG e o teor de açúcar livre. Em função dos resultados eles propuseram a utilização do teor de açúcar livre como o melhor indicador de alterações na atividade imunológica da vacina. O estabelecimento da estabilidade da vacina conjugada MenPSC-TT em tempo real continua em andamento, da mesma forma que futuramente serão realizados ensaios de degradação acelerada, utilizando-se diferentes temperaturas de armazenamento.

Na resposta imune induzida pelos polissacarídeos capsulares (antígenos TI-2), é observada uma resposta intensa e temporária de produção de anticorpo do isotipo IgM, com baixa afinidade e sem indução de memória imunológica. Este tipo de resposta é encontrado apenas em crianças com idade superior a 18 meses, devido à presença de uma sub-população de células B específicas capazes de reconhecer e responder ao antígeno (MOND, J.J., LEES, A. & SNAPPER, 1995; RUBINSTEIN et al., 1998). Em camundongos, esta sub-população é definida pela expressão de Lyb5 e outros marcadores (STEIN et al., 1983). Entretanto, crianças menores e susceptíveis à doença causada por bactérias encapsuladas, não são capazes de responder às vacinas polissacarídicas e conseqüentemente não podem ser imunizadas, permanecendo expostas aos microrganismos. Para alterar este padrão de resposta fraca e limitada muitos pesquisadores têm utilizado processos de conjugação química dos polissacarídeos a proteínas carreadoras, convertendo a natureza da resposta imune a uma forma dependente de células T auxiliares, com a produção de IgG na fase secundária (PEETERS et al., 1992; RUBINSTEIN et al., 1998). Os conjugados devem assim, induzir a produção de anticorpos contra o polissacarídeo capsular e à proteína carreadora, em crianças com apenas 2 meses de idade, em decorrência de interações entre células B específicas do polissacarídeo e células T que reconhecem epítomos na proteína carreadora

(LANZAVECCHIA, 1985; 1986). O complexo PS-proteína é internalizado pela célula B via seu receptor Ig de superfície (BCR), específico do PS. Isto leva ao processamento da proteína na célula B e à apresentação dos peptídeos às células T auxiliares, juntos com complexos de MHC na superfície das células B (LANZAVECCHIA, 1985; 1986). Desta forma, as células B têm a função de células apresentadoras de antígenos (APC). Estes mecanismos constituem a primeira fase da imunidade de células B reguladas pela ajuda cognata de células T auxiliares. Imunizações repetidas aumentam o número de células T auxiliares específicas da proteína carreadora que fornecem ajuda para as células B específicas do PS, resultando na diferenciação de células B em plasmócitos de curta duração. O desenvolvimento dos plasmócitos corresponde à segunda fase da resposta humoral observada para antígenos T-dependentes (LANZAVECCHIA, 1985; 1986; McHEYZER-WILLIAMS & McHEYZER-WILLIAMS, 2005).

A avaliação da resposta imune induzida pelas vacinas conjugadas contra *N.meningitidis* grupo C, deve considerar um aumento maior ou igual a 4 vezes dos títulos de anticorpos nos soros pós-imune em relação ao pré-imune, além de aumentada avidéz dos anticorpos específicos ao grupo C (BORROW et al., 2001; BORROW, BALMER & MILLER, 2005; GIRARD et al., 2006). Desde os estudos de Gotschlich, Liu & Artenstein. em 1969, tem sido amplamente aceito que existe uma correlação entre os níveis de anticorpos com atividade bactericida presentes no soro e proteção imunológica contra a doença meningocócica causada pelo grupo C. Baseado em estimativas de eficácia e na proporção de indivíduos que respondem às vacinas conjugadas em vários estudos clínicos, tem sido demonstrado que o título de atividade bactericida de 1:8 é o título mínimo necessário para imunidade protetora de curto prazo para o grupo C, quando se utiliza soro de coelho como fonte de complemento no ensaio (BORROW et al., 2001; BORROW, BALMER & MILLER, 2005).

Neste estudo, os lotes iniciais de conjugados, obtidos em escalas menores (200 a 2.000 doses), foram avaliados em camundongos utilizando-se um protocolo de imunização via intramuscular, com 3 doses e intervalos de 21 dias entre as doses. Posteriormente, os lotes obtidos na escala maior (20.000 doses), foram estudados em um protocolo de imunização otimizado, empregando-se apenas 15 dias de intervalo entre as doses. Todos os lotes de conjugados, obtidos em escalas menores (lotes 26, 29 e 30), foram imunogênicos em camundongos, apresentando altos títulos de IgG com elevada atividade bactericida, quase 200 vezes superiores à diluição de 1:8, utilizando-se soro de cobaia. Este título é correlacionável com proteção à doença meningocócica causada pelo grupo C (BORROW et al., 2001; BORROW, BALMER & MILLER, 2005). Além disto, nos estudos dose-resposta no mesmo modelo animal, todas as concentrações da vacina conjugada MenPSC-TT liofilizada (lote 40), obtida em escala de 20.000 doses, foram capazes de gerar um aumento de 10 a 20 vezes nos títulos de IgG, de forma dose-dependente, quando comparada com a resposta induzida pelo polissacarídeo nativo, com um significativo aumento após a 2ª dose de reforço. Esta resposta de anticorpo claramente tem características de uma resposta dependente da participação de células T após o acoplamento do polissacarídeo nativo à proteína carreadora, já que foi observada memória imunológica. Similarmente uma vacina conjugada, utilizando oligossacarídeo sintético de estreptococo grupo B (GBS) tipo III, induziu uma elevada resposta humoral com maiores títulos de IgG em camundongos, quando comparada à resposta observada com o oligossacarídeo não conjugado (WANG et al., 2003). A resposta imune da vacina conjugada MenPSC-TT também mostrou uma atividade funcional apropriada com títulos de atividade bactericida superiores a 1:8, para todos os grupos de animais vacinados (0,1, 1 e 10 µg/dose), enquanto MenPSC nativo não induziu títulos significativos.

A magnitude e o espectro de isotipo de anticorpos expressados e secretados por células B específicas do antígeno fornecem a medida mais sensível e quantitativa da ajuda

cognata de células T *in vivo*. Através dos sinais de contato entre as células via CD40 e CD40L e B7 e CD28, presentes na célula B e T, respectivamente, ocorre a mudança de classe de isotipos de imunoglobulinas para subclasses fixadoras de complemento como IgG2a, IgG2b ou IgG3 e IgG1, dependendo do tipo de citocina produzida pelas células T auxiliares, caracterizando a via de ativação de células Th1 (IgG2a, IgG3) ou Th2 (IgG1), em modelo murino (CHU et al., 1983; GERMAN et al., 1995; BUCHANAN, ARULANANDAM & METZGER, 1998; SABIROV & METZGER, 2006). Nestes modelos, a resposta à vacina polissacarídica é restrita aos isotipos IgM e IgG3 e mostra um perfil imune similar àquele observado no homem (RUBINSTEIN & STEIN, 1988a; 1988b), enquanto a vacina conjugada induz maior concentração de IgG1 (RUBINSTEIN et al., 1998; BUCHANAN et al., 2001).

A vacina conjugada MenPSC-TT obtida com a metodologia proposta neste estudo (1µg/dose), induziu altos títulos dos isotipos IgG1 e IgG2b, com valores significativamente mais elevados de IgG2b após a 1ª dose e sem detecção de IgG2a. Este aumento de títulos de IgG1 e IgG2b correlaciona-se com a significativa atividade bactericida do soro de animais imunizados com a vacina conjugada. Apesar de IgG2a ser o isotipo mais efetivo em ativar complemento e promover a ligação ao receptor FcγRI em células fagocíticas, no modelo murino, o isotipo IgG2b também é um bom indutor de lise bacteriana (RUBINSTEIN et al., 1998). Além disto, o mecanismo adicional envolvido poderia ser a opsonofagocitose, via receptores específicos para IgG2b e IgG1, em modelo murino (UNKELESS, SCIGLIANO & FREEDMAN, 1988). Consistentes com esta hipótese são alguns estudos que sugeriram a associação de títulos de IgG1 com a atividade protetora contra meningococo grupo B e atividade opsonizante no modelo de proteção contra pneumococos (ALONSO DEVELASCO et al., 1995; PON et al., 1997). Por outro lado, não foi descrita a participação expressiva de mecanismos opsonofagocíticos na proteção conferida contra *N.meningitidis* grupos A e C (DEVOE & GILCHRIST, 1973; GRIFFISS et al., 1991; BOSLEGO et al., 1995; POOLMAN,

1995; WHO, 2000). Resultados similares foram observados com um conjugado MCPS-TT obtido por aminação redutiva. A resposta de anticorpo foi predominantemente do isotipo IgG1, seguida de menor quantidade de IgG2b e nenhum percentual de IgG2a, também em modelo murino (GARCÍA-OJEDA et al., 2000). Por outro lado, um conjugado PSC-TT produzido pelo método da carbodiimida, induziu uma forte resposta de IgG1 e poucos títulos de IgG2a e IgG2b em camundongos, sugerindo que o conjugado se comporta primariamente como um antígeno T-dependente (BEUVERY et al., 1983a). Em estudos mais recentes, a imunização de camundongos, com vacinas conjugadas contra pneumococos, sem o uso de adjuvante, induziu primariamente IgG1, enquanto a adição do adjuvante LT-R72 provocou o aumento das sub-classes IgG2a e IgG3, associadas à resposta Th1 (RICHTER et al., 2004). Cuello et al. (2007) obtiveram um conjugado contra o grupo C, utilizando a mesma proteína carreadora, mas com uma nova metodologia de conjugação. Os pesquisadores observaram uma resposta com predominância dos isotipos IgG1 e IgG2a, em camundongos (CUELLO et al., 2007). Vale a pena salientar que embora a proporção das sub-classes de IgG induzida por um processo de vacinação possa diferir baseada no tipo da vacina, grupo do polissacarídeo, proteína utilizada para conjugação e idade dos vacinados, a determinação do isotipo induzido é essencial para a caracterização da resposta imune (FINDLOW et al., 2006).

A resposta imune induzida por adjuvantes compostos de sais de alumínio é predominantemente caracterizada pela participação de células T auxiliares Th2, responsáveis pela indução de mudança de classe para IgG1, com fraca resposta tipo Th1 (GUPTA et al., 1993; GUPTA, R.K. & SIBER, 1995). O mecanismo de ação envolvido é a formação de um depósito que resulta na exposição prolongada ao antígeno, levando a uma melhor resposta imune (Gupta, 1998). O esquema de imunização com a vacina conjugada MenPSC-TT obtida no presente estudo, utilizou o hidróxido de alumínio como adjuvante, porque ele é um dos dois únicos adjuvantes aprovados para uso humano. Foi observada a expressão significativa

de IgG1, apesar da indução superior de IgG2b, isotipo estimulado por pequenas quantidades de TGF- β , que é produzido por várias células presentes na mucosa e em outros tecidos, atuando em conjunto com IL-5, citocina produzida por células Th2. Além disso, IL-5 estimula a proliferação de células B e a produção de anticorpos. O fenótipo de células T (T0, Th1 e Th2) observado após estimulação do antígeno é determinado pelo perfil de citocinas e isotipo de imunoglobulina induzidos. A avaliação de citocinas induzidas pela vacina MenPSC-TT foi realizada através da marcação intracelular em ensaios de citometria de fluxo, utilizando-se anticorpos contra IFN- γ , IL-4 e IL-10 e estímulo apenas com o próprio conjugado *in vitro*. Os resultados obtidos com IFN- γ foram expressivos apenas em um ensaio, com um relevante percentual de marcação dos esplenócitos de camundongos imunizados com 2 doses da vacina conjugada. Infelizmente estes resultados não se reproduziram em ensaios subseqüentes utilizando o mesmo número de doses ou 3 doses e desafio com suspensão bacteriana. Da mesma forma, os resultados com as outras citocinas pesquisadas, com a marcação de CD69 em células T ativadas e de CD44 em células T com fenótipo de memória, não apresentaram relevância estatística em relação aos animais controle. As dificuldades de detecção das citocinas e de moléculas de ativação podem estar relacionadas ao protocolo experimental utilizado para estimulação *in vitro* com o antígeno específico. A concentração escolhida do conjugado foi baseada nos ensaios de ELISPOT, onde 4 μ g do imunógeno, utilizadas por poço, foram suficientes para estimulação e detecção de plasmócitos produtores de IgG, durante 16h. O aumento desta concentração para 8 μ g/poço de antígeno não alterou o percentual de células coradas. Outro ponto importante é o tempo de incubação para estimulação máxima *in vitro*, nas condições experimentais utilizadas. O período máximo estudado (16h) talvez não tenha sido suficiente para a detecção de células T efetoras envolvidas na resposta ao antígeno e capazes de produzir citocinas. Chattopadhyay, Yu & Roederer (2006) propuseram um protocolo para detecção de células T CD4⁺, produtoras de

citocinas em resposta a antígenos, utilizando anticorpos co-estimuladores anti-CD28 e anti-CD49 e estimulação em períodos de 6 a 24h, na tentativa de aumentar a expressão de células T detectadas. Vários estudos têm demonstrado a necessidade de utilização do anticorpo anti-CD28 ou de cultivo por 96h para melhorar a sensibilidade de ensaios *ex vivo* de expressão de citocinas e clones de células T específicos de antígenos (ROSTAINING et al., 1999; ROBINSON et al., 2002, MUTHUKKUMAR & STEIN, 2004). Outra hipótese para a interpretação dos resultados obtidos seria a possibilidade de interação entre as células B e T ser unidirecional, ou seja, estaria ocorrendo apenas a ajuda cognata das células T auxiliares às células B. Neste caso, as células B estariam apresentando o antígeno normalmente para atrair células T auxiliares previamente ativadas ou células de memória, nas regiões de centros germinativos, o que levaria muito tempo para a detecção de citocinas produzidas. Esta hipótese é baseada nos ensaios realizados por Epstein et al. (1995), que estudaram a capacidade de células B estimularem células T de camundongos transgênicos, deficientes em células B *in vivo*.

Mesmo não tendo sido detectadas quantidades expressivas de citocinas, novos ensaios devem ser realizados utilizando-se um protocolo experimental otimizado, com o objetivo de elucidar o mecanismo de interação existente entre as células B e T na resposta à vacina conjugada MenPSC-TT. Para uma análise global adequada, deve-se tomar cuidado na interpretação dos resultados obtidos para que não haja uma simplificação da resposta imune, que na verdade é constituída de resposta complexa obtida pela participação do componente inato e por diferentes sub-populações celulares, promovendo um balanço para a eliminação do microrganismo causador da doença infecciosa (KELSO, 1995; ALLEN & MAIZELS, 1997).

O processo de maturação da afinidade de anticorpos após a imunização primária com um antígeno T-dependente ocorre em função do tempo, após inoculações repetidas. Este processo é um marcador da indução de memória imunológica. O somatório de todos os pontos

de ligação com alta afinidade presentes nos anticorpos resulta na maior avidéz dos mesmos pelo antígeno, ou seja, na capacidade de ligação mesmo em baixas concentrações. Alguns autores têm demonstrado que anticorpos contra o polissacarídeo capsular, com maior avidéz são mais ativos na indução da lise bacteriana mediada por complemento (GOLDBLATT, 1997; BORROW et al., 2001; HARRIS, FINN & GRANOFF, 2003; BORROW BALMER & MILLER, 2005). A avaliação da avidéz de anticorpos produzidos pode ser realizada por diferentes métodos, utilizando agentes desnaturantes capazes de desfazer as ligações fracas, permanecendo assim apenas àquelas resistentes à ação destes agentes (GOLDBLATT, 1997). Entretanto, é de fundamental importância a avaliação da ligação antígeno-anticorpo na presença de um agente desnaturante, como tiocianato de amônio, após a determinação prévia da diluição apropriada do soro, onde todas as amostras possuam a mesma faixa de absorvância. Caso contrário os soros seriam comparados com concentração diferente de anticorpos e não seria possível a avaliação real do índice de avidéz (IA) dos mesmos. Neste trabalho foi utilizada a metodologia descrita por Goldblatt (1997) e citada por outros pesquisadores (McCLOSKEY, TURNER, GOLDBLATT, 1997; AASE et al., 2003), para avaliação da avidéz dos anticorpos induzidos por diferentes concentrações da vacina conjugada MenPSC-TT. O grupo de camundongos imunizados com 1µg/dose da vacina apresentou IA mais alto, após repetidas injeções e foi seguido pelo grupo que recebeu 0,1µg/dose. Embora os animais imunizados com 10µg/dose tenham apresentado altos títulos de IgG e atividade bactericida, o IA foi mais baixo que os dos outros grupos, sugerindo que a quantidade excessiva de antígeno localizado em células foliculares dendríticas, presentes em região rica em células B, pode reduzir a competição e permitir a produção de anticorpos com maturação de afinidade mais baixa (WANG et al., 2000). Vários estudos com vacinas conjugadas contra diversas bactérias encapsuladas como pneumococos, Hib e estreptococos têm demonstrado a importância da avaliação da avidéz dos anticorpos produzidos, como um

marcador do sucesso da imunização primária e estabelecimento de memória (ANTILLA et al., 1998; GOLDBLATT, BORROW & MILLER, 1998; BAKER et al., 2007).

Os coeficientes de correlação (r) obtidos entre o teste de ELISA tradicional, atividade bactericida do soro e ELISA de alta avidéz foram calculados incluindo amostras de soros de animais antes e após imunização com a vacina conjugada MenPSC-TT. O teste de ELISA tradicional apresentou uma correlação levemente superior com o teste de avaliação da atividade bactericida do soro, quando comparado ao ensaio de ELISA de alta avidéz. Este resultado sugere a possibilidade da vacina conjugada estar induzindo predominantemente anticorpos com alta atividade funcional no modelo animal utilizado, conforme publicado anteriormente para anticorpos humanos (BURRAGE et al., 2002; VERMONT et al., 2004). Entretanto, outros estudos encontraram uma melhor correlação entre o teste de atividade bactericida e o ensaio de ELISA de alta avidéz, sugerindo que nem todos os anticorpos IgG específicos induzidos pelas vacinas meningocócicas conjugadas contra o grupo C, em camundongos ou humanos, mediam a atividade bactericida do soro (GHEESLING et al., 1994; GOLDBLATT, 1997; AASE et al., 2003; CARMENATE et al., 2005).

Os resultados dos estudos dose-resposta com a vacina conjugada MenPSC-TT, obtida pelo método modificado de aminação redutiva, demonstraram que a dose de 1 μ g foi a melhor dose para indução de resposta imune em camundongos, o que justificou a sua escolha para os ensaios posteriores. Esta dose que representa 1/10 da dose humana (10 μ g em 0,5 mL), é proporcional ao menor peso dos animais e está de acordo com a relação de dose que tem sido normalmente utilizada para a imunização de camundongos com vacinas contra meningococos (INFANTE et al., 2001). A determinação da relação dose-resposta é essencial para o estabelecimento da quantidade mínima necessária de um imunógeno capaz de induzir uma resposta imune ótima, com limitada reatogenicidade (BAKER et al., 2007).

Uma das características da resposta imune a vacinas conjugadas é a indução de anticorpos contra a parte sacarídica e a porção protéica da molécula, em decorrência das interações entre células B e T, após a estimulação com o antígeno conjugado (LANZAVECCHIA, 1985; 1986). A detecção de anticorpos induzidos pelo toxóide tetânico, utilizado como proteína carreadora, pode ser realizada de forma direta por ensaios imunoenzimáticos (ELISA) *in vitro* ou indireta por ensaios de soroneutralização *in vivo* (WHO, 1990). O ensaio de soroneutralização determina o título anti-tóxico em soros de animais imunizados com vacinas contendo a proteína tetânica, através da inoculação do soro em presença de toxina padrão previamente aferida. Deve ser utilizada uma dose teste da toxina correspondente a 1L+/10 (Limite de morte), ou seja, menor quantidade de toxina que quando combinada com 0,1UI de antitoxina de referência, provoca a morte de 100% dos animais no período de observação estipulado (96h). Os valores das doses efetivas médias (DE₅₀) das vacinas em estudo e da vacina de referência são determinados mediante método estatístico que promova a transformação dos dados obtidos em regressão linear, como faz o Probit. Este método é amplamente utilizado no Brasil para a determinação da atividade imunogênica de vacinas anti-tetânicas adsorvidas, de acordo com a Farmacopéia Brasileira (4ª edição, 2º fascículo, 2000). As vacinas aprovadas no ensaio são aquelas que apresentam atividade imunogênica $\geq 2\text{UI/mL}$. A resposta à vacina conjugada MenPSC-TT obtida neste estudo foi avaliada por ensaio de soroneutralização em camundongos, de acordo com o protocolo utilizado pelo INCQS, órgão responsável pelo controle de qualidade de vacinas no Brasil. O soro de referência DT e a toxina tetânica padrão foram fornecidos pelo INCQS. A vacina conjugada apresentou uma potência superior àquela observada pela vacina de referência ($>3,16$ vs 2 UI/mL). Da mesma forma, uma vacina conjugada contra Hib produzida em Bio-Manguinhos, com metodologia de conjugação diferente, mas utilizando a mesma proteína carreadora, apresentou uma potência superior a $3,16\text{ UI/mL}$. Estes resultados

demonstram a presença de anticorpos anti-TT induzidos em quantidade adequada para a promoção de soroneutralização da toxina tetânica e subsequente proteção dos animais inoculados, nas duas vacinas conjugadas em que é utilizado TT como proteína carreadora.

Durante o desenvolvimento de novas vacinas bacterianas é de extrema importância a realização de ensaios que possam avaliar a proteção de animais imunizados em modelos de infecção experimental. Estes ensaios *in vivo* são propostos porque são capazes de modular os eventos complexos que ocorrem na presença de organismos patogênicos vivos. Entretanto, tais modelos animais não são ideais e nem sempre reproduzem a doença humana, como acontece com a doença meningocócica. *N.meningitidis* não é capaz de colonizar e induzir doença em camundongos, principalmente porque não consegue retirar ferro de proteínas transportadoras de ferro do animal, que é necessário para a sua multiplicação na corrente sanguínea. Por outro lado, camundongos tratados com ferro podem ser infectados com meningococos e desenvolvem uma doença aguda e fatal (WEINBERG, 1974; LETENDRE & HOLBEIN, 1983; TSAI, DYER & SPARLING, 1988). Esta intervenção é capaz de assegurar o crescimento do microrganismo e a indução de morte por choque endotóxico, devido à liberação de grandes quantidades de vesículas de membrana externa contendo LOS e citocinas pró-inflamatórias (VERHEUL, SNIPPE & POOLMAN, 1993; MIRLASHARI, HAGBERG & LYBERG, 2002; JESSOUROUN et al., 2004; GORRINGE ET AL., 2005). O modelo hiperferrêmico de infecção com meningococo grupo B foi desenvolvido por Sifontes et al. (1997), onde camundongos imunizados com a vacina VA-MENGOC-BC foram protegidos do desafio com diferentes cepas do grupo B, isoladas de casos clínicos. Posteriormente, Jessouroun et al. (2004), utilizando o mesmo modelo murino, demonstraram a proteção de animais imunizados com uma vacina brasileira contra o grupo B, contendo OMVs e LOS detoxificado, de infecção meningocócica e choque séptico induzidos por cepas homólogas e heterólogas. Os autores concluíram que o modelo animal é similar à doença em humanos e

propuseram a inclusão da medida de marcadores de sepse para avaliação dos efeitos protetores de imunógenos (JESSOUROUN et al., 2004). Estes estudos foram utilizados para a adaptação do modelo murino na avaliação da proteção induzida por diferentes lotes de conjugados MenPSC-TT, obtidos em diferentes escalas neste estudo, utilizando uma cepa heteróloga de *N.meningitidis* grupo C (N1002/90). Os lotes de conjugados estudados foram capazes de induzir taxas superiores a 88% de proteção efetiva ao prevenir a mortalidade de camundongos de infecção meningocócica, induzida por uma suspensão de desafio correspondente a 5-10 DL₅₀, 1 ano após a imunização primária. Entretanto, o polissacarídeo nativo, não conjugado, induziu baixas taxas de proteção dos animais, próximas às aquelas observadas para o grupo controle (80 vs 100% de mortalidade), sugerindo a participação de anticorpos protetores mantidos após um longo período de imunização.

Vários estudos têm descrito a presença de plasmócitos de longa duração secretando anticorpos IgG com alta afinidade, em animais imunizados com diferentes vacinas, como mecanismo importante da imunidade humoral para diferentes patógenos (SLIFKA et al., 1998; CROTTY et al., 2003; HAMMARLUND et al., 2003). Como o polissacarídeo, antígeno TI-2, é capaz de induzir apenas títulos de anticorpos dos isotipos IgM e IgG3, que têm meia-vida curta e baixa afinidade e não induzem o estabelecimento de células B de memória ou plasmócitos de longa duração, os resultados observados no ensaio de desafio não são surpreendentes (NEUBERGER & RAJEWSKY, 1981; UNKELESS, SCIGLIANO & FREEDMAN, 1988; RUBINSTEIN et al., 1998).

Além do papel de anticorpos na proteção, outros mecanismos podem estar presentes no modelo murino de infecção. Mecanismos de imunidade inata são importantes para a eliminação da bactéria, já que células fagocíticas reconhecem a presença de padrões moleculares associados a patógenos, como o LPS em bactérias gram-negativas, em adição aos anticorpos induzidos pelos conjugados (MEDZHITOV & JANEWAY JR, 2000). Os

primeiros mecanismos de defesa mobilizados na infecção aos meningococos pertencem à imunidade inata com a participação dos fagócitos mononucleares, neutrófilos, células NK, proteínas ligadoras de manose e sistema complemento. Já foi descrito que células fagocíticas como os macrófagos têm um papel importante na imunidade inata em modelos animais de infecção bacteriana (MEKORI & METCALFE, 2000). Apesar da proteção à doença meningocócica ser principalmente correlacionada com a presença de anticorpos bactericidas, é importante considerar a resposta imune celular e a morte da bactéria por fagocitose, como fatores importantes na defesa do hospedeiro (DLAWER & ALA'ALDEEN, 1996; INFANTE et al., 2001). Richter et al. (2004) também utilizaram um modelo murino de infecção letal por pneumococos, para avaliar proteção maternal conferida por glicoconjugados e concluíram ser um modelo adequado para estudar a infecção de recém-natos causada por bactérias encapsuladas.

A terceira fase da resposta imune a antígenos T-dependentes consiste no estabelecimento de regiões ricas em células B, conhecidas como centros germinativos. Estes centros germinativos são expandidos, se diversificam e selecionam variantes de alta afinidade de células B específicas do antígeno para a entrada no compartimento de células B de memória, de longa duração. Sob re-exposição ao antígeno, células B rapidamente se expandem e se diferenciam em plasmócitos sob o controle de células T de memória (McHEYZER-WILLIAMS & McHEYZER-WILLIAMS, 2005).

O ensaio de ELISPOT é uma ferramenta poderosa para a detecção e análise de células individuais que secretam uma proteína particular *in vitro*. Embora o ensaio tenha sido originalmente desenvolvido para a análise de células que secretam anticorpos em resposta a antígenos específicos (CZERKINSKY et al., 1983; SEDGWICK et al., 1983), atualmente ele tem sido adaptado para medir a frequência de células que produzem e secretam uma variedade de outras moléculas efetoras como citocinas (MEIKLEJOHN et al., 2004). Para a detecção de

células produtoras de anticorpos, os linfócitos são plaqueados em placas sensibilizadas com o antígeno. Os anticorpos se ligam ao antígeno na vizinhança imediata de células produtoras do anticorpo específico. Os “spots” de anticorpos ligados são então detectados através da enzima acoplada ao anticorpo anti-imunoglobulina e ao cromógeno. Desta forma, pode-se medir o número de células produtoras de “spots” (CPS) específicas após desafio com o antígeno.

De maneira geral, antígenos T-dependentes como conjugados PS-proteína administrados parentalmente podem tipicamente induzir respostas CPS com predomínio de IgG e títulos de IgG sistêmico no soro. No nosso estudo foram estudadas as frequências de CPS, produtoras de IgG, induzidas pela administração parenteral de lotes de conjugados MenPSC-TT e MenPSC nativo em camundongos, que produzem anticorpos contra diferentes antígenos adsorvidos na placa. Células de baço de animais imunizados com o conjugado apresentaram frequência similar de CPS em resposta ao MenPSC e MenPSC-TT e, em menor extensão, também ao TT. Estes resultados demonstram a existência de sub-populações de células B específicas dos componentes sacarídico e protéico do conjugado e do próprio conjugado, no baço dos animais imunizados. Além disto, é importante destacar a capacidade de reconhecimento e resposta das células dos animais sensibilizados com o conjugado MenPSC-TT a antígenos T-dependente (conjugado) e TI-2 (polissacarídeo nativo). A análise destes resultados sugere a participação de células B de memória no baço dos animais, induzidas durante a imunização primária e recrutadas durante o desafio com a bactéria, com a posterior proliferação e diferenciação em células B produtoras de IgG de curta duração, em resposta ao antígeno adsorvido na placa, independente da sua natureza. A presença de altas frequências de CPS entre os esplenócitos dos animais controle, inoculados com PBS, em resposta aos estímulos, sugere a existência de reatividade cruzada com outros antígenos similares, provavelmente em função do longo tempo de manutenção dos animais no infectório. Este tipo de resposta inespecífica foi observado principalmente nas células do

baço, provavelmente devido à presença de células B naive, em estágios iniciais de diferenciação e conseqüentemente mais susceptíveis de serem ativadas em resposta a diferentes estímulos policlonais do ambiente. Por outro lado, foram observadas frequências elevadas de CPS nas células da medula de animais imunizados com a vacina conjugada e um número menos expressivo de CPS nos animais controle, provavelmente devido à existência de células B em estágio mais avançado de diferenciação, prontas para responder especificamente à re-exposição ao imunógeno. Estas células B presentes na medula de animais imunizados por longos períodos provavelmente correspondem às células B produtoras de IgG de longa duração em resposta ao estímulo vacinal, descritas por vários estudos (SLIFKA et al., 1998; GOURLEY et al., 2004; MANZ et al., 2005; McHEYZER-WILLIAMS & McHEYZER-WILLIAMS, 2005). Os plasmócitos de longa duração são células que sofreram todo o processo de diferenciação e maturação da afinidade em resposta ao antígeno e migraram para a medula óssea devido à presença de moléculas de adesão como VLA-4, Syndecan-1 e receptores de quimiocinas como CXCR4 e do microambiente favorável. Células do estroma da medula fornecem sinais para o estabelecimento de nichos de sobrevivência no órgão, cuja ocupação limitada depende de competição com células pré-existentes (GOURLEY et al., 2004; MANZ et al., 2005). Estas células podem ser consideradas componentes celulares do compartimento de células B de memória, que contribuem para a memória sorológica humoral e são capazes de secretar anticorpos com avidéz superior àquela apresentada pelos anticorpos secretados por células B de memória após ativação e diferenciação (McHEYZER-WILLIAMS & McHEYZER-WILLIAMS, 2005). Como conseqüência dos processos de infecção ou vacinação são detectados níveis persistentes de anticorpos específicos contra varíola (período maior que 60 anos), toxóide tetânico, etc., durante décadas na ausência de re-estimulação ao antígeno (CROTTY et al., 2003; HAMMARLUND et al., 2003).

Slifka et al. (1998) demonstraram em modelo murino a existência de uma fração expressiva de plasmócitos que podem sobreviver e continuar a secretar anticorpos com alta afinidade contra um antígeno viral, por períodos próximos a 2 anos, ou seja, durante toda a vida do animal. Os animais estudados foram depletados de células B de memória por irradiação e, portanto, estas células foram excluídas como o grupo de reposição dos plasmócitos de longa duração. Os autores ressaltaram a importância do novo mecanismo na manutenção da resposta humoral contra patógenos microbianos. Resultados similares foram encontrados com outras infecções virais (BACHMANN et al., 1994; HYLAND et al., 1994; SMITH et al., 1997). Outros estudos demonstraram que as células B de memória constituem o grupo de células de reposição dos plasmócitos de longa duração, através da resposta a estímulos policlonais como o CpG (DNA não metilado presente em patógenos) ou através da ajuda bystander de células T auxiliares (BERNASCONI, TRAGGIAI & LANZAVECCHIA., 2002).

Da mesma forma que para outras bactérias extracelulares, a eficácia de vacinas compostas de conjugados PS-proteína é comprovadamente relacionada à sua capacidade de induzir proteção através de anticorpos séricos e conferir imunidade de rebanho, através da eliminação do estado de portador. Entretanto, a análise de eficácia das vacinas conjugadas contra Hib e meningococo grupo C, recentemente introduzidas no Reino Unido, tem demonstrado casos esporádicos de falha vacinal, onde pessoas vacinadas não tinham o nível adequado de anticorpos circulantes e tornaram-se susceptíveis à doença. Como nestes casos de infecção podem ocorrer invasão e doença em até 48h após exposição ao microrganismo, a manutenção de títulos de anticorpos com alta avidéz a partir de plasmócitos de longa duração, foi considerado um mecanismo de grande importância para o estabelecimento de memória, em comparação com a resposta obtida a partir da ativação de sub-populações de células B de memória específicas do antígeno, cuja ativação, proliferação, diferenciação e produção de

anticorpos demoraria em torno de 4 dias (McVERNON et al., 2003; PICHICHERO, 2005; KELLY, POLLARD & MOXON, 2005; KELLY et al., 2006).

A imunidade humoral, além de estar diretamente relacionada com as respostas de anticorpo, tem uma base celular onde células B de memória são responsáveis por direcionar a resposta rápida e específica ao encontro subsequente com um patógeno ou antígeno. Esta rápida e específica resposta de memória sob re-exposição é a base para vacinação (GOURLEY et al., 2004). As células B de memória desenvolvem-se nos centros germinativos após reações celulares e moleculares que regulam a resposta de clones antígeno-específicos. Estas células, que carregam genes de imunoglobulina mutados somaticamente, sobrevivem em órgãos linfóides na ausência de antígeno por longos períodos (McHEYZER-WILLIAMS & McHEYZER-WILLIAMS, 2005). Existem vários sub-tipos de células B de memória antígeno-específicas, definidos pelo isotipo de anticorpo induzido e qualidade da regulação cognata de células T, que dependem do antígeno, dose, via de entrada e uso de adjuvantes. Agematsu e col. (1997) identificaram uma sub-população de células B IgD^+ no sangue periférico, que pode ser diferenciada pela expressão de CD27. As células com fenótipo $CD27^+IgD^+$ diferem de células B naive porque são capazes de responder à estimulação produzindo altos títulos de IgM, sugerindo que são células já sensibilizadas ou células de memória. Outra sub-população definida de células B de memória com fenótipo $CD27^+IgD^-$, são células que sofreram mudança de classe, não secretam anticorpos mas expressam imunoglobulinas (IgG, IgA ou IgM) com alta afinidade na superfície e são responsáveis pelos anticorpos com maior avidéz em uma resposta secundária (KLEIN, RAJEWSKY & KÜPPERS, 1998). CD27, um membro da superfamília de receptores do TNF, além de ter várias funções, parece ser um marcador importante de células B de memória, que adquirem a sua expressão nos centros germinativos e a mantém até o estágio de plasmócitos. Entretanto, a molécula CD27 também é expressa na maioria de células T do sangue periférico e em células

NK. O seu ligante natural é CD70, e as interações CD27/CD70 regulam a proliferação e diferenciação de células B pelas células T e também regulam a ativação de células T (BORST, HENDRIKS & XIAO, 2005).

A pesquisa de células linfóides de memória com os dois fenótipos CD27⁺IgD⁺ e CD27⁺IgD⁻ foi realizada em células de baço de camundongos, 4 meses após a imunização com 2 ou 3 doses da vacina conjugada MenPSC-TT, obtida no presente estudo, seguida ou não do desafio com suspensão bacteriana. Os resultados da marcação de superfície evidenciaram as duas sub-populações celulares. Entretanto, apenas a sub-população com fenótipo CD27⁺IgD⁻ apresentou percentuais significativos, nos animais que receberam 3 doses da vacina e inoculação subsequente de uma cepa heteróloga de *N.meningitidis* grupo C. Estes resultados foram diferentes do grupo controle (células de animais inoculados com PBS) e sugerem que a inoculação da suspensão bacteriana pode ter funcionado como uma imunização reforço, capaz de realçar a expressão das células linfóides que apresentam este fenótipo, o que não foi evidenciado apenas com o esquema primário de imunização. As células dos animais imunizados com o polissacarídeo nativo apresentaram percentual expressivo do fenótipo CD27⁺IgD⁻, contudo, não foram evidenciadas diferenças significativas com o percentual apresentado pelo grupo controle. A análise estatística utilizando ANOVA (Teste de Bonferroni, com 95% de intervalo de confiança) mostrou uma grande dispersão dos valores obtidos com o polissacarídeo nativo, provavelmente devido ao pequeno número de animais estudados (n = 3), o que forçou uma aproximação aos percentuais induzidos pela vacina conjugada.

Além da dispersão dos valores encontrados, outra possível explicação para os resultados seria o aparecimento de marcação com especificidade não relacionada, causada pela ativação policlonal de células de memória (BERNASCONI, NOBUYUKI & LANZAVECCHIA, 2003). Algumas moléculas estudadas, como LPS e CpG, podem

estimular células B de memória através de vias de sinalização inatas, envolvendo receptores tipo toll (TLRs) incluindo o TLR9, expresso constitutivamente em células B de memória. Esta ativação é independente da sinalização via BCR (BERNASCONI, NOBUYUKI & LANZAVECCHIA, 2003). Desde que as células com fenótipo $CD27^+IgD^-$ são células que sofreram mudança de classe, a hipótese de ativação policlonal das células de animais imunizados com o polissacarídeo nativo é reforçada pela frequência irrelevante de células B produtoras de IgG, encontradas no baço de animais imunizados com este antígeno.

Outro tipo de estimulação, que expandiria a população $CD27^+$, independente da sinalização via BCR, seria a ativação de células B de memória para diferenciação em plasmócitos, resultante da ajuda bystander de células T auxiliares (independente da estimulação de receptores TCR; e da presença do complexo BCR/MHC classe II) (BERNASCONI, TRAGGIAI & LANZAVECCHIA, 2002). Esta ativação pode ser obtida diretamente via sinalização de CD40 e B7.1/B7.2 ou indiretamente via sinalização de citocinas, provavelmente em conjunto com a sinalização inata, durante uma infecção ou após vacinação (GOURLEY et al., 2004). CLUTTERBUCK et al. (2006) encontraram uma frequência aumentada de plasmócitos específicos para o TT, utilizado como controle em um sistema para o estudo de células B de memória. Nestes ensaios, as células foram estimuladas por uma vacina conjugada com uma proteína carreadora não relacionada, o CRM-197 (vacina conjugada heptavalente contra pneumococos). Os autores encontraram um número expressivo de plasmócitos e de células B de memória específicos para o TT, em adultos, circulando entre 6 a 7 dias após a imunização.

Outro aspecto importante que deve ser considerado nos ensaios de detecção de células linfóides com fenótipo de memória é a possibilidade de otimizar o protocolo experimental utilizado e conseqüentemente melhorar a marcação, através da obtenção de suspensão celular enriquecida em células B. Este procedimento utiliza micro-esferas revestidas com anticorpo

anti-CD19 para a seleção positiva de células B a partir de suspensão de esplenócitos. Pode ser que nestas condições, a expressão dos dois fenótipos celulares seja mais evidenciada. Vários estudos têm descrito a pesquisa de células B com os dois fenótipos, presentes em diferentes imunopatologias, utilizando esta abordagem metodológica (AGEMATSU et al., 1998; HIMMELMANN et al., 2001).

A natureza de sinais necessários para a diferenciação *in vivo* das células B de memória em plasmócitos e a manutenção prolongada de níveis basais de anticorpos antígeno-específicos, não é completamente elucidada. O conhecimento do mecanismo de regulação deste processo poderia ser o ponto central, para o entendimento da biologia de células B de vacinas conjugadas PS-proteína, já que a imunização primária é insuficiente para proteger alguns indivíduos (KELLY, POLLARD & MOXON, 2005). Existem estudos detalhados da detecção de células B com fenótipo de memória, que respondem aos antígenos polissacarídeos, em adultos expostos naturalmente (HOUGS et al., 1999; LUCAS et al., 2001). Entretanto, estes tipos de estudos não têm sido conduzidos em seres humanos com vacinas conjugadas. Células B de memória também têm sido detectadas no sangue periférico de indivíduos vacinados com antígenos como tétano, difteria e varíola, por vários anos. Estas células, detectadas após estimulação policlonal, apresentam uma correlação direta com títulos de anticorpos (BERNASCONI, TRAGGIAI & LANZAVECCHIA., 2002; CROTTY et al., 2003). Desta forma, é de extrema importância que este estudo seja realizado no modelo de vacina conjugada contra *N.meningitidis*, com o objetivo de orientar novas abordagens vacinais, capazes de garantir a manutenção dos títulos de anticorpos protetores.

A análise de todos estes resultados correspondentes à caracterização físico-química, biológica e avaliação imunológica de conjugados obtidos por uma metodologia de conjugação e purificação proposta, descrita no presente estudo, fundamenta a produção de lotes da vacina conjugada MenPSC-TT, sob condições de Boas Práticas de Fabricação (BPF), para estudos

clínicos de Fase I a serem realizados em voluntários saudáveis do país. De acordo com estes resultados, pode ser esperado que esta vacina conjugada seja mais efetiva do que uma vacina polissacarídica em humanos, principalmente em crianças.

As metodologias desenvolvidas no presente estudo também poderão ser utilizadas para a obtenção de outras vacinas conjugadas contra bactérias encapsuladas de interesse epidemiológico no Brasil, constituindo assim uma plataforma tecnológica para obtenção de vacinas. Bio-Manguinhos é a primeira instituição brasileira com iniciativa nesta área, com investimento na capacitação de pessoas em diferentes tecnologias. Um projeto deste porte, que envolve o desenvolvimento de uma vacina conjugada, através de metodologias diferenciadas, traz um grande avanço ao desenvolvimento tecnológico do país, que normalmente utiliza vacinas com alto custo, obtidas por contratos de transferência de tecnologias estrangeiras, para suprir o Programa Nacional de Imunização (PNI) do Ministério da Saúde. Desde que existe grande interesse do PNI em substituir a vacina polissacarídica contra *N.meningitidis* grupo C, utilizada apenas em casos de epidemia, a vacina conjugada MenPSC-TT, obtida por tecnologia desenvolvida no país, após ser avaliada e aprovada em estudos clínicos, poderá ser empregada a custos mais baixos, para a proteção de milhares de crianças, adolescentes e adultos jovens brasileiros, contra a infecção causada por esta bactéria encapsulada.

6. CONCLUSÕES

- Foram obtidos vários lotes de conjugados MenPSC-TT, utilizando-se o método modificado de aminação reductiva com apenas 18h de reação, através da introdução de grupos reativos na proteína. O método se mostrou reprodutível e consistente para lotes com escalas de 200 a 20.000 doses de vacina, que apresentaram razão açúcar:proteína entre 0,2 a 0,5;
- A metodologia de purificação empregada utilizando sistema de ultrafiltração tangencial e membranas de diferentes cortes, compatíveis com o tamanho da molécula estudada, mostrou-se altamente eficiente na remoção de sub-produtos das reações de ativação do MenPSC, TT e de conjugação e do polissacarídeo livre;
- Vários ensaios foram padronizados para avaliação da pureza das moléculas obtidas após as reações químicas e etapas de purificação. A vacina conjugada MenPSC-TT liofilizada foi aprovada nos testes de controle de qualidade físico-químicos e biológicos preconizados pela OMS e apresentou uma estabilidade superior a 2 anos de estocagem através da análise do perfil de eluição em cromatografia de exclusão e indução de títulos de IgG total, em ensaios de ELISA;
- Todos os lotes de conjugados, obtidos em diferentes escalas (200 e 20.000 doses) foram imunogênicos em camundongos. A vacina conjugada MenPSC-TT liofilizada (20.000 doses) induziu altos títulos de anticorpos, de forma dose-dependente, onde 1µg foi a melhor dose para indução da resposta imune, mostrando efeito reforço após a 2ª injeção. Os títulos SBA foram elevados e apresentaram um significativo aumento após a 2ª dose de reforço, superiores ao título de 1:8, considerado o correlato *in vitro* com proteção à doença meningocócica causada pelo grupo C. Estes resultados sugerem o estabelecimento de memória imunológica;
- Os anticorpos de camundongos imunizados com a vacina conjugada MenPSC-TT liofilizada apresentaram elevados índices de avidéz em presença de agente desnaturante, após repetidas injeções, demonstrando o sucesso da imunização primária e estabelecimento de maturação da afinidade;

- A vacina conjugada MenPSC-TT (1 μ g/dose) induziu altos títulos dos isotipos IgG1 e IgG2b contra MenPSC, mas não foi detectado IgG2a, demonstrando a conversão da natureza da resposta imune a uma forma dependente de células T auxiliares;
- Foi demonstrada a presença de anticorpos protetores anti-TT induzidos pela vacina conjugada MenPSC-TT, em quantidade adequada para a proteção dos animais desafiados com a toxina tetânica, em ensaios de soroneutralização;
- Lotes de conjugados obtidos em diferentes escalas foram capazes de induzir taxas superiores a 88% de proteção de camundongos imunizados e desafiados com uma cepa heteróloga (N1002/90; 5 a 10 DL₅₀), 1 ano após a imunização primária, sugerindo a manutenção de resposta humoral contra o imunógeno;
- Nas condições experimentais utilizadas, a vacina conjugada MenPSC-TT não induziu uma produção significativa de citocinas (IFN- γ , IL-4, IL-10, e IL-12). Além disso, não foi detectado aumento da expressão de marcadores de ativação (CD69) e de fenótipo de memória (CD44), em células T CD4⁺ ou CD8⁺;
- Lotes de conjugados MenPSC-TT induziram aumentada frequência de CPS no baço e medula de animais imunizados, correspondentes a plasmócitos de curta e longa duração, respectivamente, em resposta ao estímulo do próprio conjugado e do MenPSC nativo, em ensaios de ELISPOT. Os resultados sugerem a manutenção da resposta humoral contra o imunógeno 1 ano após a imunização primária e o estabelecimento de memória, corroborando os resultados nos ensaios de ELISA para detecção de títulos de IgG;
- Esplenócitos de animais imunizados com 3 doses da vacina conjugada MenPSC-TT e desafiados 4 meses depois com uma cepa heteróloga, apresentaram percentuais expressivos de uma sub-população de células linfóides com fenótipo de memória (CD27⁺IgD⁻), em ensaios de citometria de fluxo;
- A vacina conjugada MenPSC-TT desenvolvida no presente estudo mostrou-se imunogênica e segura em camundongos e, portanto, apresenta potencial uso em seres humanos e deve ser avaliada em estudos clínicos de Fase I.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AASE, A., HOIBY, E.A. & MICHAELSEN, T.E. Opsonophagocytic and bacterial activity mediated by purified IgG subclass antibodies after vaccination with Norwegian group B meningococcal vaccine. **Scand. J. Immunol.**, 47, 388-396, 1998.

AASE, A., NAESS, L.M., SANDIN, R.H., HERSTAD, T.K., OFTUNG, F., HOLST, J., et al. Comparison of functional immune responses in humans after intranasal and intramuscular immunizations with outer membrane vesicle vaccines against group B meningococcal disease. **Vaccine**, 21, 2042-2051, 2003.

ACHTMAN, M. Global epidemiology of meningococcal disease. In: **Meningococcal Disease**. Cartwright, K. (Ed.), Chichester, John Wiley & Sons, 1995. p. 159.

AGEMATSU, K., NAGUMO, H., SHINOZAKI, K., HOKIBARA, S., YASUI, K., TERADA, K., KAWAMURA, N., TOBA, T., NONOYAMA, S., OCHS, H.D. & KOMIYAMA, A. Absence of IgD⁻CD27⁺ memory B cell population in X-linked hyper-IgM syndrome. **J. Clin. Invest.**, 102, 853-860, 1998.

ALLEN, J.E. & MAIZELS, R.M. Th1-Th2: reliable paradigm or dangerous dogma? **Immunol. Today**, 18, 387-392, 1997.

ALONSO DEVELASCO, E., DEKKER, B.A.T., VERHEUL, A.F.M., FELDMAN, R.G., VERHOEF, J. & SNIPPE, H. Anti-polysaccharide immunoglobulin isotype levels and opsonic activity of antisera: relationships with protection against *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. **J. Infect. Dis.**, 172, 562-565, 1995.

ANDERSON, P.W., PICHICHERO, M.E., INSEL, R.A., BETTS, R., EBY, R. & SMITH, H. Vaccines consisting of periodate-cleaved oligosaccharides from the capsule of *Haemophilus influenzae* type b coupled to a protein carrier: structural and temporal requirements for priming in the human infant. **J. Immunol.**, 137, 1181-1186, 1986.

ANTILLA, M., ESKOLA, J., AHMAN, H. & KAYHTY, H. Avidity of IgG for *Streptococcus pneumoniae* type 6B and 23F polysaccharides in infants primed with pneumococcal conjugates and boosted with polysaccharide or conjugate vaccines. **J. Infect. Dis.**, 177, 1614-1621, 1998.

ANTHONY, D.D. & LEHMANN, P.V. T-cell epitope mapping using the ELISPOT approach. **Methods**, 29, 260-269, 2003.

ANTUNES, K.C.L. **Desenvolvimento de metodologias eletroanalíticas para a determinação de zidovudina, lamivudina e zalcitabina**. 2004. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

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

AVERY, O.T., GOEBEL, W.F. Chemo-immunological studies on conjugated carbohydrate-proteins. V. The immunological specificity of an antigen prepared by combining the capsular polysaccharide of type III pneumococcus with foreign protein. **J. Exp. Med.**, 54, 437-447, 1931.

BACHMANN, M.F., KUNDIG, T.M., KALBERER, C.P., HENGARTNER, H. & ZINKERNAGEL, R.M. How many specific B cells are needed to protect against a virus? **J. Immunol.**, 152, 4235-4241, 1994.

BAKER, C.J., RENCH, M.A., PAOLETTI, L.C. & EDWARDS, M.S. Dose-responseto type V group B streptococcal polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine in healthy adults. **Vaccine**, 25, 55-63, 2007.

BALMER, P., BORROW, R. & MILLER, E. Impact of meningococcal C conjugate vaccine in the UK. **J. Med. Microbiol.**, 51, 717-722, 2002.

BARROSO, D. **Aspectos epidemiológicos e biológicos da infecção invasiva por N. meningitidis na cidade do Rio de Janeiro: 1989 a 1993**. 1998. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1998.

BASTOS, R.C. **Síntese, Purificação e Caracterização Físico-Química do Conjugado de Polissacarídeo Meningocócico C com Anatoxina Tetânica**. 2005. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Imunobiológicos) – Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2005.

BERNASCONI, N.L., TRAGGIAI, E. & LANZAVECCHIA, A. Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. **Science**, 298: 2199-2202, 2002.

BERNASCONI, N.L., NOBUYUKI, O. & LANZAVECCHIA, A. A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naïve B cells and constitutive expression in memory B cells. **Blood**, 101: 4500-4504, 2003.

BEUVERY, E.C., ROSSUM, F. & NAGEL, J. Comparison of the induction of immunoglobulin M and G antibodies in mice with purified pneumococcal type 3 and meningococcal group C polysaccharides and their protein conjugates. **Infect. Immun.**, 37: 15-22, 1982.

BEUVERY, E.C., DELFT, R.W., MIEDEMA, F., KANHAI, V. & NAGEL, J. Immunological evaluation of meningococcal group C polysaccharide-tetanus toxoid conjugate in mice. **Infect. Immun.**, 41, 609-617, 1983a.

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

BEUVERY, E.C., MIEDEMA, F., DELFT, R. & HAVERKAMP, J. Preparation and immunochemical characterization of meningococcal group C polysaccharide-tetanus toxoid conjugates as a new generation of vaccines. **Infect. Immun.**, 40, 39-45, 1983c.

BEUVERY, E.C., SPEIJERS, G.J.A., LUTZ, B.I.G., FREUDENTHAL, D. & DERKS, H.J.G.M. Consequences of the use of N-ethyl-N(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide for the preparation of meningococcal group A and C polysaccharide-tetanus toxoid conjugates as vaccines for human use. In: **The Pathogenic Neisseria** - Proceedings of the 4th International Symposium. American Society for Microbiology. Ed. Gary K. Schoolnik. Washington D.C., 1985. p. 622-627.

BHATTACHARJEE, A.K., JENNINGS, H.J., KENNY, C.P., MARTIN, A. & SMITH, I.C.P. Structural determination of the sialic acid polysaccharide antigens of *Neisseria meningitidis* serogroups B and C with carbon 13 nuclear magnetic resonance. **J. Biol. Chem.**, 250, 1926-1932, 1975.

BJUNE, G., GRONNESBY, J.K., HOIBY, E.A., CLOSS, O. & NOKLEBY, H. Results of an efficacy trial with an outer membrane vesicle vaccine against systemic serogroup B meningococcal disease in Norway. **NIPH Ann.**, 14, 125-130, 1991.

BLACK, S., SHINEFIELD, F., FIREMAN, B., LEWIS, E., RAY, P., HANSEN, J.R. et al. Efficacy, safety and immunogenicity of a heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, 19, 187-195, 2000.

BOLGIANO, B., MAWAS, F., YOST, S.E., CRANE, D.T., LEMERCINIER, X. & CORBEL, M.J. Effect of physico-chemical modification on the immunogenicity of Hib oligosaccharide-CRM 197 conjugate vaccines. **Vaccine**, 19, 189-200, 2001.

BORROW, R., GOLDBLATT, D., ANDREWS, N., RICHMOND, P., SOUTHERN, J. & MILLER, E. Influence of prior meningococcal C polysaccharide vaccination on the response and generation of memory after meningococcal C conjugate vaccination in young children. **J. Infect. Dis.**, 184, 377-380, 2001.

BORROW, R., GOLDBLATT, D., ANDREWS, N. et al. Antibody persistence and immunological memory at age 4 years after meningococcal group C conjugate vaccination in children in the United Kingdom. **J. Infect. Dis.**, 186, 1353-1357, 2002.

BORROW, R., GOLDBLATT, D., FINN, A., SOUTHERN, J., ASHTON, L., ANDREWS, N.L.G., RILEY, C., RAHIM, R., CARTWRIGHT, K., ALLAN, G. & MILLER, E. Immunogenicity of, and immunologic memory to, a reduced primary schedule of meningococcal C-tetanus toxoid conjugate vaccine in infants in the United Kingdom. **Infect. Immun.**, 71, 5549-5555, 2003.

BORROW, R., BALMER, P. & MILLER, E. Meningococcal surrogates of protection – serum bactericidal antibody activity. **Vaccine**, 23, 2222-2227, 2005.

BORROW, R.; CARLONE, G.; KSHIRSAGAR, N.; MUR, N.; THATTE, U.; PARULEKAR, V.; PLIKAYTIS, B.; KULKARNI, P.; IMBAULT, N.; ELIE, C.; FINDLOW, H.; CHATT, J.; BALMER, P.; MARTINEZ, J.; SWIFT, H.; JOHNSON, S.; ROSENSTEIN, N.; MARCHETTI, E.; PREZIOSI, P.; VIVIANI, S. & LAFORCE, M. A Phase I, double blind, randomized study to evaluate a new meningococcal group A conjugate vaccine in healthy Indian adults. **15th International Pathogenic Neisseria Conference (INPC)**, Livro de Resumos, P8.1.06, 2006. p.104.

BORST, J., HENDRIKS, J. & XIAO, Y. CD27 and CD70 in T cell and B cell activation. **Curr. Opin. Immunol.**, 17, 275-281, 2005.

BOSLEGO, J., GARCIA, J., CRUZ, C., ZOLLINGER, W.D., BRANDT, B., RUIZ, S., MARTINEZ, M., ARTHUR, J., UNDERWOOD, P., SILVA, W. et al. Efficacy, safety and immunogenicity of a meningococcal group B (15:P1.3) outer membrane protein vaccine in Iquique, Chile. Chilean National Committee for meningococcal disease. **Vaccine**, 13, 821-829, 1995.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, 72, 248, 1976.

BRAMLEY, J.C., HALL, T., FINN, A., BUTTERY, R.B., ELLIMAN, D., LOCKHART, S., BORROW, R. & JONES, I.G. Safety and immunogenicity of three lots of meningococcal C conjugate vaccine administered at 2, 3 and 4 months of age. **Vaccine**, 19, 2924-2931, 2001.

BUCHANAN, R.M., ARULANANDAM, B.P. & METZGER, D.W. IL-12 enhances antibody responses to T-independent polysaccharide vaccines in the absence of T and NK cells. **J. Immunol.**, 161, 5525-5533, 1998.

BUCHANAN, R.M., BRILES, D.E., ARULANANDAM, B.P., WESTERINK, M.A.J., RAEDER, R.H. & METZGER, D.W. IL-12-mediated increases in protection elicited by pneumococcal and meningococcal conjugate vaccines. **Vaccine**, 19, 2020-2028, 2001.

BUNDLE, D.R., SMITH, I.C. & JENNINGS, H.J. Determination of the structure and conformation of bacterial polysaccharides by carbon 13 nuclear magnetic resonance. Studies on the group-specific antigens of *Neisseria meningitidis* serogroups A and X. **J. Biol. Chem.**, 249, 2275-2281, 1974.

BURRAGE, M., ROBINSON, A., BORROW, R., ANDREWS, N., SOUTHERN, J., FINDLOW, J., et al. Effect of vaccination with carrier protein on response to meningococcal C conjugate vaccines and value of different immunoassays as predictors of protection. **Infect. Immun.**, 70, 4946-4954, 2002.

CARMENATE, T., GUIROLA, M., ALVAREZ, A., CANAÁN, L., GONZÁLEZ, S., CABALLERO, E., et al. Memory immune response generated in *Cercopithecusaethiops* against meningococcal polysaccharide serogroup C conjugate vaccine. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, 43, 133-140, 2005.

CARTWRIGHT, K. Introduction and historical aspects. In: **Meningococcal Disease**. Cartwright, K. (Ed.), Chichester, John Wiley & Sons, 1995. p.1-19.

CAUGANT, D.A., HOIBY, E.A. & MAGNUS, P. Asymptomatic carriage of *Neisseria meningitidis* in a randomly sampled population. **J. Clin. Microbiol.**, 32, 323-330, 1994.

CHATTOPADHYAY, P.K., YU, J. & ROEDERER, M. Live-cell assay to detect antigen-specific CD4⁺ T-cell responses by CD154 expression. **Nature Protocols**, 1, 1-6, 2006.

CHOO, S., ZUCKERMAN, J., GOILAV, C., HATZMANN, E., EVERARD, J. & FINN, A. Immunogenicity and reactogenicity of a group C meningococcal conjugate vaccine compared with a group A + C meningococcal polysaccharide vaccine in adolescents in a randomized observer-blind controlled trial. **Vaccine**, 18, 2686-2692, 2000.

CHU, C., SCHNEERSON, R., ROBBINS, J.B. & RASTOGI, S.C. Further studies on the immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b and pneumococcal type 6A polysaccharide-protein conjugates. **Infect. Immun.**, 40, 245-256, 1983.

CLUTTERBUCK, E.A., SALT, P., OH S., MARCHANT, A., BEVERLEY, P. & POLLARD, A.J. The kinetics and phenotype of the human B-cell response following immunization with a heptavalent pneumococcal-CRM₁₉₇ conjugate vaccine. **Immunol.**, 119, 328-337, 2006.

COHEN, J. Meningococcal disease as model to evaluate novel anti-sepsis strategies. **Crit. Care Med.**, 28, Suppl. S64-S67, 2000.

CONNOLLY, M. & NOAH, N. Is group C meningococcal disease increasing in Europe? A report of surveillance of meningococcal infection in Europe 1993-6. **Epidemiol. Infect.**, 122, 41-49, 1999.

COSTANTINO, P., VITI, S., PODDA, A., VELMONTE, M.A., NENCIONI, L. & RAPPUOLI, R. Development and phase 1 clinical testing of a conjugate vaccine against meningococcus A and C. **Vaccine**, 10, 691-698, 1992.

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

CROTTY, S., FELGNER, P., DAVIES, H., GLIDEWELL, J., VILLARREAL, L. & AHMED, R. Cutting Edge: Long-term B cell memory in humans after smallpox vaccination. **J. Immunol.**, 171, 4969-4973, 2003.

CUELLO, M., CABRERA, O., MARTINEZ, I., DEL CAMPO, J.M., PARAJÓN, E., SOTOLONGO, F., CAMARAZA, M.A., ARNET, A., SUÁREZ, M., PÉREZ, O. Mucosal immune responses to meningococcal C polysaccharide-protein conjugate in mice. **Vaccine**, 24S2:S2/72-S2/73, 2006.

CUELLO, M., CABRERA, O., MARTINEZ, I., DEL CAMPO, J.M., CAMARAZA, M.A., SOTOLONGO, F., PÉREZ, O. & SIERRA, G. New meningococcal C polysaccharide-tetanus toxoid conjugate. Physico-chemical and immunological characterization. **Vaccine**, 25, 1798-1805, 2007.

CUERVO, M.L.C., PÉREZ, L.R., OVIEDO, M., COSTA, L. & PERDOMO, V. Relationships among physico-chemical and biological tests for a synthetic Hib-TT conjugate vaccine. **Vaccine**, 25, 194-200, 2007.

CZERKINSKY, C.C., NILSSON, L-A., NYGREN, H., OUCHTERLONY, O. & TARKOWSKI, A. A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. **J. Immunol. Methods**, 65, 109-121, 1983.

DANZIG, I. Meningococcal vaccines. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, 23, Suppl. 1, S285-S292, 2004.

DE VRIES, F.P., COLE, R., DANKERT, J., FROSCH, M. & VAN PUTTEN, J.P. *Neisseria meningitidis* producing the Opc adhesin binds epithelial cell proteoglycan receptors. **Mol. Microbiol.**, 27, 1203-1212, 1998.

DECOSAS, J. & KOAMA, J.B. Chronicle of an outbreak foretold: meningococcal meningitidis W135 in Burkina Faso. **Lancet Infect. Dis.**, 2, 763-765, 2002.

DEVOE, I.W. & GILCHRIST, J.E. Release of endotoxin in the form of cell wall blebs during "in vitro" growth of *Neisseria meningitidis*. **J. Exp. Med.**, 138, 1156-1166, 1973.

DEVOE, I.W. The meningococcus and mechanisms of pathogenicity. **Microbiol. Rev.**, 46, 162-190, 1992.

DIAKUN, K.R., MARTIN, D.C., MININNI, T., SKUSE, J., ZIEMBIEC, N. & QUATAERT, S. Immunoassay of human *Neisseria meningitidis* serogroup A antibody. **Immunol. Invest.**, 26, 661-679, 1997.

DIFABIO, J.L. Polisacáridos capsulares como vacunas antibacterianas. **Adel. Microbiol. Enf. Infec.**, 7, 1-18, 1988.

DLAWER, A. & ALA'ALDEEN, A. Vaccines against *Neisseria meningitidis*: A post, present and future. **Biotechnologia Aplicada**, 13, 1-7, 1996.

DONALDSON, L., MOORES, Y. & HOWE, J. Introduction of immunization against group C meningococcal infection. London: **Department of Health**, Report no. PL/CMO/99/2, 1999.

EGAN, W. Physico-chemical characterization of polysaccharide vaccines. **Dev. Biol. Base, Karger**, 103, 3-9, 2000.

EPSTEIN, M.M.; DIROSA, F.; JANKOVIC, D.; SHER, A. & MATZINGER, P. Successful T cell priming in B cell-deficient mice. **J.Exp. Med.**, 182, 915-922, 1995.

ENGLISH, M., MACLENNAN, J.M., BOWEN-MORRIS, J.M., DEEKS, J., BOARDMAN, M., BROWN, K., SMITH, S., BUTTERY, J., CLARKE, J., QUATAERT, S., LOCKHART, S. & MOXON, E.R. A randomized, double-blind, controlled trial of the immunogenicity and tolerability of a meningococcal group C conjugate vaccine in young British infants. **Vaccine**, 19, 1232-1238, 2001.

ESKOLA, J. Polysaccharide-based pneumococcal vaccines in the prevention of acute otitis media. **Vaccine**, 19, S78-S82, 2001.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4ª Edição, Fascículo 2, Atheneu Editora São Paulo Ltda., São Paulo, Brasil, 2000, p. 113.1-113.4.

FINDLOW, H., SOUTHERN, J., MABEY, L., BALMER, P., HEYDERMAN, R.S., AUCKLAND, C., MORRIS, R., MILLER, E. & BORROW, R. Immunoglobulin G subclass response to a meningococcal quadrivalent polysaccharide-diphtheria toxoid conjugate vaccine. **Clin. Vaccine Immunol.**, 13, 507-510, 2006.

FINNE, J., LELNONEN, M. & MAKELA, P.H. Antigenic similarities between brain components and bacteria causing meningitis. Implications for vaccine development and pathogenesis. **Lancet**, II, 355-357, 1983.

FISCHER, M. & PERKINS, B.A. *Neisseria meningitidis* group B: emergence of the ET-5 complex. **Semin. Pediatr. Infect. Dis.**, 8, 50-56, 1997.

FRASCH, C.E. & CHAPMAN, S.S. Classification of *Neisseria meningitidis* group B into distinct serotypes I. Serological typing by microbactericidal method. **Infect. Immun.**, 5, 98-102, 1972.

FRASCH, C.E., MENELIS, R.N. & GOTSCHLICH, E.C. Strain-specific variation in the protein and lipopolysaccharide composition of the group B meningococcal outer membrane. **J. Bacteriol.**, 127, 973-981, 1976.

FRASCH, C.E. 1995. Meningococcal vaccines: Past, present and future. In: **Meningococcal Disease**. Cartwright, K. (Ed.), Chichester, John Wiley & Sons, p.245-283.

FREUDEENBERG, M.A. & GALANOS, C. Induction of tolerance to lipopolysaccharide (LPS)-D-galactosamine lethality by pretreatment with LPS is mediated by macrophages. **Infect. Immun.**, 56, 1352-1357, 1988.

GARCÍA-OJEDA, P.A., MONSER, M.E., RUBINSTEIN, L.J., JENNINGS, H.J. & STEIN, K.E. Murine immune response to *Neisseria meningitidis* group C capsular polysaccharide: Analysis of monoclonal antibodies generated in response to a thymus-independent antigen and a thymus-dependent toxoid conjugate vaccine. **Infect. Immun.**, 68, 239-246, 2000.

EGINAT, J., LANZAVECCHIA, A. & SALLUSTO, F. Proliferation and differentiation potential of human CD8+ memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines. **Blood**, 101, 4260-4266, 2003.

GERMANN T., BONGARTZ M., DLUGONSKA H., HESS H., SCHMITT E., KOLBE L., KOLSCH E., PODLASKI F.J., GATELY M.K., RUDE E. Interleukin-12 profoundly up-regulates the synthesis of antigen-specific complement-fixing IgG2a, IgG2b and IgG3 antibody subclasses in vivo. **Eur. J. Immunol.**, 25, 823-829, 1995.

GHEESLING, L.L., CARLONE, G.M., PAIS, L.B., HOLDER, P.F., MASLANKA, S.E., PLIKAYTIS, B.D., ACHTMAN, M., DENSEN, P., FRASCH, C.E., KAYHTY, H., et al. Multicentre comparison of *Neisseria meningitidis* serogroup C anti-capsular polysaccharide antibody levels measured by a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. **J. Clin. Microbiol.**, 32, 1475-1482, 1994.

GIRARD MP, PREZIOSI M-P, AGUADO M-T, KIENY MP. A review of vaccine research and development: Meningococcal disease. **Vaccine**, 24, 4692-4700, 2006.

GOLD, R., LEPOW, M.L., GOLDSCHNEIDER, I., DRAPER, T.F. & GOTSCHLICH, E.C. Clinical evaluation of group A and group C meningococcal polysaccharide vaccines in infants. **J. Clin. Investig.**, 56, 1536-1547, 1975.

GOLD, R., LEPOW, M.L., GOLDSCHNEIDER, I., DRAPER, T.F. & GOTSCHLICH, E.C. Kinetics of antibody production to group A and group C meningococcal polysaccharide vaccines administered during the first six years of life: prospects for routine immunization of infants and children. **J. Infect. Dis.**, 140, 690-697, 1979.

GOLDBLATT, D. Simple solid phase assays of avidity. In: **Immunochemistry 2: a practical approach**. Turner, M.W. & Jonh-stone A.P. (Eds.), Oxford: IRL Press at Oxford University Press, 1997. p.31-51.

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

GOLDBLATT, D., BORROW, R. & MILLER, E. Natural and vaccine-induced immunity and immunologic memory to *Neisseria meningitidis* serogroup C in young adults. **J. Infect. Dis.**, 185, 397-400, 2002.

- GOLDSCHNEIDER, I., GOTSCHLICH, E.C. & ARTENSTEIN, M.S. Human immunity to the meningococcus. I. The role of human antibodies. **J. Exp. Med.**, 129, 1307-1326, 1969a.
- GOLDSCHNEIDER, I., GOTSCHLICH, E.C. & ARTENSTEIN, M.S. Human immunity to the meningococcus. II. Development of natural immunity. **J. Exp. Med.**, 129, 1327-1348, 1969b.
- GOLDSCHNEIDER, I., GOTSCHLICH, E.C. & ARTENSTEIN, M.S. Human immunity to the meningococcus. V. The effect of immunization with meningococcal group C polysaccharide on the carrier state. **J. Exp. Med.**, 129, 1385-1395, 1969c.
- GOURLEY, T.S., WHERRY, E.J., MASOPUST, D. & AHMED, R. Generation and maintenance of immunological memory. **Semin. Immunol.**, 16, 323-333, 2004.
- GOTSCHLICH, E.C., LIU, T.Y. & ARTENSTEIN, M.S. Human immunity to the meningococcus. III- Preparation and immunochemical properties of the group A, group B and group C meningococcal polysaccharides. **J. Exp. Med.**, 129, 1349-1365, 1969.
- GORRINGE, A.R.; REDDIN, K.M.; FUNNELL, S.G.; JOHANSSON, L.; RYTKONEN, A. & JONSSON, A.-B. Experimental disease models for the assessment of meningococcal vaccines. **Vaccine**, 23, 2214-2217, 2005.
- GRANOFF, D.M., GUPTA, R.K., BELSHE, R.B. & ANDERSON, E.L. Induction of immunologic refractoriness in adults, by meningococcal C polysaccharide vaccination. **J. Infect. Dis.**, 178, 870-874, 1998.
- GRANOFF, D., MORGAN, A. & WELSCH, A. Persistence of group C anticapsular antibodies two to three years after immunization with an investigational quadrivalent *Neisseria meningitidis*-diphtheriae toxoid conjugate vaccine. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, 24, 132-136, 2005.
- GREENFIELD, S., SHEEHE, P.R. & FELDMAN, H.A. Meningococcal carriage in a population of "normal" families. **J. Infect. Dis.**, 123, 67-73, 1971.
- GRIFFISS, J.M., YAMASAKI, R., ESTABROOK, M. & KIM, J.J. Meningococcal molecular mimicry and the search for an ideal vaccine. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 85, 32-36, 1991.

GRIFFISS, J.M. Mechanisms of host immunity. In: **Meningococcal Disease**. Cartwright, K. (Ed.), Chichester, John Wiley & Sons, 1995. p.35-70.

GUPTA, R.K., RELYVELD, E.H., LINDBLAD, E.B., BIZZINI, B., BEN-EFRAIN, S. & GRUPTA, C.K. Adjuvants – a balance between toxicity and adjuvanticity. **Vaccine**, 11, 293-306, 1993.

GUPTA, R.K. & SIBER, G.R. Adjuvants for human vaccines – current status, problems and future prospects. **Vaccine**, 13, 1263-1276, 1995.

HAMMARLUND, E., LEWIS, M.W., HANSEN, S.G., STRELOW, L.I., NELSON, G.J., SEXTON, J.M., HANIFIN, J.M. & SLIFKA, M.K. Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination. **Nat. Med.**, 9, 1131-1137, 2003.

HARRIS, S.L., FINN, A. & GRANOFF, D.M. Disparity in functional activity between serum anticapsular antibodies induced in adults by immunization with an investigational group A and C *Neisseria meningitidis*-diphtheria toxoid conjugate vaccine and by a polysaccharide vaccine. **Infect. Immun.** 71, 3402-3408, 2003.

HERMANSON, G.T. **Bioconjugates Techniques**, San Diego, California, USA, Academic Press, Inc., 1996.

HIMMELMANN, A.; GAUTSCHI, O.; NAWRATH, M.; BOLLIGER, U.; FEHR, J. & STAHEL, R.A. Persistent polyclonal B-cell lymphocytosis is an expansion of functional IgD+CD27+ memory B cells. **Brit. J. Haematol.**, 114, 400-405, 2001.

HO, M.M., BOLGIANO, B. & CORBEL, M.J. Assessment of the stability and immunogenicity of meningococcal oligosaccharide C-CRM197 conjugate vaccines. **Vaccine**, 19, 716-725, 2001.

HO, M.M., MAWAS, F., BOLGIANO, B., LEMERCINIER, X., CRANE, D.T., HUSKISSON, R. & CORBEL, M.J. Physico-chemical and immunological examination of the thermal stability of tetanus toxoid conjugate vaccines. **Vaccine**, 3337, 1-14, 2002.

HOUGS, L., JUUL, L., DITZEL, H.J., HEILMANN, C., SVEJGAARD, A. & BARINGTON, T. The first dose of a *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine

reactivates memory B cells: evidence for extensive clonal selection, intraclonal affinity maturation, and multiple isotype switches to IgA2. **J. Immunol.**, 162, 224-237, 1999.

HYLAND, L., SANGSTER, M., SEALY, R. & COLECLOUGH, C. Respiratory virus infection of mice provokes a permanent humoral immune response. **J. Virol.**, 68, 6083-6086, 1994.

INFANTE, J.F., MAYO, J.E., SIFONTES, S., PEDROSO, E., MUNOZ, E., FARINAS, M., GUTIÉRREZ, M., OCHOA, R., MARTINEZ, J.C., ANNET, A. & CAMARAZA, M.A. Estudio serológico y de protección en ratones utilizando diferentes esquemas y dosis de VA-MENGOC-BC. **VacciMonitor**, 2, 13-18, 2001.

IWAKI, M., KOMIYA, T., FUKUDA, T., ARAKAWA, Y. & TAKAHASHI, M. Collaborative study: Standardization of Japanese reference diphtheria and tetanus toxoid, (adsorbed, lot 2), for potency determination of diphtheria-tetanus-acellular pertussis combined vaccine. **Jpn. J. Infect. Dis.**, 56, 183-185, 2003.

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

JESSOUROUN, E. **Obtenção de antígenos não-capsulares de *Neisseria meningitidis* sorogrupo B prevalente no Brasil e avaliação do seu potencial vacinal em camundongos suíços.** 2001. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2001.

JESSOUROUN, E., SILVEIRA, I.A.F.B., LARANJEIRA, A.P., PEREIRA, S., FERNANDES, S.A., RABINOVITCH, FRASCH, C.E., CASTRO-FARIA-NETO, H.C. & BOZZA, P.T. Outer membrane vesicles (OMVs) and detoxified lipooligosaccharide (dLOS) obtained from Brazilian prevalent *N. meningitidis* serogroup B strains protect mice against homologous and heterologous meningococcal infection and septic shock. **Vaccine**, 22, 2617-2625, 2004.

JÓDAR, L., CARTWRIGHT, K. & FEAVERS, I.M. Standardization and validation of serological assays for the evaluation of immune responses to *Neisseria meningitidis* serogroup A and C vaccines. **Biologicals**, 28, 193-197, 2000.

JÓDAR, L., GRIFFITHS, E. & FEAVERS, I.M. Scientific challenges for the quality control and production of group C meningococcal conjugate vaccines. **Vaccine**, 22, 1047-1053, 2004.

JOKHDAR, H., BORROW, R., SULTAN, A., ADI, M., RILEY, C., FULLER, E. & BAXTER, D. Immunologic hyporesponsiveness to serogroup C but not serogroup A following repeated meningococcal A/C polysaccharide vaccination in Saudi Arabia. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, 11, 83-88, 2003.

JONES, D.M. & ELDRIDGE, J. Development of antibodies to meningococcal protein and lipopolysaccharide antigens in healthy carriers. **J. Med. Microbiol.**, 12, 1077-1100, 1979.

JONES, C., CRANE, D.T., LEMERCINIER, B., BOLGIANO, B. & YOST, S.E. Physicochemical studies of the structure and stability of polysaccharide-protein conjugate vaccines. **Dev. Biol. Stand. Basel Karger**, 87, 143-151, 1996.

JONES, C. & LEMERCINIER, X. Use and validation of NMR assays for the identity and O-acetyl content of capsular polysaccharides from *Neisseria meningitidis* used in vaccine manufacture. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, 30, 1233-1247, 2002.

JOSEPH, H., RYALL, R., BYBEL, M., PAPA, T., MACLENNAN, J., BUTTERY, J. & BORROW, R. Immunogenicity and immunological priming of the serogroup A portion of a bivalent meningococcal A/C conjugate vaccine in 2-year-old children. **J. Infect. Dis.**, 187, 1142-1146, 2003.

JOSEPH, H., BALMER, P., BYBEL, M., PAPA, T., RYALL, R. & BORROW, R. Assignment of *Neisseria meningitidis* serogroups A, C, W135, and Y anticapsular total immunoglobulin G (IgG), IgG1, and IgG2 concentrations to reference sera. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, 11, 1-5, 2004.

JUMEL, K., HO, M.M. & BOLGIANO, B. Evaluation of meningococcal C oligosaccharide conjugate vaccines by size-exclusion chromatography/multi-angle laser light scattering. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, 36, 219-226, 2002.

KABAT, E.A., KAISER, H. & SIKORSKI, H. Preparation of the type-specific polysaccharide of the type I meningococcus and a study of its effectiveness as an antigen in human beings. **J. Exp. Med.**, 80, 299-307, 1945.

KATZ, D.H., PAUL, W.E., GOIDL, E.A., BENACERRAF, B. Carrier function in anti-hapten immune responses. I. Enhancement of primary and secondary anti-hapten antibody responses by carrier preimmunization. **J. Exp. Med.**, 132, 261-282, 1970.

KELLY, D.F., POLLARD, A.J. & MOXON, E.R. Immunological memory. The role of B cells in long-term protection against invasive bacterial pathogens. **JAMA**, 294, 3019-3023, 2005.

KELLY, D.F., SNAPE, M.D., CUTTERBUCK, E.A., GREEN, S., SNOWDEN, C., DIGGLE, L., YU, LY-MEE, BORKOWSKI, A., MOXON, E.R & POLLARD, A.J. CRM197-conjugated serogroup C meningococcal capsular polysaccharide, but not the native polysaccharide, induces persistent antigen-specific memory B cells. **Blood**, 108, 2642-2647, 2006.

KELSO, A. Th1 and Th2 subsets: paradigms lost? **Immunol. Today**, 16, 374-379, 1995.

KEYSERLING, H., KORANYI, K., PAPA, T., BYBEL, M., RYALL, R. Persistence of immune response and duration of memory from a meningococcal (groups A, C, Y, W135) polysaccharide diphtheriae toxoid conjugate vaccine (MCV-4). **Pediatric Academic Societies. Pediatric Res.**, Abstract 75013, 2005.

KLEIN, U., RAJEWSKY, K. & KÜPPERS, R. Human immunoglobulin (Ig)M⁺IgD⁺ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. **J. Exp. Med.**, 188, 1679-1689, 1998.

KNAPP, L.S. & RICE, R.J. *Neisseria* and *Branhamella*. In: Manual of Clinical Microbiology. Sixth edition, Murray, PR (Ed.), ASM press, 1995.

KOPPEL, G.M., ELLENBOGEN, C., GEBHART, R.J. Group Y meningococcal disease in United States Air Force recruits. **Am. J. Med.**, 62, 661-666, 1977.

LANZAVECCHIA, A. Antigen-specific interaction between T and B cells. **Nature**, 314, 537-539, 1985.

LANZAVECCHIA, A. Antigen presentation by B lymphocytes: a critical step in T-B collaboration. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, 130, 65-78, 1986.

LEACH, A., TWUMASI, P.A., KUMAH, S., BANYA, W.S., JAFFAR, S., FORREST, B.D., GRANOFF, D.M., LIBUTTI, D.E., CARLONE, G., PAIS, L.B., BROOME, C.V. & GREENWOOD, B.M. Induction of immunologic memory in Gambian children by vaccination in infancy with a group A plus group C meningococcal polysaccharide-protein conjugate vaccine. **J. Infect. Dis.**, 175, 200-204, 1997.

LEE CHE-H R, FRASCH CE. National Institute of Health. Polysaccharide-protein conjugate vaccines. Patent pending, US 60/493, 389; WO 2005/014,037 A2, 2005.

LEES, A., SEN, G. & LOPEZACOSTA, A. Versatile and efficient synthesis of protein-polysaccharide conjugate vaccines using aminoxy reagents and oxime chemistry. **Vaccine**, 24, 716-729, 2006.

LEI, Q.P., SHANNON, A.G., HELLER, R.K. & LAMB, D.H. Quantification of free polysaccharide in meningococcal polysaccharide-diphtheria toxoid conjugate vaccines. **Dev. Biol. Basel, Karger**, 103, 259-264, 2000.

LEMERCINIER, X. & JONES, C. Full ¹H NMR assignment and detailed O-acetylation patterns of capsular polysaccharides from *Neisseria meningitidis* used in vaccine production. **Carbohydr. Res.**, 296, 83-96, 1996.

LEMERCINIER, X., JONES, C., CORBEL, M.J. & POST, S.E. Analytical procedures used in the control of bacterial glycoconjugate vaccines. **Pharm. Sci.**, 3, 19-23, 1997.

LETENDRE, E.D. & HOLBEIN, B.E. Turnover in the transferrin iron pool during the hypoferremic phase of experimental *Neisseria meningitidis* infection in mice. **Infect. Immun.**, 39, 50-59, 1983.

LIEBERMAN, J., SHIU, S., WONG, V. et al. Safety and immunogenicity of a serogroups A/C *Neisseria meningitidis* oligosaccharide-protein conjugate vaccine in small children – a randomized controlled trial. **JAMA**, 275, 1499-1503, 1996.

LUCAS, A.H., MOULTON, K.D., TANG, V.R. & REASON, D.C. Combinatorial library cloning of human antibodies to *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharides: variable region primary structures and evidence for somatic mutation of Fab fragments specific for capsular serotypes 6B, 14, and 23F. **Infect. Immun.**, 69, 853-864, 2001.

MACDONALD, N.E., HALPERIN, S.A., LAW, B.J., FORREST, B., DANZIG, L.E. & GRANOFF, D.M. Induction of immunologic memory by conjugated vaccine in toddlers – A randomized controlled trial. **J. Amer. Med. Ass.**, 280, 1685-1689, 1998.

MACLENNAN, J., OBARO, S., DEEKS, J., WILLIAMS, D., PAIS, L., CARLONE, G., MOXON, R. & GREENWOOD, B. Immune response to revaccination with meningococcal A and C polysaccharides in Gambian children following repeated immunization during early childhood. **Vaccine**, 17, 3086-3093, 1999.

MACLENNAN, J., SHACKLEY, F., HEATH, P.T., DEEKS, J.J., FLAMANK, C., HERBERT, M., GRIFFITHS, H., HATZMANN, E., GOILAV, C. & MOXON, E.R. Safety, immunogenicity, and induction of immunologic memory by a serogroup C meningococcal conjugate vaccine in infants. A randomized controlled trial. **JAMA**, 283, 2795-2801, 2000.

MACLENNAN, J., OBARO, S., DEEKS, J., LAKE, D., ELIE, C., CARLONE, G., MOXON, E.R. & GREENWOOD, B. Immunologic memory five years after meningococcal A/C conjugate vaccination in infancy. **J. Infect. Dis.**, 183, 97-104, 2001.

MAIDEN, M.C.J. & STUART, J.M. Carriage of serogroup C meningococci 1 year after meningococcal C conjugate polysaccharide vaccination. **Lancet**, 359, 1829-1830, 2002.

MÄKELÄ, P.H., KÄYHTY, H., LEINO, T., AURANEN, K., PELTOLA, H., EKSTRÖM, N. & ESKOLA, J. Long-term persistence of immunity after immunization with *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine. **Vaccine**, 22, 287-292, 2003.

MANZ, R.A., HAUSER, A.E., HIEPE, F. & RADBRUCH. Maintenance of serum antibody levels. **Annu. Rev. Immunol.**, 23, 367-386, 2005.

MAWAS, F., FEAVERS, I.M. & CORBEL, M.J. Serotype of *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide can modify the Th1/Th2 cytokine profile and IgG subclass response to pneumococcal-CRM₁₉₇ conjugate vaccines in a murine model. **Vaccine**, 19, 1159-1166, 2001.

MBELLE, N., WASAS, A., HUEBNER, KIMURA, A., CHANG, I. & KLUGMAN, K. J. Immunogenicity and impact on nasopharyngeal carriage of a nonavalent pneumococcal conjugate vaccine. **Infect. Dis.**, 180, 1171-1176, 1999.

McCLOSKEY, N., TURNER, M.W., GOLDBLATT, T.D. Correlation between the avidity of mouse-human chimeric IgG subclass monoclonal antibodies measured by solid-phase elution ELISA and biospecific interaction analysis (BIA). **J. Immunol. Methods**, 205, 67-72, 1997.

McHEYZER-WILLIAMS, L.J. & McHEYZER-WILLIAMS, M.G. Antigen-specific memory B cell development. **Annu. Rev. Immunol.**, 23, 487-513, 2005.

McVERNON, J., MacLENNAN, J., BUTTERY, J. et al. Safety and immunogenicity of meningococcus serogroup C conjugate vaccine administered as a primary or booster vaccination to healthy four-year-old children. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, 21, 747-753, 2002.

McVERNON, J., ANDRWES, N., SLACK, M.P. & RAMSAY, M.E. Risk of vaccine failure after *Haemophilus influenzae* type b (Hib) combination vaccines with acellular pertussis. **Lancet**, 361, 1521-1523, 2003.

MEDZHITOV, R. & JANEWAY JR, C. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. **Immunol. Rev.**, 173, 89-97, 2000.

MEIKLEJOHN, D.A., KARLSSON, R.K., KARLSSON, A.C., CHAPMAN, J.M., NIXON, D.F. & SCHWEIGHARDT, B. ELISPOT cell rescue. **J. Immunol. Methods**, 288, 135-147, 2004.

MEKORI, Y.A. & METCALFE, D.D. Mast cells in innate immunity. **Immunol. Rev.**, 173, 131-140, 2000.

MELTZER, U. & GOLDBLATT, D. Pneumococcal polysaccharides interact with human dendritic cells. **Infect. Immun.**, 74, 1890-1895, 2006.

MERCK. Manual do Fabricante, Kit Spectroquant.

MILAGRES, L.G., RAMOS, S.R., SACCHI, C.T., MELLES, C.E., VIEIRA, V.S., SATO, H., BRITO, G.S., MORAES, J.C. & FRASCH, C.E. Immune response of Brazilian children to a *Neisseria meningitidis* serogroup B outer membrane protein vaccine: Comparison with efficacy. **Infect. Immun.**, 62, 4419-4424, 1994.

MILLER, E., SALISBURY, D. & RAMSAY, M. Planning, registration, and implementation of an immunization campaign against meningococcal serogroup C disease in the UK: a success story. **Vaccine**, 20, Suppl. 1, S58-67, 2002.

MIRLASHARI, M.R.; HAGBERG, I.A. & LYBERG, T. Platelet-platelet and platelet-leukocyte interactions induced by outer membrane vesicles from *N. meningitidis*. **Platelets**, 13, 91-99, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, CENEPI.
Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Informes Técnicos Institucionais, Brazil, 2005.

MITCHISON, N.A. The carrier effect in the secondary response to hapten-protein conjugates. I. Measurement of the effect with transferred cells and objections to the local environment hypothesis. **Eur. J. Immunol.**, 1, 10-17, 1971.

MOND, J.J., LEES, A. & SNAPPER, C.M. T cell-independent antigens type 2. **Annu. Rev. Immunol.**, 13, 655-692, 1995.

MOORE, P.S. Meningococcal meningitidis in Sub-Saharan Africa: a model for the epidemic process. **Clin. Infect. Dis.**, 14, 515-525, 1992.

MOSIER, D.E., ZITRON, I.M., MOND, J.J., AHMED, A., SCHER, I & PAUL, W.E. Surface immunoglobulin D as functional receptor for a subclass of B lymphocytes. **Immunol. Rev.**, 37, 89-104, 1977.

MUTHUKKUMAR, S. & STEIN, K.E. Immunization with meningococcal polysaccharide-tetanus toxoid conjugate induces polysaccharide-reactive T cells in mice. **Vaccine**, 22, 1290-1299, 2004.

NELSON, R.S., MORIN, C.A., CARTER, M.L., MSHAR, P., HADLER, J.L. & BECKETT, G. Meningococcal disease – New England 1993-1998. **MMWR**, 48, 629-633, 1999.

NEUBERGER, S. & RAJEWSKY, K. Switch from hapten-specific immunoglobulin M to immunoglobulin D secretion in a hybrid mouse cell line. **PNAS**, 78, 1138-1142, 1981.

NORONHA, C.P.; STRUCINER, C.J. & HALLORAN, M.E. Assessment of the direct effectiveness of BC meningococcal vaccine in Rio de Janeiro, Brazil: a case control study. **Int. J. Epidemiol.**, 24, 1050-1057, 1995.

OBARO, S.K., ADEGBOLA, R.A., BANYA, W.A.S. & GREENWOOD, B.M. Carriage of pneumococci after pneumococcal vaccination. **Lancet**, 348, 271-272, 1996.

OBARO, S.K. Confronting the pneumococcus: a target shift or bullet change? **Vaccine**, 19, 1211-1217, 2001.

PALL LIFE SCIENCES, SCIENTIFIC & TECHNICAL REPORT. Introduction to tangential flow filtration for laboratory and process development applications.

PARK C-Y, JUNG S-H, BAK J-P, LEE S-S, RHEE D-K. Comparison of the rabbit pyrogen test and Limulus amoebocyte lysate (LAL) assay for endotoxin in hepatitis B vaccines and the effect of aluminum hydroxide. **Biologicals**, 33, 145-151, 2005.

PAWLOWSKI, A., KÄLLENIUS, G. & SVENSON, S.B. Preparation of pneumococcal capsular polysaccharide-protein conjugate vaccines utilizing new fragmentation and conjugation technologies. **Vaccine**, 18, 1873-1885, 2000.

PAUL, W.E., SISKIND, G.W. & BENACERRAF, B. Studies on the effect of the carrier molecule on antihapten antibody synthesis. II. Carrier specificity of anti-2,4-dinitrophenyl-poly-l-lysine antibodies. **J. Exp. Med.**, 123, 689-705, 1966.

PEETERS, C.C.A.M., TENBERGEN-MEEKES, A.-M.J., POOLMAN, J.T., ZEGERS, B.J.M. & RIJKERS, G.T. Immunogenicity of a *Streptococcus pneumoniae* type 4 polysaccharide-protein conjugate vaccine is decreased by admixture of high doses of free saccharide. **Vaccine**, 10, 833-840, 1992.

PELTOLA, H. Meningococcal disease: still with us. **Review Infect. Dis.**, 5, 71-91, 1983.

PELTOLA, H. Worldwide *Haemophilus influenzae* type b disease at the beginning of the 21st century: Global analysis of the disease burden 25 years after the use of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates. **Clin. Microbiol. Rev.**, 13, 302-317, 2000.

PÉREZ-MELGOSA, M., OCHS, H.D., LINSLEY, P.S., LAMAN, J.D., VAN MEURS, M., FLAVELL, R.A., ERNST, R.K., MILLER, S.I. & WILSON, C.B. Carrier-mediated enhancement of cognate T cell help: the basis for enhanced immunogenicity of meningococcal outer membrane protein polysaccharide conjugate vaccine. **Eur. J. Immunol.**, 31, 2373-2381, 2001.

PETTERSSON, A., POOLMAN, J.T., VAN DER LEY, P. & TOMMASSEN, J. Response of *Neisseria meningitidis* to iron limitation. **Antonie Van Leeuwenhoek**, 71, 129-136, 1997.

PICHICHERO, M.E. Meningococcal conjugate vaccines. **Expert Opin. Biol. Ther.**, 5, 1475-1489, 2005.

PICHICHERO, M.E., CASEY, J., BLATTER, M. et al. Comparative trial of the safety and immunogenicity of quadrivalent (A, C, Y, W-135) meningococcal polysaccharide-diphtheriae conjugate vaccine versus quadrivalent polysaccharide vaccine in two- to ten-year-old children. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, 24, 57-62, 2005.

PLUMB, J.E. & YOST, S.E. Molecular size characterization of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-protein conjugate vaccines. **Vaccine**, 14, 399-404, 1996.

POLLARD, A.J., GALASSINI, R., VAN DER VOORT, E.M.R., BOOY, R., LANGFORD, P., NADEL, S., ISON, C., KROLL, J.S., POOLMAN, J. & LEVIN, M. Humoral immune response to *Neisseria meningitidis* in children. **Infect. Immun.**, 67, 2441-2451, 1999a.

POLLARD, A.J., GALASSINI, R., ROUPPE, E.M., VAN DER VOORT, E.M.R., HIBBERD, M., BOOY, R., LANGFORD, P., NADEL, S., ISON, C., KROLL, J.S., POOLMAN, J. & LEVIN, M. Cellular immune response to *Neisseria meningitidis* in children. **Infect. Immun.**, 67, 2452-2463, 1999b.

POLLARD, A.J. & FRASCH, C.E. Development of natural immunity to *Neisseria meningitidis*. **Vaccine**, 19, 1327-1346, 2001.

POLLARD, A.J. Global epidemiology of meningococcal disease and vaccine efficacy. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, 23, S274-S279, 2004.

PON, R.A., LUSSIER, M., YANG, K-L. & JENNINGS, H.J. N-proponylated group B meningococcal polysaccharide mimics a unique bactericidal capsular epitope in group B *Neisseria meningitidis*. **J. Exp. Med.**, 185, 1929-1938, 1997.

POOLMAN, J.T. Development of a meningococcal vaccine. **Infect. Agents Dis.**, 4, 13-28, 1995.

POOLMAN, J.T., HOPMAN, C.T.P. & ZANEM, H.C. Immunogenicity of meningococcal antigens as detected in patient sera. **Infect. Immun.**, 40, 383-406, 1983.

POOLMAN, J.T. VAN DER LEY, P.A. & TOMMASSEN, J. Surface structures and secreted products of meningococci. In: **Meningococcal Disease**. Cartwright, K. (Ed.), Chichester, John Wiley & Sons, 1995. p.21-34.

PRESTON, A., MANDRELL, R.E., GIBSON, B.W. & APICELLA, M.A. The lipoolygosaccharides of pathogenic Gram-negative bacteria. **Crit. Rev. Microbiol.**, 22, 139-180, 1996.

PUUMALAINEN, T., EKSTROM, N., ZETA-CAPEDING, R., OLLGREN, J., JOUSIMIES, K., LUCERO, M., NOHYNEK, H. & KAYHTY, H. Functional antibodies elicited by an 11-valent diphtheria-tetanus toxoid-conjugated pneumococcal vaccine. **J. Infect. Dis.**, 187, 1704-1708, 2003.

QUAKYI, E.K., CARTER, P.H., TSAI, C.M. & MARTI, G.E. Immunization with meningococcal membrane-bound lipoolygosaccharide accelerates granulocyte recovery and enhances lymphocyte proliferation in myelosuppressed mice. **Pathobiology**, 65, 26-38, 1997.

QUENSENBERRY, M.S. & LEE, Y.C. A rapid formaldehyde assay using Purpald Reagent: Application under periodation conditions. **Anal. Biochem.**, 234, 50-55, 1996.

RAPPUOLI, R. Conjugates and reverse vaccinology to eliminate bacterial meningitis. **Vaccine**, 19, 2319-2322, 2001.

RAMSAY, M., KACZMARSKI, E., RUSH, M., MALLARD, R. & FARRINGTON, P. Changing patterns of case ascertainment and trends in meningococcal disease in England and Wales. **Commun. Dis. Rep. CDR Rev.**, 7, R49-54, 1997.

RAMSAY M.E., ANDREWS N., KACZMARSKI E.B., MILLER E. Efficacy of meningococcal serogroup C conjugate vaccine in teenagers and toddlers in England. **Lancet**, 357, 195-196, 2001.

RAMSAY M.E., ANDREWS N., TROTTER C. et al. Herd immunity from meningococcal serogroup C conjugate vaccination in England: database analysis. **Br. Med. J.**, 326, 365-366, 2003.

RICCI, S.; BARDOTTI, A.; D'ASCENZI, S. & RAVENSCROFT, N. Development of a new method for the quantitative analysis of the extracellular polysaccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup A by use of high-performance anion-exchange chromatography with pulsed-amperometric detection. **Vaccine**, 19, 1989-1997, 2001.

RICHMOND, P., BORROW, R., MILLER, E., CLARK, S., SADLER, F., FOX, A., BEGG, N., MORRIS, R. & CARTWRIGHT, K. Meningococcal serogroup C conjugate vaccine is immunogenic in infancy and primes for memory. **J. Infect. Dis.**, 179, 1569-1572, 1999.

RICHMOND, P., KACZMARSKI, E., BORROW, R., FINDLOW, J., CLARK, S., MCCANN, R., HILL, J., BARKER, M. & MILLER, E. Meningococcal C polysaccharide vaccine induces immunologic hyporesponsiveness in adults that is overcome by meningococcal C conjugate vaccine. **J. Infect. Dis.**, 181, 761-764, 2000.

RICHMOND, P., BORROW, R., FINDLOW, J., MARTIN, S., THORNTON, C., CARTWRIGHT, K. & MILLER, E. Evaluation of de-o-acetylated meningococcal C polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine in infancy: reatogenicity, immunogenicity, immunologic priming, and bactericidal activity against o-acetylated and de-o-acetylated serogroup C strains. **Infect. Immun.**, 69, 2378-2382, 2001a.

RICHMOND, P., BORROW, R., GOLDBLATT, D., FINDLOW, J., MARTIN, S., MORRIS, R., CARTWRIGHT, K. & MILLER, E. Ability of 3 different meningococcal C conjugate vaccines to induce immunologic memory after a single dose in UK toddlers. **J. Infect. Dis.**, 183, 160-163, 2001b.

RICHTER, M.Y., JAKOBSEN, H., BIRGISDOTTIR, A., HAEUW, J-F., POWER, U.F., GIUDICE, G., BARTOLONI, A. & JONSDOTTIR, I. Immunization of female mice with glycoconjugates protects their offspring against encapsulated bacteria. **Infect. Immun.**, 72, 187-195, 2004.

RIEDO, F.X., PLIKAYTIS, B.D. & BROOME, C.V. Epidemiology and prevention of meningococcal disease. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 14, 643-657, 1995.

ROBINSON, K., NEAL, K.R., HOWARD, C., STOCKTON, J., ATKINSON, K., SCARTH, E., MORAN, J., ROBINS, A., TODD, I., KACZMARSKI, E., GRAY, S., MUSCAT, I., SLACK, R. & ALA'ALDEEN, A.A. Characterization of humoral and cellular immune responses elicited by meningococcal carriage. *Infect. Immun.*, 70, 1301-1309, 2002.

ROSENSTEIN, N.E., PERKINS, B.A., & STEPHENS, D.S. The changing epidemiology of meningococcal disease in the United States, 1992-1996. *J. Infect. Dis.*, 180, 1894-1901, 1999.

ROSENSTEIN, N.E., PERKINS, B.A., STEPHENS, D.S., POPOVIC, T. & HUGHES, J.M. Meningococcal Disease. *N. Engl. J. Med.*, 344, 1378-1388, 2001.

ROSTAING, L., TKACZUK, J., DURAND, M., PERES, C., DURAND, D., DE PRÉVAL, C., OHAYON, E. & ABBAL, M. Kinetics of intracytoplasmic Th1 and Th2 cytokine production assessed by flow cytometry following in vitro activation of peripheral blood mononuclear cells. *Cytometry*, 35, 318-328, 1999.

ROSS, S.C. & DENSEN, P. Complement deficiency states and infection: epidemiology, pathogenesis and consequences of neisserial and other infections in an immune deficiency. *Medicine (Baltimore)*, 63, 243-273, 1984.

ROSS, S.C., ROSENTHAL, P.J., BERBERICH, H.M. & DENSEN, P. Killing of *Neisseria meningitidis* by human neutrophils: implications for normal and complement deficient individuals. *J. Infect. Dis.*, 155, 1266-1275, 1987.

RUBINSTEIN, L.J. & STEIN, K.E. Murine immune response to the *Neisseria meningitidis* group C capsular polysaccharide. I. Ontogeny. *J. Immunol.*, 141, 4352-4356, 1988a.

RUBINSTEIN, L.J. & STEIN, K.E. Murine immune response to the *Neisseria meningitidis* group C capsular polysaccharide. I. Specificity. *J. Immunol.*, 141, 4357-4362, 1988b.

RUBINSTEIN, L.J., GARCÍA-OJEDA, P.A., MICHON, F., JENNINGS, H.J. & STEIN, K.E. Murine immune responses to *Neisseria meningitidis* group C capsular polysaccharide and a thymus-dependent toxoid conjugate vaccine. **Infect. Immun.**, 66, 5450-5456, 1998.

SABIROV, A. & METZGER, D.W. Intranasal vaccination of neonatal mice with polysaccharide conjugate vaccine for protection against pneumococcal otitis media. **Vaccine**, 24, 5584-5592, 2006.

SACCHI, C.T., PESSOA, L.L., RAMOS, S.R., MILAGRES, L.G., CAMARGO, M.C.C., HIDALGO, N.T., MELLES, C.E.A., CAUGANT, D.A. & FRASCH, C.E. Ongoing group B *Neisseria meningitidis* epidemic in São Paulo, Brazil, due to increased prevalence of a single clone of the ET-5 complex. **J. Clin. Microbiol.**, 30, 1734-1738, 1992.

SACCHI, C.T. **Caracterização genética e padronização do sistema de classificação das proteínas de membrana externa PorA**. Rio de Janeiro, 2000. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Curso de Biologia Celular e Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, 2000.

SALLERAS, I., DOMINGUEZ, A., CARDENOZA, N. Impact of mass vaccination with polysaccharide conjugate vaccine against serogroup C meningococcal disease in Spain. **Vaccine**, 21, 725-728, 2003a.

SALLERAS, I., DOMINGUEZ, A., CARDENOZA, N. Dramatic decline of serogroup C meningococcal disease in Catalonia (Spain) after a mass vaccination campaign with meningococcal C conjugated vaccine. **Vaccine**, 21, 729-733, 2003b.

SALLUSTO, F., LENIG, D., FÖRSTER, R., LIPP, M. & LANZAVECCHIA, A. 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. **Nature**, 401:708-712.

SANTOS, G.F., DECK, R.R., DONNELLY, J., BLACKWELDER, W. & GRANOFF, D.M. Importance of complement source in measuring meningococcal bactericidal titers. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, 8, 616-623, 2001.

SAXENA, M. & DI FABIO, J.L. Effect of adjuvants on immunogenicity of a *Salmonella typhi* O-polysaccharide-tetanus toxoid conjugate. **Vaccine Res.**, 2, 207-214, 1993.

SAXENA, M. & DI FABIO, J.L. *Salmonella typhi* O-polysaccharide-tetanus toxoid conjugated vaccine. **Vaccine**, 12, 879-884, 1994.

SCHERP, H.W. & RAKE, G. Studies on meningococcal infection. XIII. Correlation between antipolysaccharide and the antibody which protects mice against infection with type I meningococci. **J. Exp. Med.**, 81, 85-92, 1945.

SCHNNERSON, R., BARRERA, O., SUTTON, A. & ROBBINS, J.B. Preparation, characterization and immunogenicity of Haemophilus influenzae type b polysaccharide-protein conjugates. **J. Exp. Med.**, 152, 361-376, 1980.

SCHWARTZ, B., MOORE, P.S. & BROOME, C.V. Global epidemiology of meningococcal disease. **Clin. Microbiol. Rev.**, 2, Suppl. S118-S124, 1989.

SEDGWICK, J.D. & HOLT, P.G. A solid-phase immunoenzymatic technique for the enumeration of specific antibody-secreting cells. **J. Immunol. Methods**, 57, 301-309, 1983.

SIERRA, G.V.G., CAMPA, H.C., VARCACEL, N.W., GARCIA, I.L., IZQUIERDO, P.L., SOTOLONGO, P.F., CASANUEVA, G.V., RICO, C.O., RODRIGUEZ, C.R. & TERRY, M.H. Vaccine against group B *Neisseria meningitidis*: protection-trial and mass vaccination results in Cuba. **NIPH Ann.**, 14, 195-207, 1991.

SIFONTES, S., INFANTE, J.F., PEREZ, P., CARO, E., SIERRA, G. & CAMPA, C. The hyperferremic mouse model for the evaluation of the effectiveness of VA-MENGOC-BC against *Neisseria meningitidis* B clinical isolates. **Arch. Med. Res.**, 28, 41-5, 1997.

SIKKEMA, D.J., FRIEDMAN, K.E., CORSARO, B., KIMURA, A., HILDRETH, S.W., MADORE, D.V. & QUATAERT, S.A. Relationship between serum bactericidal activity and serogroup-specific immunoglobulin G concentration for adults, toddlers, and infants immunized with *Neisseria meningitidis* serogroup C vaccines. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, 7, 764-768, 2000.

SILVEIRA, I.A.F.B., JESSOURON, E., BASTOS, R.C., FRASCH, C.E. & LEE, CHE-H R., FRASCH CE. National Institute of health. Process for preparing polysaccharide-protein conjugate vaccines. International Publication WO 2005/037320, 2005.

SINAN/SVS/MS - Sistema Nacional de Agravos Notificáveis, Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, **Rev. Saúde Pública**, 39, 139-140, 2005.

SJURSEN, H., WEDEGE, E., ROSENQVIST, E., NAESS, A., HALSTENSEN, A., MATRE, R. & SOLBERG C.O. IgG subclass antibodies to serogroup B meningococcal outer membrane antigens following infection and vaccination. **APMIS**, 98, 1061-1069, 1990.

SLIFKA, M.K., ANTIA, R., WHITMIRE, J.K. & AHMED, R. Humoral immunity due to long-lived plasma cells. **Immunity**, 8, 363-372, 1998.

SMITH, K.G.C., LIGHT, A., NOSSAL, G.J.V. & TARLINTON, D.M. The extent of affinity maturation differs between the memory and antibody-forming cell compartments in the primary immune response. **EMBO J.**, 16, 2996-3006, 1997.

SNAPE M.D. & POLLARD A.J. Meningococcal polysaccharide-protein conjugate vaccines. **Lancet Infect. Dis.**, 5, 21-30, 2005.

SNAPPER, C.M., ROSAS, F.R., JIN, L., WORTHAM, C., KEHRY, M.R. & MOND, J.J. Bacterial lipoproteins may substitute for cytokines in the humoral immune response to T cell-independent type II antigens. **J. Immunol.**, 155, 5582-5589, 1995.

SNAPPER, C.M., ROSAS, F.R., KEHRY, M.R., MOND, J.J. & WETZLER, L.M. Neisserial porins may provide critical second signals to polysaccharide-activated murine B cells for induction of immunoglobulin secretion. **Infect. Immun.**, 65, 3203-3208, 1997a.

SNAPPER, C.M., ROSAS, F.R., MOORMAN, M.A. & MOND, J.J. Restoration of T cell-independent type 2 induction of Ig secretion by neonatal B cells in vitro. **J. Immunol.**, 158, 2731-2735, 1997b.

STEIN, K.E., ZOPF, D.A., MILLER, C.B., JOHNSON, B.M., MONGINI, P.K.A., AHMED, A. & PAUL, W.E. Immune response to a thymus-dependent form of B512 dextran requires the presence of Lyb5⁺ lymphocytes. **J. Exp. Med.**, 157, 657-666, 1983.

SORIANO-GABARRÓ, M. & WOLTER, J. *Neisseria meningitidis*: Carriage in Africa. **15th International Pathogenic Neisseria Conference (INPC)**, Livro de Resumos, P4.3.06, 2006. p.76

STEPHENS, D.S., HOFFMAN, L.H. & MCGEE, Z.A. Interaction of *Neisseria meningitidis* with human nasopharyngeal mucosa: attachment and entry into columnar epithelial cells. **J. Infect. Dis.**, 148, 369-376, 1983.

STEPHENS, D.S. Uncloaking the meningococcus: dynamics of carriage and disease. **Lancet**, 353, 941-942, 1999.

STEVEN, N. & WOOD, M. The clinical spectrum of meningococcal disease. In: **Meningococcal Disease**. Cartwright, K. (Ed.), Chichester, John Wiley & Sons, 1995. p.177-205.

SVENNERHOLM, L. Quantitative estimation of sialic acids. **Biochim. Biophys. Acta**, 24, 604-611, 1957.

SWARTLEY, J.S., MARFIN, A.A., EDUPUGANTI, S., LIU, L.-J., CIESLAK, P., PERKINS, B., WENGER, J.D. & STEPHENS, D.S. Capsule switching of *Neisseria meningitidis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 94, 271-276, 1997.

SWEET, M. & HUME, D.A. Endotoxin signal transduction in macrophages. **J. Leuk. Biol.**, 60, 8-26, 1996.

TAHA, M.K, GIORGINI, D., DUCOS-GALAND, M. et al. Continuing diversification of *Neisseria meningitidis* W135 as a primary cause of meningococcal disease after emergence of the serogroup in 2000. **J. Clin. Microbiol.**, 42, 4158-4163, 2004.

TARAZONA, M.P. & SAIZ, E. Combination of SEC/MALLS experimental procedures and theoretical analysis for studying the solution properties of macromolecules. **J. Biochem. Biophysical**, 56, 95-116, 2003.

TIMEN A, VAN STEENBERGEN JE. Meningitis group C vaccination campaign in the Netherlands. **Eur. J. Pub. Health**, 12, 22-23, 2002.

TORLING, J., HEDLUND, J., KONRADSEN, H.B. & ORTQVIST, A. Revaccination with the 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine in middle-aged and elderly persons previously treated for pneumonia. **Vaccine**, 22, 96-103, 2003.

TROTTER, C.L., ANDREWS, N.J., KACZMARSKI, E.B. et al. Effectiveness of meningococcal serogroup C conjugate vaccine 4 years after introduction. **Lancet**, 364, 365-367, 2004.

TSAI, J.; DYER, D.W. & SPARLING, F. Loss of transferrin receptor activity in *Neisseria meningitidis* correlates with inability to use transferrin as iron source. **Infect. Immun.**, 56, 3132-3138, 1988.

TSUNASHIMA, Y.; MORO, K.; CHU, B. LIU, T.Y. Characterization of group C meningococcal polysaccharides by light-scattering spectroscopy. III. Determination of molecular weight, radius of gyration and translational diffusion coefficient. **Biopolymers**, 17, 251-265, 1978.

UNKELESS, J.C., SCIGLIANO, E. & FREEDMAN, V.H. Structure and function of human and murine receptors for IgG. **Annu. Rev. Immunol.**, 6, 251-281, 1988.

UPADAHYAY, S. & GUPTA, V.K. Spectrophotometric method for the determination of cyanide and its application to biological fluids. **Analyst**, 109, 1619-1620, 1984.

VASCONCELOS, Z.F., SANTOS, B.M., COSTA, E.S., LIMA, M., TABAK, D.G., BOUZAS, L.F., AZEVEDO, W.M., BARCINSKI, M.A. & BONOMO, A. T-lymphocyte function from peripheral blood stem-cell donors is inhibited by activated granulocytes. **Cytotherapy**, 5, 336-345, 2003.

VASCONCELOS, Z.F., SANTOS, B.M., FARACHE, J., PALMEIRA, T.S.S., AREAL, R.B., CUNHA, J.M.T., BARCINSKI, M.A. & BONOMO, A. G-CSF-treated granulocytes inhibit acute graft-versus-host disease. **Blood**, 107, 2192-2199, 2006.

VEDROS, N.A. genus 1 *Neisseria*. In: **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Krieg, N.R. (Ed), Baltimore, Williams & Wilkins, 1984. p.290-229.

VERHEUL, A.F.M., SNIPPE, H. & POOLMAN, J.T. Meningococcal lipopolysaccharides: virulence factor and potential vaccine component. **Microbiol. Rev.**, 57, 34-49, 1993.

VERMONT, C. & VAN DEN DOBBELSTEEN, G. *Neisseria meningitidis* serogroup B: laboratory correlates of protection. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, 34, 89-96, 2002.

VERMONT, C.L., VAN DIJKEN, H.H., DE GROOT, R., VAN ALPHEN, L., VAN DEN DOBBELSTEEN, G.P.J.M. PorA-specific differences in antibody avidity after vaccination with a hexavalent Men B outer membrane vesicle vaccine in toddlers and school children. **Vaccine**, 22, 3008-3013, 2004.

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

WAGNER, J. & ROTH, R.A. Neutrophil migration during endotoxemia. **J. Leukocyte**, 66, 11-25, 1999.

WANG, J.F., CAUGANT, D.A., LI, X., HU, X., POOLMAN, J.T., CROWE, B.A. et al. Clonal and antigenic analysis of serogroup A *Neisseria meningitidis* with particular reference to epidemiological features of epidemic meningitis in the People's Republic of China. **Infect. Immun.**, 60, 5267-5282, 1992.

WANG, J.F., CAUGANT, D.A., MORELLI, G., KOUMARÉ, B. & ACHTMAN, M. Antigenic and epidemiological properties of ET-37 complex of *Neisseria meningitidis*. **J. Infect. Dis.**, 167, 1320-1329, 1993.

WANG, Y., HUANG, G., WANG, J., MOLINA, H., CHAPLIN, D.D., FU, Y.X. Antigen persistence is required for somatic mutation and affinity maturation of immunoglobulin. **Eur. J. Immunol.**, 30, 2226-2234, 2000.

WANG, J.Y., CHANG, A.H.C., GUTTORMSEN, H-K., ROSAS, A.L. & KASPER, D.L. Construction of designer glycoconjugate vaccines with size-specific oligosaccharide antigens and site-controlled coupling. **Vaccine**, 21, 1112-1117, 2003.

WEINBERG, E.D. Iron and susceptibility to infectious diseases. **Science**, 184, 952-956, 1974.

WEN, J., ARAKAWA, T. & PHILO, J.S. Size-exclusion chromatography with on-line light-scattering, absorbance and refractive index detectors for studying proteins and their interactions. **Anal. Biochem.**, 240, 155-166, 1996.

WETZLER, L.M., HO, Y., REISER, H. & WETZLER, L.W. Neisserial porins induce B lymphocytes to express costimulatory B7-2 molecules and to proliferate. **J. Exp. Med.**, 183, 1151-1159, 1996.

WHALEN, C.M., HOCKIN, J.C., RYAN, A, et al. The changing epidemiology of invasive meningococcal disease in Canada, 1985 through 1992. Emergence of a virulent clone of *Neisseria meningitidis*. **JAMA**, 273, 390-394, 1995.

WIELAND, G. Water determination by Karl Fischer Titration. Theory and Applications. Printed by Git Verlag GMBH, Germany, 1987.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Requirements for meningococcal polysaccharide vaccine. Technical report series, N^o. 658. Geneva: World Health Organization :29, 1981.

_____. Requirements for diphtheria, tetanus, pertussis and combined vaccines. WHO Technical report series N^o. 800. Geneva: World Health Organization, 1990.

_____. Working group. Control of epidemic meningococcal diseases: WHO practical guidelines. Lyon, France: Edition Foundation Marcel Merieux, 1995.

_____. Response to epidemic meningitis in Africa, *Wkly Epidemiol. Rec.*, **42**:313-318, 1997.

_____. Headquarters, Pan american Bureau. Standardization and control of protein-based vaccines against serogroup B meningococcal disease (Draft), Petrópolis, Brazil, 11-12 May, 2000.

_____. Recommendations for the production and control of meningococcal group C conjugate vaccines. WHO Technical Report, Series 924, 2004.

_____. New vaccines against infectious diseases: Research and development status, IVR, April 2005, updated February 2006.

WUORIMAA, T., DAGAN, R., VAKEVAINEN, M., BAILLEUX, F., HAIKALA, R., YAICH, M., ESTOLA, J., KAYHTY, H. Avidity and subclasses of IgG after immunization of infants with an 11-valent pneumococcal conjugate vaccine with or without aluminum adjuvant. **J. Infect. Dis.**, 184, 1211-1215, 2001.

ZOLLINGER, W.D., KASPER, D.L., VETRI, B.J., & ARTENSTEIN, M.S. Isolation and characterization of a native cell wall complex from *Neisseria meningitidis*. **Infect. Immun.**, 6:835-851, 1972.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)