

Estudo de caracterização e controle de qualidade do conjugado de polissacarídeo meningocócico sorogrupo C com anatoxina tetânica produzido no Laboratório de Tecnologias Bacterianas – LATEB

Renata Chagas Bastos

RESUMO

A obtenção da vacina conjugada contra *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) possibilitou a aplicação de técnicas correlatas para a conjugação entre os polissacarídeos capsulares meningocócicos e proteínas. Por isso, o Laboratório de Tecnologias Bacterianas (LATEB - Bio-Manguinhos, Fiocruz) desenvolveu uma metodologia para a produção de uma vacina anti-meningocócica C conjugando o polissacarídeo meningocócico C com o toxóide tetânico através do método de aaminação redutiva. Nesta metodologia, antes da etapa de conjugação, são realizadas reações de oxidação na molécula de polissacarídeo e de ativação do toxóide tetânico, visando a adição de grupamento amino na proteína. Deste modo, este trabalho teve como objetivo a caracterização dos componentes quimicamente modificados envolvidos na reação de conjugação bem como do glicoconjugado obtido, utilizando algumas técnicas físico-químicas recomendadas pela Organização Mundial de Saúde para o controle de vacinas meningocócicas conjugadas. A técnica de cromatografia de exclusão molecular mostrou que houve redução no tamanho molecular do polissacarídeo após a reação de oxidação. Esta reação não alterou a integridade estrutural da molécula oxidada, como mostrado pela espectroscopia de RMN ^1H , já que os deslocamentos químicos característicos do polissacarídeo nativo puderam ser observados. Além disso, a presença dos aldeídos gerados com a oxidação foi identificada pelo sinal de deslocamento químico em 8 ppm, e confirmada por método espectrofotométrico, a partir da reação com o reagente Purpald[®]. Com relação à reação de adição de grupos amino no toxóide tetânico, a espectroscopia de fluorescência mostrou que esta reação altera a conformação da molécula, como visto pelo deslocamento da emissão máxima do triptofano para o toxóide ativado em comparação com o toxóide tetânico original. O ensaio do TNBS confirmou que houve introdução de grupamentos amino no toxóide, que após a ativação apresentou maior quantidade destes grupamentos do que a molécula nativa. Contudo, a técnica de cromatografia de exclusão molecular não permitiu mostrar se esta reação altera o tamanho da proteína. Por fim, a eficiência da reação de conjugação foi confirmada por cromatografia de exclusão molecular, através da avaliação do perfil cromatográfico do glicoconjugado, em que não foram observados os picos referentes ao polissacarídeo oxidado e ao toxóide tetânico ativado. Além disso, o glicoconjugado apresentou um volume de eluição menor do que o de seus constituintes, indicando possuir peso molecular superior. A integridade estrutural do polissacarídeo não foi alterada com a conjugação, conforme verificado através da espectroscopia de RMN ^1H , pela manutenção dos deslocamentos químicos característicos do polissacarídeo original, inclusive o sinal em 2,15 ppm correspondente ao grupo O-acetil. Além disso, a conjugação parece não alterar a integridade estrutural da proteína conforme verificado pela espectroscopia de fluorescência que mostrou não haver diferença entre a emissão máxima do triptofano no glicoconjugado, quando comparado com o toxóide ativado. O presente trabalho é uma etapa preliminar da caracterização da vacina anti-meningocócica conjugada em desenvolvimento no LATEB e, de maneira geral, as técnicas aqui empregadas mostraram-se adequadas para o controle dos componentes e obtenção do glicoconjugado, entretanto, precisam ser validadas para possibilitar o

estabelecimento dos critérios para a produção de lotes vacinais homogêneos, seguros e eficazes.