

Secretaria de Saúde do Governo do Estado de São Paulo  
Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP

“Dr. Antônio Guilherme de Souza”

Instituto Butantan

ESTUDO PRELIMINAR DA ESTABILIDADE DE CONJUGADOS DE PRP-  
TT EM TAMPÃO FOSFATO.

Larissa Jéssica Terumy Tanaka

São Paulo/SP  
2019

Larissa Jéssica Terumy Tanaka

ESTUDO PRELIMINAR DA ESTABILIDADE DE CONJUGADOS DE PRP-  
TT EM TAMPÃO FOSFATO.

Monografia de Conclusão do Curso  
de Especialização Biotecnologia para  
a Saúde – Vacinas e Biofármacos do  
Instituto Butantan, sob orientação de  
Giovana Cappio Barazzone.

São Paulo/SP  
2019

### Dados internacionais de catalogação-na-publicação

Tanaka, Larissa Jéssica Terumy

Estudo preliminar da estabilidade de conjugados de PRP-TT em tampão fosfato: / Larissa Jéssica Terumy Tanaka; orientador Giovana Cappio Barazzone. – São Paulo, 2019.

Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização) – Secretaria de Estado da Saúde, Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP “Doutor Antônio Guilherme de Souza” desenvolvido no Instituto Butantan para o Curso de Especialização em Biotecnologia para a Saúde: Vacinas e Biofármacos.

1. Assunto. I. Barazzone, Giovana Cappio. II. Instituto Butantan. III. Curso de Especialização em Biotecnologia para a Saúde: IV. Vacinas e Biofármacos. V. Título.

Secretaria de Saúde do Governo do Estado de São Paulo  
Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP  
"Dr. Antônio Guilherme de Souza"  
Instituto Butantan

**AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO E REPRODUÇÃO DE TRABALHO**

Eu, Larissa F.T. Tanaka, aluno(a) do curso **Biotecnologia para saúde- vacinas e biofármacos**, autorizo a divulgação do meu trabalho de conclusão de curso por mídia impressa eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total deste trabalho de conclusão de curso após publicação, para fins acadêmicos desde que citada a fonte.

Prazo de liberação da divulgação do trabalho de conclusão de curso após a data da avaliação:

Imediato

06 meses

12 meses

Não autorizo a divulgação

Justifique:

São Paulo, 25 de fevereiro de 2019

Larissa Tanaka  
.....  
aluno(a)

De acordo: Giovana Cappia Bonaguidi  
Orientador(a):

## Lista de figuras

Figura 1- Estrutura química do PRP.

Figura 2- Cromatograma do conjugado 40 meses estocado a 4°C. A linha azul representa o conjugado PRP- TT e a linha vermelha representa o PRP-ADH 1.

Figura 3- Cromatograma do conjugado 37 meses estocado a 4°C. A linha azul representa o conjugado PRP- TT e a linha vermelha representa o PRP-ADH 2.

Figura 4- Cromatograma do conjugado 30 meses estocado a 4°C. A linha azul representa o conjugado PRP- TT e a linha vermelha representa o PRP-ADH 3.

Figura 5- Cromatograma mostrando o pico de eluição da fase móvel do HPLC presente em todos os conjugados.

Figura 6- Perfil do conjugado de 40 meses, utilizando o PRP- ADH 1 estoque (linha vermelha), PRP-TT (linha azul) e PRP não conjugado (linha verde).

Figura 7- Perfil do conjugado de 37 meses, PRP- ADH 2 estoque (linha vermelha), PRP-TT (linha azul) e PRP não conjugado (linha verde).

Figura 8- Perfil do conjugado de 30 meses, utilizando o PRP- ADH 3 estoque (linha vermelha), PRP-TT (linha azul) e PRP não conjugado (linha verde).

Figura 9- Curva padrão feita com Ribose pelo método Orcinol

Figura 10 - Curva padrão utilizando a Albumina pelo micro método de Bradford.

Tabela 1 – Quantificação do conteúdo de PRP (método orcinol).

Tabela 2- Quantificação do conteúdo de proteína (método Bradford).

Tabela 3- Avaliação da despolimerização do PRP.

## Resumo

A bactéria do gênero *Haemophilus* é responsável por causar várias doenças de relevância clínica, entre suas diversas espécies, o *Haemophilus influenzae* do sorotipo b (Hib), sorotipo mais prevalente, se destaca por causar graves infecções em crianças de até 5 anos. Uma das doenças mais graves provocada por ele é a meningite, responsável por graves sequelas como lesões cerebrais permanentes, deficiência auditiva, entre outras, e, dependendo do estado de saúde da criança pode levar ao óbito. Uma das maneiras mais eficazes de combate à doença é através da vacinação.

A cápsula de polirribosil ribitol fosfato (PRP) é o principal fator de virulência, porém, uma vacina composta apenas pelo polissacarídeo capsular não é capaz de induzir resposta imunológica protetora em crianças menores de dois anos de idade, por isso se faz necessário a conjugação com uma proteína carreadora. A vacina comercial disponível anti-Hib é formada pelo PRP conjugado ao toxóide tetânico.

Nosso laboratório vem estudando a síntese de conjugados de polissacarídeos capsulares a proteínas. Entre as diversas etapas do desenvolvimento de uma vacina é necessário fazer testes de estabilidade. O objetivo principal do presente trabalho é avaliar a estabilidade de conjugados de PRP-TT previamente sintetizados e armazenados em solução tampão fosfato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50 mM, NaCl 150 mM, Timerosal 0,005%) a 4° C. As amostras serão analisadas por cromatografia líquida de exclusão molecular e o conteúdo de polissacarídeo determinado por método colorimétrico.

**Palavras chaves:** Cromatografia líquida, *Haemophilus influenzae* tipo b, conjugados.

## Abstract

The bacterium *Haemophilus* is responsible for causing several diseases of clinical relevance, among its several species, *Haemophilus influenzae* serotype b (Hib), the most prevalent serotype, stands out for causing serious infections in children up to 5 years old. One of the most serious diseases caused by it is meningitis, responsible for severe sequelae such as permanent brain damage, hearing loss, among others, and depending on the state of health of the child can lead to death. One of the most effective ways of reducing the disease is through vaccination.

The polyribosyl ribitol phosphate (PRP) capsule is the main virulence factor; however, a vaccine composed only of the capsular polysaccharide is not capable of inducing a protective immune response in children under two years old, so it is necessary to conjugate it to a carrier protein. The available commercial anti-Hib vaccine is composed by PRP conjugated to tetanus toxoid.

Our laboratory has been studying the synthesis of conjugates of capsular polysaccharides to proteins. Among the various stages of vaccine development, stability testing is required. The main objective of the present work is to evaluate the stability of previously synthesized PRP-TT conjugates stored in phosphate buffer solution ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50 mM, NaCl 150 mM, 0.005% Thimerosal) at 4<sup>0</sup>C. Samples will be analyzed by Size Exclusion Liquid Chromatography (SEC) and the polysaccharide content determined by colorimetric method.

**Keywords:** Liquid chromatography, *Haemophilus influenzae* type b, conjugates.

## 1. Introdução

O *Haemophilus influenzae* é uma bactéria que está associada com a nossa flora comensal do trato respiratório superior e do trato genital (Jordens and Slack 1995). Apesar de estar presente nas membranas das mucosas de 75% de crianças e indivíduos saudáveis, chamados de portadores assintomáticos (não manifestam sintomas, porém são transmissores da bactéria), é o causador de graves infecções em crianças de dois meses a cinco anos, devido ao sistema imunológico da criança estar em formação (Jordens and Slack 1995; Bricks, Mendes et al. 2004; Diniz and Figueiredo 2014). Vale ressaltar que o *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) está entre as três principais bactérias causadoras da meningite juntamente com a *Neisseria meningitidis* e o *Streptococcus pneumoniae* (Perecin, Garcia et al. 2010).

Em 1931, Pittman mostrou que o *Haemophilus influenzae* apresenta cepas encapsuladas e não encapsuladas. As cepas encapsuladas possuem seis sorotipos que são designados do a ao f e se distinguem pela composição de suas cápsulas polissacarídicas e as não encapsuladas, são designadas como não tipáveis (Pittman 1931; CARVALHO 2010; Agrawal and Murphy 2011).

O Hib é o causador de doenças invasivas de relevância clínica devido às complicações que as mesmas podem causar se não forem tratadas adequadamente. Doenças como a pneumonia, bacteremia e, principalmente a meningite, que tem início súbito com febre, dor de cabeça muito intensa, rigidez na nuca, náuseas e episódios de vômito, em casos mais graves, a meningite leva a deficiência auditiva, lesões cerebrais permanentes ou até mesmo ao óbito. Já as cepas não tipáveis causam doenças não invasivas como otite média, conjuntivite, sinusite e bronquite (Anderson 1983; Jordens and Slack 1995; **Bio-Manguinhos/Fiocruz** 2014; Machado and Borges 2015).

A meningite é uma doença que atinge o Sistema Nervoso Central (SNC), responsável por receber e processar todas as informações que recebemos dos impulsos nervosos, logo, é nessa região que são dadas as ordens para os órgãos efetores. Devido à importância do SNC é

preciso uma atenção maior aos sintomas e agravos ocasionados pelo patógeno (Sakushima, Hayashino et al. 2011; Machado and Borges 2015).

Os surtos de infecção ocorrem principalmente em creches devido ao foco de crianças em um mesmo local e o Hib se espalha rapidamente de pessoa a pessoa por contato direto, por secreções nasais ou aerossóis (Bouskela, Grisi et al. 2000; Bricks, Mendes et al. 2004; Nesti and Goldbaum 2007).

O diagnóstico é dado por meio do cultivo de secreções respiratórias e do líquido cefalorraquidiano em ágar chocolate devido a necessidade da bactéria de fatores derivados do sangue para o seu crescimento. Com as secreções respiratórias é feito também a coloração de Gram, encontrando grande quantidade de pequenos cocobacilos imóveis, pleomórficos e Gram negativos, eles possuem a capacidade de crescer na presença ou ausência de oxigênio (aeróbios facultativos), sua temperatura ideal para crescimento é a mesma temperatura corporal, o que facilita sua colonização e desenvolvimento (Bouskela, Grisi et al. 2000; Bricks, Mendes et al. 2004).

Com o uso de antibióticos eficazes (ampicilina, cloranfenicol, tetraciclina, etc) para o tratamento do Hib, houve uma diminuição significativa de mortes por tal patógeno. Porém, os antibióticos que eram eficazes se tornaram ineficazes por conta das mutações que as bactérias sofreram tornando resistentes a antibioticoterapia (Jordens e Slack, 1995; Rey and Farhat 1997).

Apesar do polirribosil ribitol fosfato (PRP) ser o principal fator de virulência do Hib, outros fatores podem facilitar a colonização do mesmo em seu hospedeiro como o lipopolissacarídeo (LPS) presente somente em bactérias Gram negativas, as fímbrias utilizadas na aderência do mesmo no trato respiratório e estudos indicam que a proteína de membrana externa chamadas de OMPs P2 pode interferir na virulência do Hib (Sanders, Cope et al. 1993; Jordens and Slack 1995). Por ser o principal fator de virulência, o PRP está presente na formulação da vacina contra Hib (Schneerson, Barrera et al. 1980).

A cápsula bacteriana do Hib é formada por unidades repetitivas do polímero de PRP que é um polissacarídeo e torna a bactéria resistente à fagocitose por leucócitos na ausência de anticorpos específicos. Entretanto, o PRP é um antígeno timo-independente, ou seja, não induz anticorpos da classe IgG com memória imunológica. Com isso, o programa de vacinação possui vacinas conjugadas (específicas no combate às bactérias encapsuladas) que são formadas por sacarídeos provenientes da cápsula polissacarídica da bactéria conjugadas a uma proteína que torna o composto capaz de induzir memória imunológica, ou seja, torna o PRP timo-dependente (Schneerson, Barrera et al. 1980; Martins 1994).

A prática da vacinação adotada pelo mundo todo contribuiu para a redução das doenças, inclusive do Hib e se mostrou eficaz entre 95% a 100% dos pacientes após seguirem o esquema completo de vacinação (desde 1999), ou seja, após as três doses aplicadas pelo programa nacional de imunização (de Almeida, de Filippis et al. 2005; **Bio-Manguinhos/Fiocruz** 2014).

Após a administração da vacina conjugada, o polissacarídeo é unido as células do Linfócito B, internalizando o conjugado proteína/polissacarídeo, dentro do Linfócito B o toxóide tetânico é fragmentado para ser apresentado ao MHC II (Complexo Principal de Histocompatibilidade de classe II) e por fim, ocorre a ativação do Linfócito T (Bogaert, Hermans et al. 2004; González-Fernández, Faro et al. 2008).

Visando a melhoria e custos, a Hib conjugada pode ser administrada com outras vacinas, sendo denominadas de vacinas combinadas, facilitando para o profissional na hora da aplicação e para o paciente na hora de receber a vacina, além de reduzir os resíduos gerados (Scheifele, Bjornson et al. 1992). Ela pode ser administrada com a tríplice viral (sarampo, caxumba e rubéola), com a DTP (difteria, coqueluche e tétano) ou com a anti-pólio (Martins 1994). Apesar da alta cobertura vacinal, algumas crianças e adultos com o sistema imunológico comprometido não conseguem promover a síntese de anticorpos específicos contra o polissacarídeo capsular do Hib ficando mais suscetíveis a doença (Agrawal and Murphy 2011). Como a vacina é administrada nos primeiros

anos de vida, a incidência do Hib é baixa, porém com o movimento anti-vacinas, muitos pais deixaram de vacinar suas crianças, deixando uma janela de vulnerabilidade entre elas, isso tem gerado sérios problemas na saúde da população, pois, doenças como o sarampo que estavam com surtos controlados estão re-emergindo atingindo a parte da população que não foi vacinada, sendo necessária uma atenção maior da população e dos centros básicos de saúde (OPAS/OMS 2018).

Em nosso laboratório (Laboratório Especial de Desenvolvimento de Vacinas do Instituto Butantan), antigo Centro de Biotecnologia, estuda-se a conjugação química entre os polissacarídeos capsulares de bactérias e as proteínas carreadoras. Foram sintetizados conjugados de Hib, TT (Barazzone, Perciani et al. 2009) e *Streptococcus pneumoniae* sorotipos 1, 6B, 14 e 23F com proteínas de superfície pneumocócica (PspA) (Csordas, Perciani et al. 2008; Santamaria, Goulart et al. 2011; Perciani, Barazzone et al. 2013; da Silva, Converso et al. 2017), com resultados interessantes.

Para o conjugado chegar ao seu destino final (a vacina), é necessário que o mesmo passe por diversas etapas de desenvolvimento e controle de qualidade, dentre elas, são feitos os testes de estabilidade dos compostos para mostrar o tempo em que um produto pode permanecer nas prateleiras de um determinado estabelecimento de saúde (tempo de meia-vida do produto). Diante disso, o objetivo deste trabalho é avaliar a despolimerização do PRP em conjugados PRP-TT utilizando cromatografia líquida (LC). Cabe ressaltar que esse trabalho é um estudo preliminar da estabilidade do PRP-TT. Somente foi avaliado o PRP-TT em solução, não foi avaliado a estabilidade de uma formulação vacinal (na qual há outros componentes como, por exemplo, o adjuvante que pode influenciar).

## **2. Objetivo Geral**

Avaliar a despolimerização do PRP em conjugados PRP-TT armazenados a 4°C utilizando cromatografia líquida (LC).

### **2.1 Objetivos específicos**

- Análise qualitativa dos conjugados no HPLC;
- Separação do conjugado e do não conjugado (proveniente da despolimerização) em coluna preparativa de cromatografia líquida de exclusão molecular Sephacryl S400 XK26;
- Análise quantitativa do conteúdo de polissacarídeo nas frações conjugadas e não conjugada.
- Separação de conjugados e não conjugados (proveniente da despolimerização) em coluna preparativa de cromatografia líquida de exclusão molecular Sephacryl S400 XK50;
- Concentração de amostras empregando a técnica de ultrafiltração tangencial.
- Liofilização das amostras repurificadas e analisadas.

## **3. Materiais e métodos**

### **3.1 Conjugados PRP-TT**

Foram analisados três conjugados de PRP-TT (40 meses, 37 meses e 30 meses), previamente preparados em nosso laboratório, em tampão Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5 foram e armazenados a 4° C.

### **3.2 Cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC Agilent 1260)**

As amostras foram concentradas utilizando Centricon Plus-20 Millipore (10 kDa) antes da análise por cromatografia líquida de exclusão de tamanho de alto desempenho (HPSEC).

Duas colunas, TSKgel G5000 e TSKgel G4000 PWXL (7,8 mm DI x 30,0 cm, tamanho de partícula 10 µm, TOSOH), foram conectadas em série a uma pré-coluna (6,0 mm DI x 4,0 cm L, tamanho de partícula 2 µm, TOSOH) em um HPLC Agilent 1260 para análise qualitativa dos conjugados.

A fase móvel empregada foi Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5, com o volume de injeção de 50 µL de amostra previamente filtrada em 0,22 µm, fluxo de 0,4 mL / min, detector de índice de refração (RID) a 35°C e tempo de corrida de 70 min. O volume de exclusão (V<sub>0</sub>) e o volume total da coluna foram determinados pela injeção de DNA de salmão e tirosina, respectivamente.

### **3.3 Cromatografia líquida preparativa**

Após análise qualitativa de HPLC, as amostras foram individualmente injetadas (1- 5 mL) em uma coluna XK26/100 (Sephacryl S-400, GE Healthcare) acoplada a um sistema Akta Purifier 100.

A fase móvel empregada foi Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5, fluxo de 2,6 mL/min e foram coletados frações de 6 mL/tubo. As frações foram analisadas por método colorimétrico (orcinol) para a detecção de polissacarídeo. As frações de PRP-TT conjugado foram separadas do PRP livre (depolimerizado).

### **3.4 Método colorimétrico Orcinol - Perfil dos conjugados e quantificação do polissacarídeo**

#### **3.4.1 Análise qualitativa - Perfil cromatográfico**

As frações recolhidas da coluna cromatográfica foram analisadas pelo Método Orcinol.

A 750 µL de cada fração ímpar vinda da cromatografia líquida foi adicionando 1,5 mL do reagente A (solução 0,005 % de cloreto férrico em ácido clorídrico concentrado) e 100 µL de reagente B (solução alcoólica de orcinol 6%.. Após a agitação das amostras as soluções foram deixadas em banho Maria a 80°C por 25 minutos, esfriadas em gelo e foi lido a densidade óptica a 668 nmno espectrofotômetro (GeneQuant 1300).

### **3.4.2 Análise quantitativa da Ribose como padrão**

Após estabelecer o perfil das amostras, foram feitos pools com as frações de amostra conjugada e não conjugada (depolimerizada).

A curva padrão foi efetuada empregando ribose (0,5 mg/mL) com pontos de 3/ 6/ 9/ 18 e 36  $\mu$ L e completando para 750  $\mu$ L de água ultrapura (Milli-Q).

750  $\mu$ L de amostra (em alguns conjugados foi necessário diluí-los em tampão fosfato devido à alta concentração de polissacarídeo) foi empregada para a dosagem de polissacarídeo PRP seguindo o protocolo descrito na etapa anterior (5.4.1). Para calcular a massa de PRP da amostras empregando ribose como padrão é necessário empregar o fator de correção 2,5.

## **3.5 Micro método de Bradford - Dosagem de Proteína**

O micro método de Bradford é utilizado para determinar baixas quantidades de proteínas (1-10 $\mu$ g/mL).

Utilizando tubos de ensaio, foi alicotado 1mL de albumina com concentração de 0,001/ 0,002/ 0,004/ 0,005/ 0,007 e 0,01 mg/mL para construção da curva padrão. À essas amostras foi adicionado 1 mL de reagente de Bradford. Após agitação e repouso a temperatura ambiente por 20 minutos os valores de absorbância das amostras foram lidos no espectrofotômetro (GeneQuant 1300) a 595 nm. A curva de calibração construída (absorbância x concentração) foi empregada para a quantificação das amostras.

1 mL de amostra de cada pool (em alguns conjugados foi necessário diluí-los em tampão fosfato devido à alta concentração de proteína) e 1mL de reagente de Bradford, foram misturados e deixados em temperatura ambiente por 20 minutos, feito isso, todas as amostras tiveram os valores de absorbância lidos no espectrofotômetro.

### **3.5.1 Macro método de Bradford**

O macro método de Bradford é utilizado para determinar concentrações de 0,1 até 1,4 mg/mL de proteína. Ele é preparado em placas com 96 poços. Os padrões utilizados foram com concentrações de 0,2/ 0,4/ 0,5/ 0,6/ 0,8/ 1,0 e 1,4 mg/mL, sendo adicionado 5 µL de cada um.

Foi adicionado 5 µL de amostra e 250 µL de reagente Bradford nos poços, misturamos e incubamos em temperatura ambiente por 20 minutos e as amostras foram lidas em espectrofotômetro de placas- iMark (Bio-Rad) a 595 nm.

### **3.6 Ultrafiltração tangencial**

O conjugado mais antigo (40 meses) foi concentrado no Labscale TFF System (Millipore) com 3 membranas de 100 KDa (Biomax 100) e diafiltrado com fosfato de sódio dibásico 5mM (com 12 vezes o volume do concentrado).

### **3.7 Cromatografia líquida utilizando a coluna S400 XK50/100**

Após a concentração do estoque do conjugado de 40 meses, ele foi injetado 55,5 mL na coluna de cromatografia líquida XK50/100, volume de coluna 1,8L (Sephacryl S-400, GE Healthcare) no sistema Akta Purifier 100, fluxo 9,6 mL/min com a fase móvel de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5 para separar o conjugado do PRP livre. Foram recolhidas frações de 14 mL e o pool de conjugado separado.

### **3.8 Liofilização**

A amostra de 40 meses repurificada na coluna XK50/100 teve a fração conjugada congelada a -80°C e foi liofilizada por 48 horas e armazenada a -20°C para posterior uso.

#### 4. Resultados e discussão

Uma importante informação a ser obtida é a estabilidade do conjugado PRP-TT em solução. Foram analisados conjugados previamente sintetizados e purificados em nosso laboratório, armazenados em tampão  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50 mM, NaCl 150 mM pH 7,5 a  $4^\circ\text{C}$  por 40, 37 e 30 meses. Esses conjugados foram obtidos em reações de conjugações distintas.

A primeira etapa do presente trabalho foi a avaliação qualitativa dos conjugados PRP-TT por HPLC com intuito de verificar se ainda havia a presença do conjugado e sendo positivo seguir para a segunda etapa do trabalho que consistiu na repurificação dos conjugados para quantificar a despolimerização do PRP.

Como dito anteriormente, o PRP é um polímero composto de polirribosil ribitol fosfato (Figura 1). A ligação fosfodiéster do polímero pode ser quebrada com o tempo podendo resultar na diminuição do tamanho do polímero que poderia afetar a imunogenicidade da vacina (Sturgess, Rush et al. 1999).

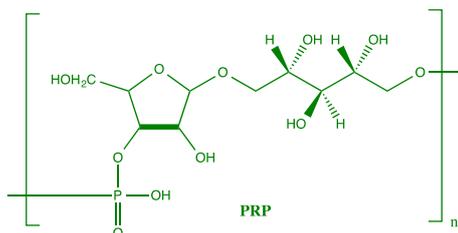


Figura 1 - Estrutura química do PRP

A repurificação do PRP-TT é feita por cromatografia líquida de exclusão molecular (também conhecida como gel filtração) em colunas preparativas. Esta técnica cromatográfica é usada devido ao tamanho do PRP livre (não conjugado) ser menor do que sua forma conjugada (PRP-TT). Como as moléculas são de tamanhos diferentes, elas eluem em tempos diferentes, sendo que as maiores eluem primeiro devido a não entrada nos interstícios da resina cromatográfica. Considerando o exposto e levando em consideração que as amostras já haviam sido purificadas, a observação de PRP na região de eluição de PRP não conjugado significaria que esse material seria oriundo de despolimerização.

Primeiramente foi mensurado o pH de todas as amostras para verificação se houve variação do pH do tampão que inicialmente havia sido armazenado as amostras (pH 7,5). Observamos uma variação nas amostras de 0,38 unidades de pH no máximo.

Todas as amostras foram concentradas em membrana de 10KDa (pois estavam diluídas em tampão quando pois eram frações de coluna de gel filtração). Após as concentrações, analisamos todos os perfis de HPLC individualmente para a verificação da presença de PRP-TT nas três amostras. (Figuras 2 - 4). Para todos os conjugados (linhas azuis) utilizamos um controle (linhas vermelhas) que são os PRP-ADH de partida de cada conjugado (ou seja, o material empregado para a conjugação com o TT). Como o conjugado é uma molécula grande, ele sairá primeiro que qualquer outro componente presente na nossa amostra e a parte do PRP-ADH livre eluirá depois. Como o polissacarídeo não absorve em 280 nm, no HPLC usamos como detector um dispositivo que mede o índice de refração (detector RID). O sinal é detectado quando há uma diferença de índice de refração do tampão em relação a amostra. Em todos os cromatogramas foi observado um pico de eluição em torno de 55 minutos. Ao injetar somente a fase móvel foi verificado esse pico (Figura 5). Pela análise das figuras 2-4 foi possível verificar a presença de conjugado nas três amostras (picos com tempo de retenção de 30-32 min). O PRP-TT usado na reação de conjugação, feita anteriormente, possui tempo de retenção de 42-43 minutos. Esses tempos são ligeiramente diferentes, conforme pode ser observado pela análise dos cromatogramas, pois foram oriundos de preparações diferentes que partiram de PRP nativo obtidos em diferentes processos. O tempo de retenção do pico referente ao DNA de salmão foi 27,55 minutos e da tirosina 60,29 minutos. Também é possível verificar que os picos dos conjugados PRP-TT possuem uma "cauda" no final do pico podendo sugerir que tem alguma quantidade de amostra de menor massa molar junto.

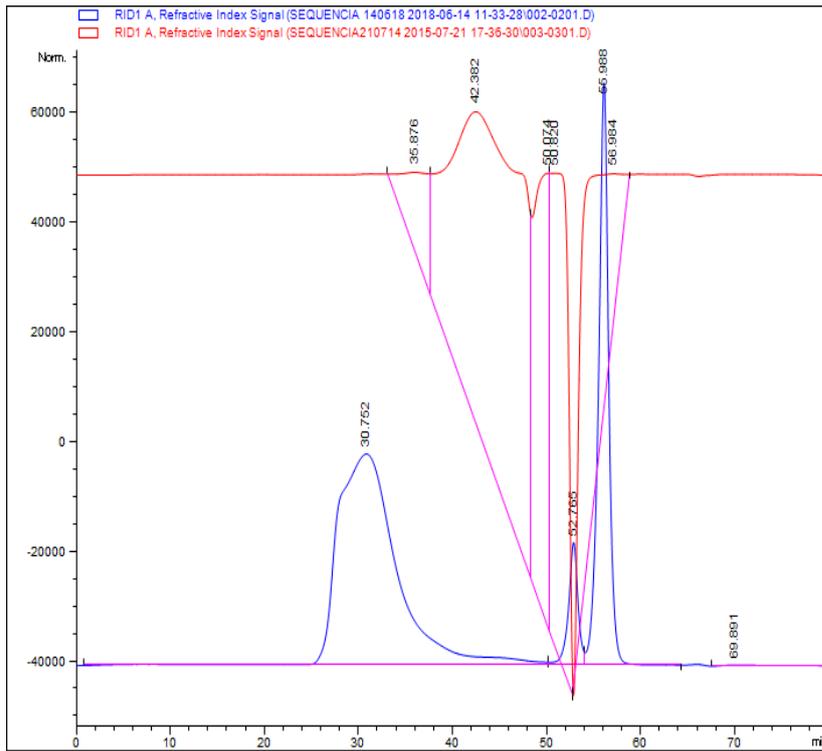


Figura 2- Cromatograma do conjugado 40 meses estocado a 4°C. A linha azul representa o conjugado PRP- TT e a linha vermelha representa o PRP-ADH1.

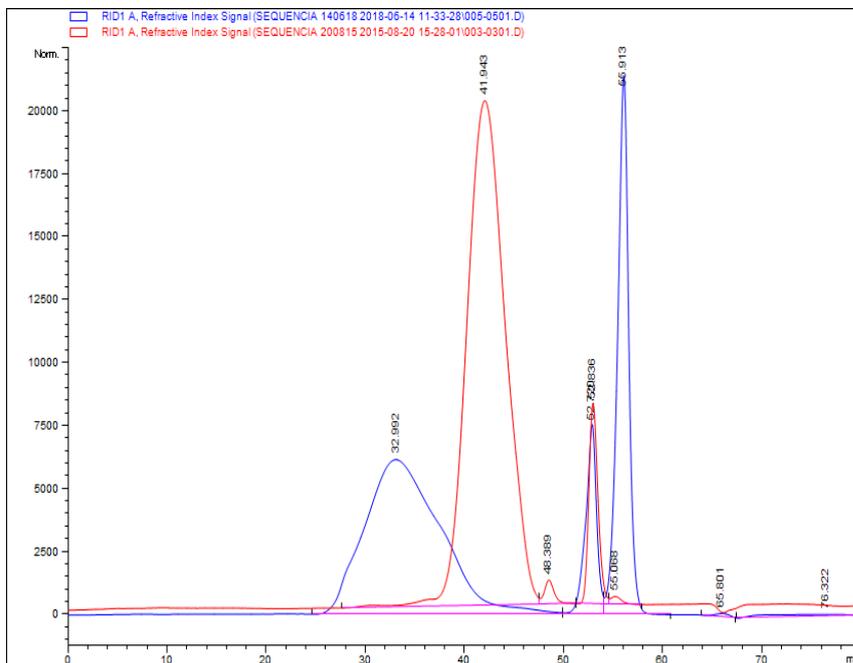


Figura 3- Cromatograma do conjugado 37 meses estocado a 4°C. A linha azul representa o conjugado PRP-TT e a linha vermelha representa o PRP-ADH 2.

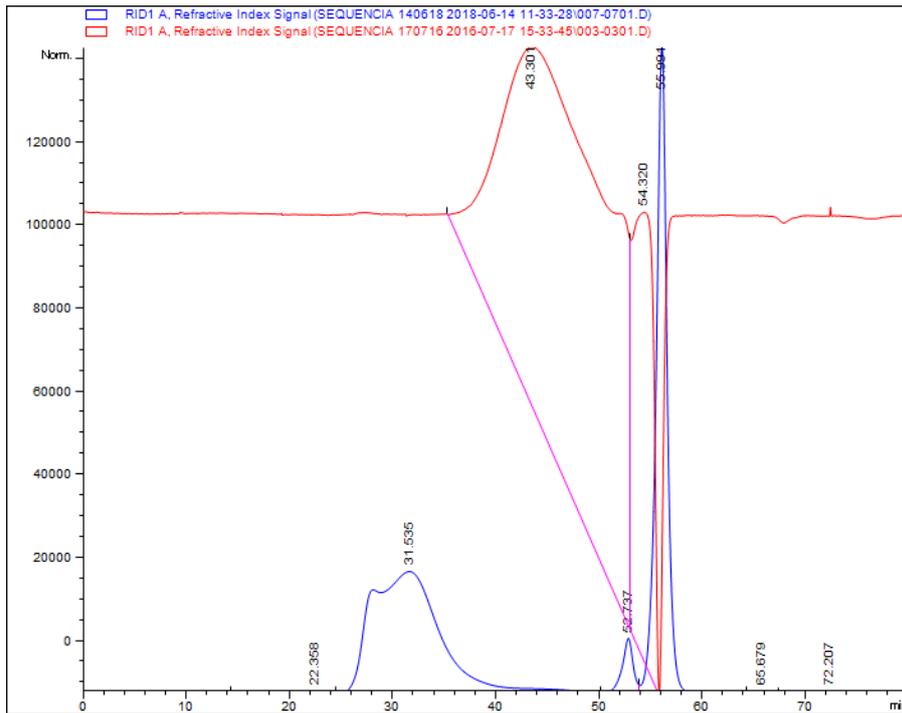


Figura 4- Cromatograma do conjugado 30 meses estocado a 4°C. A linha azul representa o conjugado PRP-TT e a linha vermelha representa o PRP-ADH 3.

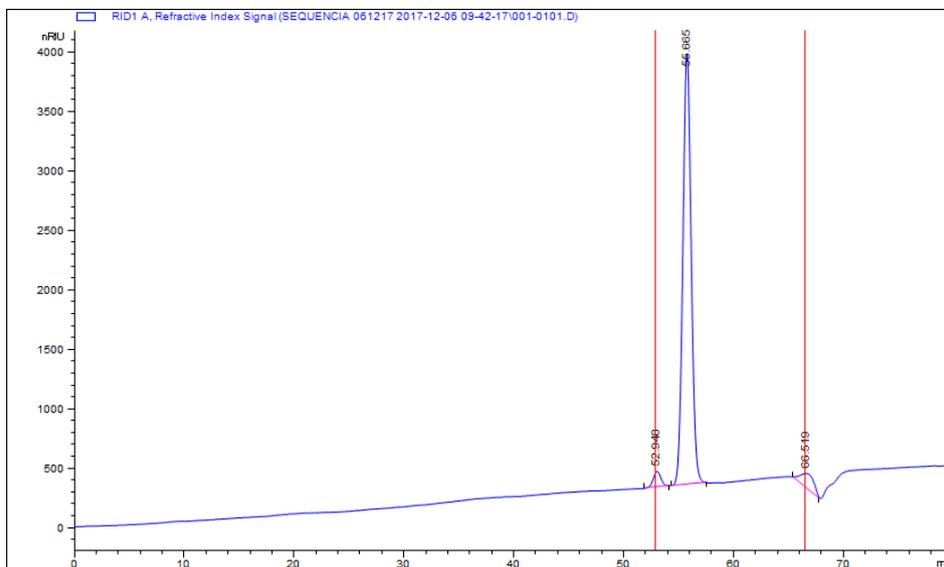


Figura 5 - Cromatograma mostrando o pico de eluição da fase móvel do HPLC presente em todos os conjugados.

Após a identificação de todos os PRP-TT nas três amostras, os conjugados foram repurificados por cromatografia líquida preparativa

(resina Sephacryl S-400, colunas XK26/100 ou XK50/100) para fazer a separação em pools de PRP-TT e PRP livre (Figuras 6-8). Como o polissacarídeo não absorve a 280 nm para identificá-lo foi necessário fazer o método colorimétrico orcinol das frações da coluna antes de fazer o pool das amostras conjugadas e não conjugadas. Algumas amostras de PRP-ADH (2 e 3) foram anteriormente injetadas em colunas distintas (S400 XK16/100 ou S400 XK50/100) então foi necessário re-injetá-las na coluna S400 XK26/100 que foi a usada para separar as amostras conjugadas e não conjugadas no presente estudo de estabilidade. Os conjugados foram preparados a partir de um PRP purificado inicial que passou por um processo de oxidação e derivatização tornando-o PRP-ADH que por ultimo ocorre a conjugação com a proteína TT. Com isso, cada conjugado tem o seu PRP-ADH de partida.

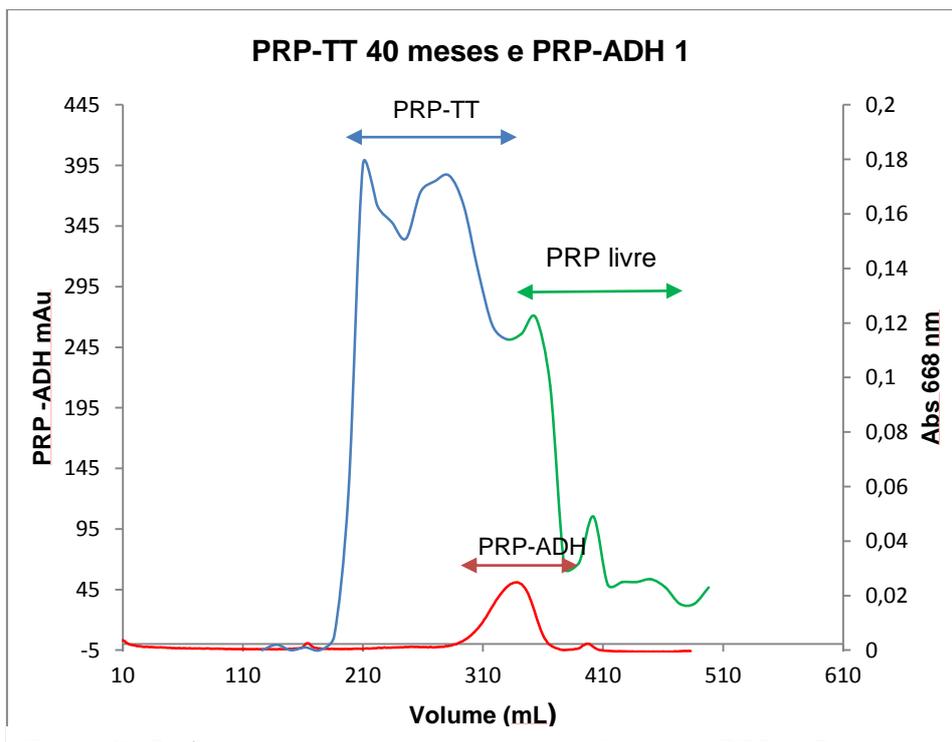


Figura 6- Perfil do conjugado de 40 meses, utilizando o PRP-ADH 1 estoque (linha vermelha), PRP-TT (linha azul) e PRP não conjugado (linha verde).

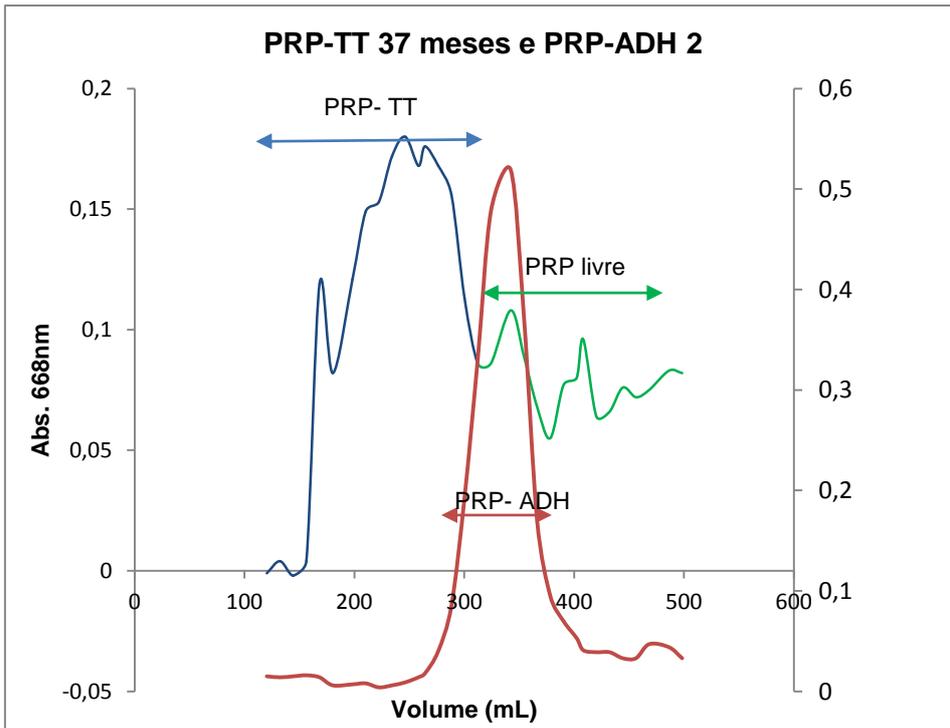


Figura 7- Perfil do conjugado de 37 meses, PRP- ADH 2 estoque (linha vermelha),PRP-TT (linha azul) e PRP não conjugado (linha verde).

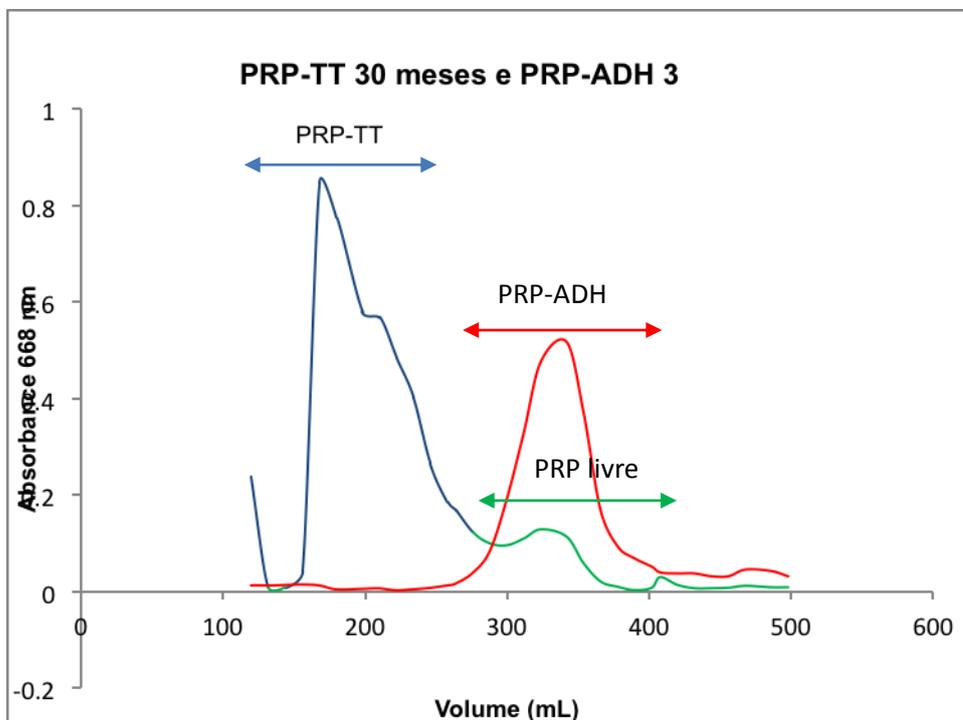


Figura 8- Perfil do conjugado de 30 meses, utilizando o PRP- ADH 3 estoque (linha vermelha),PRP-TT (linha azul) e PRP não conjugado (linha verde).

Após a separação dos pools foi quantificado o conteúdo de PRP no conjugado e na fração não conjugada. Esse cálculo foi feito a partir da curva de calibração usando ribose como padrão. A figura 9 mostra uma das curvas empregadas, para cada dosagem foi construída uma nova curva de calibração. Já a figura 10 mostra uma das curvas de calibração para dosagem de proteína usando albumina como padrão.

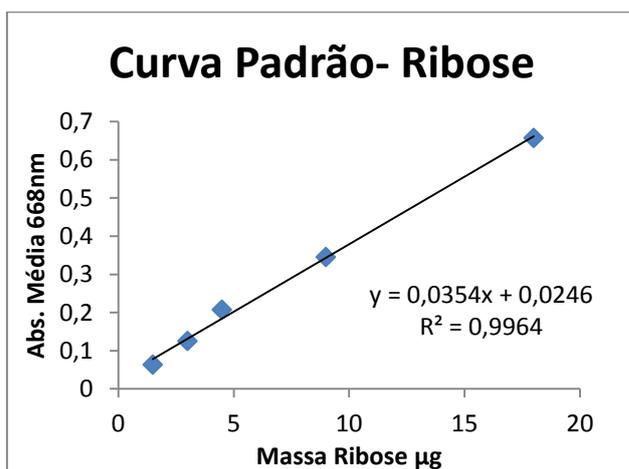


Figura 9- Curva padrão feita com Ribose pelo método Orcinol.

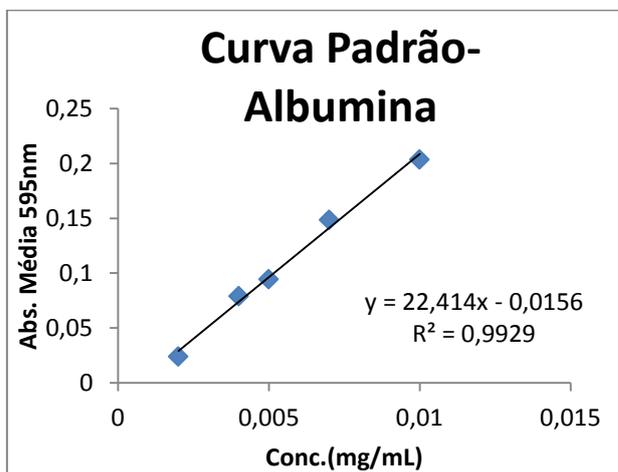


Figura 10 - Curva padrão utilizando a Albumina pelo micro método de Bradford.

Amostras	Fração conjugada de PRP			Fração não conjugada de PRP		
	Volume (mL)	Concentração (mg/mL)	Massa (mg)	Volume (mL)	Concentração (mg/mL)	Massa (mg)
40 meses	120	0,19	22,80	72	0,12	8,64
37 meses	150	0,02	3,00	84	0,01	0,84
30 meses	144	0,05	7,2	144	0,01	1,44

Tabela 1 – Quantificação do conteúdo de PRP (método orcinol).

Amostras	Fração conjugada de TT			Fração não conjugada de TT		
	Volume (mL)	Concentração (mg/mL)	Massa (mg)	Volume (mL)	Concentração (mg/mL)	Massa (mg)
40 meses	120	0,24	28,80	72	0,02	1,44
37 meses	150	0,17	25,50	84	0,03	2,52
30 meses	144	0,33	47,52	144	0,29	41,76

Tabela 2- Quantificação do conteúdo de proteína (método Bradford).

Em 1998 foi feito um estudo com algumas formulações vacinais e observaram que uma redução de até 20% no PRP conjugado não tem impacto na imunogenicidade da vacina, passando disso, pode interferir na eficácia clínica da mesma (Sturgess, Rush et al. 1999). Com isso, os resultados obtidos (tabela 2) foram esperados devido ao fato do conjugado despolimerizar com o tempo. A amostra mais antiga é a que possuía maior quantidade de PRP livre 27%, esse valor não é tão alto, considerando que essa amostra estava estocada por mais de 3 anos. Os valores obtidos na dosagem de proteína indicaram, como esperado, que a quantidade de proteína na fração conjugada é muito maior do que a da

não conjugada mostrando que a proteína TT não sofreu quebra com o tempo. Contudo a massa total de proteína obtida para o conjugado de 30 meses foi muito alta podendo ser um erro de dosagem. Essas amostras terão o conteúdo de proteína reavaliada.

<b>Amostras</b>	<b>PRP Conjugado (%)</b>	<b>PRP Livre (%)</b>	<b>Proteína Conjugada (%)</b>	<b>Proteína Livre (%)</b>
<b>40 meses</b>	73	27	95	5
<b>37 meses</b>	78	22	91	9
<b>30 meses</b>	83	17	53	47

Tabela 3- Avaliação da despolimerização do PRP.

Com o intuito de repurificar toda a amostra de 40 meses, o estoque da mesma foi concentrado e diafiltrado para troca de tampão por ultrafiltração tangencial usando 3 membranas de 100 KDa de corte (Sistema Labscale), A fração concentrada foi congelada e liofilizada.

A liofilização é um processo em que o estado sólido passa diretamente para o estado gasoso sem passar pelo estado líquido, esse processo é chamado de sublimação, e é fundamental na indústria alimentícia, na pesquisa, na indústria farmacêutica, entre outras, pois conserva por mais tempo compostos voláteis ou termo- sensíveis. Apesar de ser de extrema importância para a preservação dos produtos, a liofilização é um processo dispendioso e exige tratamentos prévios adequados para melhor conservação do produto, além de ser um processo bem lento. Mas, por ser um processo que mantém as características do componente por mais tempo deixamos o conjugado de 40 meses liofilizado e armazenado a -20°C para futuros testes para verificação da estabilidade do mesmo, mas agora liofilizado (Ribeiro 2012).

Muitos fatores influenciam a resposta imunológica induzida pela vacina como adjuvantes a base de alumínio e tamanho do conjugado (Berti and

Adamo 2013), por isso, é fundamental considerar a formulação final da mesma. Apesar de ser um estudo preliminar, é relevante para a formulação da vacina, pois dentre tantos testes, a identificação do tempo de meia vida dos conjugados é necessária no desenvolvimento de uma vacina. É importante lembrar que a velocidade de quebra do PRP pode ser influenciada por outros componentes da formulação vacinal como o hidróxido de alumínio (que pode catalisar a quebra da ligação fosfodiéster) mudando assim o tempo de estabilidade da vacina. Outros antígenos que possam ser incluídos, também devem ser avaliados se afetam ou não a estabilidade do conjugado.

## **5. Conclusão**

Observamos que mesmo após 3 anos de armazenamento, a amostra mais antiga ainda tem quantidades significativas de conjugado PRP-TT (73%). Com isso é possível concluir que o PRP-TT está despolimerizando com o tempo, mas este é um processo lento e gradual. Além do objetivo concluído, as técnicas empregadas (Cromatografias líquidas, ultrafiltração tangencial, dosagens de polissacarídeos, dosagens de proteínas, liofilização e concentração de conjugados) agregaram aprendizagem no curso devido ao contato direto e a quantidade de vezes analisando os conjugados.

## 6. Referências bibliográficas

Agrawal, A. and T. F. Murphy (2011). "Haemophilus influenzae infections in the H. influenzae type b conjugate vaccine era." Journal of clinical microbiology: JCM. 05476-05411.

Anderson, P. (1983). "Antibody responses to Haemophilus influenzae type b and diphtheria toxin induced by conjugates of oligosaccharides of the type b capsule with the nontoxic protein CRM197." Infection and Immunity **39**(1): 233-238.

Barazzone, G. C., C. T. Perciani, et al. (2009). Método de conjugação de polissacarídeo capsular a uma proteína carregadora, para uso como antígeno vacinal contra bactérias encapsuladas, utilizando o reagente cloreto de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolino (DMT-MM). Brazil. **PI 0904528**.

Berti, F. and R. Adamo (2013). "Recent mechanistic insights on glycoconjugate vaccines and future perspectives." ACS chemical biology **8**(8): 1653-1663.

**Bio-Manguinhos/Fiocruz** (2014). Haemophilus influenzae B (Hib): sintomas, transmissão, prevenção. Portal FIOCRUZ.

Bogaert, D., P. Hermans, et al. (2004). "Pneumococcal vaccines: an update on current strategies." Vaccine **22**(17-18): 2209-2220.

Bouskela, M. A. L., S. Grisi, et al. (2000). "Aspectos epidemiológicos da infecção por Haemophilus influenzae tipo b." Revista Panamericana de Salud Pública **7**: 332-339.

Bricks, L. F., C. M. F. Mendes, et al. (2004). "Oropharyngeal colonization by Haemophilus influenzae in healthy children from Taubaté (São Paulo), prior to the Haemophilus influenzae type b vaccination program in Brazil." Revista do Hospital das Clínicas **59**(5): 236-243.

CARVALHO, C. X. d. (2010). "Tipagem molecular da cápsula de Haemophilus influenzae isolados da nasofaringe de crianças de creches de Goiânia."

Csordas, F. C., C. T. Perciani, et al. (2008). "Protection induced by pneumococcal surface protein A (PspA) is enhanced by conjugation to a Streptococcus pneumoniae capsular polysaccharide." Vaccine **26**(23): 2925-2929.

da Silva, M. A., T. R. Converso, et al. (2017). "Conjugation of PspA4Pro with capsular Streptococcus pneumoniae polysaccharide serotype 14 does not reduce the induction of cross-reactive antibodies." Clinical and Vaccine Immunology: CVI. 00118-00117.

de Almeida, A., I. de Filippis, et al. (2005). "Occurrence of Haemophilus influenzae strains in three Brazilian states since the introduction of a conjugate Haemophilus influenzae type b vaccine." Brazilian Journal of Medical and Biological Research **38**(5): 777-781.

Diniz, L. M. O. and B. d. C. G. Figueiredo (2014). O sistema imunológico do recém-nascido. *Revista Médica de Minas Gerais* 2014; 24(2): 233-240: 233-240.

González-Fernández, Á., J. Faro, et al. (2008). "Immune responses to polysaccharides: lessons from humans and mice." Vaccine **26**(3): 292-300.

Jordens, J. and M. Slack (1995). "Haemophilus influenzae: then and now." European journal of clinical microbiology and infectious diseases **14**(11): 935-948.

Machado, C. F. T. and B. L. C. Borges (2015). "Meningite Bacteriana na Unidade de Terapia Intensiva: um Protocolo de Cuidados de Enfermagem." UNICIÊNCIAS **19**(1).

Martins, R. (1994). "Haemophilus influenzae type b infections and its prevention by vaccines." Jornal de pediatria **70**(4): 197-205.

Nesti, M. M. and M. Goldbaum (2007). "As creches e pré-escolas e as doenças transmissíveis." Jornal de Pediatria **83**(4).

OPAS/OMS (2018). "Folha informativa - Sarampo." [www.paho.org](http://www.paho.org) 2018.

Perciani, C. T., G. C. Barazzone, et al. (2013). "Conjugation of polysaccharide 6B from Streptococcus pneumoniae with pneumococcal surface protein A: PspA conformation and its effect on the immune response." Clinical and Vaccine Immunology: CVI. 00754-00712.

Perecin, G. E. C., C. M. d. F. Garcia, et al. (2010). "Epidemiological profile of haemophilus influenzae b meningitis in regional health board of Piracicaba-São Paulo-Brazil." Revista da Escola de Enfermagem da USP **44**(3): 642-648.

Pittman, M. (1931). VARIATION AND TYPE SPECIFICITY IN THE BACTERIAL SPECIES HEMOPHILUS INFLUENZAE. *Journal of experimental*: 471-492.

Rey, L. C. and C. K. Farhat (1997). "Prevalencia de Haemophilus influenzae resistentes a ampicilina, cefaclor, cefotaxima, cloranfenicol e cotrimoxazol isolados de laboratorios na cidade de Sao Paulo." Jornal de pediatria **73**: 26-31.

Ribeiro, P. F. F. d. A. e. C. (2012). Processo de Liofilização de Produtos Alimentares Perecíveis: 1-117.

Sakushima, K., Y. Hayashino, et al. (2011). "Diagnostic accuracy of cerebrospinal fluid lactate for differentiating bacterial meningitis from aseptic meningitis: a meta-analysis." Journal of Infection **62**(4): 255-262.

Sanders, J., L. Cope, et al. (1993). "Reconstitution of a porin-deficient mutant of *Haemophilus influenzae* type b with a porin gene from nontypeable *H. influenzae*." Infection and immunity **61**(9): 3966-3975.

Santamaria, R., C. Goulart, et al. (2011). "Humoral immune response of a pneumococcal conjugate vaccine: Capsular polysaccharide serotype 14—Lysine modified PspA." Vaccine **29**(47): 8689-8695.

Scheifele, D., G. Bjornson, et al. (1992). "CONTROLLED TRIAL OF HAEMOPHILUS-INFLUENZAE TYPE-B DIPHTHERIA TOXOID CONJUGATE COMBINED WITH DIPHTHERIA, TETANUS AND PERTUSSIS VACCINES, IN 18-MONTH-OLD CHILDREN, INCLUDING COMPARISON OF ARM VERSUS THIGH INJECTION." Vaccine **10**(7): 455-460.

Schneerson, R., O. Barrera, et al. (1980). "Preparation, characterization, and immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-protein conjugates." J Exp Med **152**: 361-376.

Sturgess, A. W., K. Rush, et al. (1999). "Haemophilus influenzae type b conjugate vaccine stability: catalytic depolymerization of PRP in the presence of aluminum hydroxide." Vaccine **17**(9-10): 1169-1178.