

# **Título: Metodologias Físico-Químicas para Caracterização de Proteínas Carreadoras Utilizadas em Vacinas Conjugadas Fornecidas por Bio-Manguinhos**

**Autora: Izabella Buty da Silva Corrêa**

## **RESUMO**

O toxóide tetânico (TT) e o toxóide diftérico (TD) são comumente utilizados para conferir resposta imunológica T-dependente em vacinas polissacarídicas conjugadas. É fundamental a caracterização físico-química dessas proteínas de forma a garantir o controle da qualidade do produto, considerando diferenças no processo produtivo, diferentes fornecedores ou diferenças intra-lote de um mesmo fornecedor. O objetivo deste trabalho é a avaliação de metodologias para a caracterização molecular do TT e do TD utilizados em vacinas conjugadas produzidas por Bio-Manguinhos. O perfil cromatográfico de dois fornecedores diferentes de TT (TT1 e TT2) e do TD foi analisado por cromatografia de exclusão e peneiração molecular (*SEC*) utilizando três colunas diferentes (Zorbax®GF450, TSK®G4000SW<sub>XL</sub> e Superdex™200). Técnicas como eletroforese desnaturante (*SDS-PAGE*), focalização isoeletrica (*IEF-PAGE*) e eletroforese nativa (*NATIVE-PAGE*) foram utilizadas para avaliar o perfil eletroforético de cada proteína. A estabilidade estrutural foi analisada por espectropolarimetria de dicroísmo circular e espectroscopia de fluorescência. Ambos os toxóides tetânicos foram submetidos a hidrólise triptica visando obter um mapa peptídico por cromatografia de fase reversa (*RPC*). Todas as colunas *SEC* demonstraram ser eficientes para todas as amostras, mostrando dois picos proteicos característicos de monômeros e dímeros, porém observou-se melhor resolução ( $RS > 1,0$ ) utilizando a Superdex™200. Por *SDS-PAGE*, o TT2 e TT1 não reduzidos apresentaram diferentes perfis entre si com duas bandas para TT1 referentes à proteína intacta e forma dimérica e sete bandas para TT2 relacionadas à forma dimérica, proteína intacta, cadeias pesada e leve, além de três bandas com aproximadamente 30, 60 e 70kDa. Após a redução, o TT2 apresentou o mesmo perfil do TT1 reduzido, além de duas bandas com aproximadamente 60 e 70kDa. Estes dados sugerem que o TT2, diferente do TT1, apresenta cadeias polipeptídicas livres. O TD reduzido apresentou o mesmo perfil de não reduzido, com duas bandas referentes à forma dimérica e proteína intacta. O TT2, o TT1 e o TD apresentaram banda difusa por *IEF-PAGE*, com *pI* variando de 4,2 a 5,5. A análise espectroscópica mostrou que o TT2 e o TD mantiveram sua estabilidade conformacional até 60°C. Os dados de DC indicaram que todos os toxóides apresentam estrutura secundária com predominância de alfa hélice, que é mantida acima de 85°C. O mapa peptídico mostrou um perfil diferente entre TT2 e TT1 hidrolizados, corroborando com os dados visualizados por *SDS-PAGE* e *SEC*, evidenciando diferenças nas cadeias polipeptídicas dos mesmos. Todas as técnicas empregadas foram eficientes para avaliação de proteínas carreadoras mostrando diferenças moleculares entre as amostras analisadas. Essas metodologias também foram úteis para caracterização do toxóide diftérico, sugerindo que podem ser eficazes para outras proteínas carreadoras. Porém, outras metodologias serão necessárias para avaliação do impacto dessas diferenças moleculares entre proteínas carreadoras utilizadas para conjugação em vacinas polissacarídicas.

