

Estudo de otimização dos processos envolvidos na obtenção da vacina conjugada brasileira contra *Neisseria meningitidis* do grupo C

Felipe Rodrigues da Silva

RESUMO

No Brasil, a doença meningocócica (DM) representa um sério problema de saúde pública desde as epidemias causadas pelos grupos A e C na década de 70. Nos últimos cinco anos o grupo C foi responsável por 50% dos casos de DM no país, principalmente em crianças abaixo dos 5 anos de idade até adolescentes. Com o objetivo de produzir uma vacina brasileira contra o grupo C, Bio-Manguinhos tem desenvolvido uma vacina conjugada através da metodologia de aminação reductiva modificada, utilizando a anatoxina tetânica ativada com hidrazina, como proteína carreadora. Os ensaios clínicos de Fase I desta vacina experimental serão concluídos em setembro. No presente estudo, algumas etapas da produção experimental da vacina foram otimizadas para permitir a transferência da mesma para escala industrial. A avaliação da estabilidade do PSC oxidado estocado a -20°C , não mostrou alteração significativa de 36 horas até 30 dias após a produção, sugerindo que o processo de conjugação pode ser realizado neste período. A etapa estabelecida de oxidação do PSC utilizando periodato de sódio (23,4 mM) foi comparada com o tratamento utilizando menor quantidade deste reagente (6 mM) em um menor tempo de reação. Nesta condição, os polissacarídeos oxidados apresentaram maiores tamanhos moleculares, com menor concentração de grupos aldeídos e maior taxa de oxidação. O método do Ácido Bicinconínico (BCA) empregado para dosagem dos grupamentos aldeído mostrou-se apropriado. Os conjugados produzidos através dos polissacarídeos oxidados obtidos pelo processo menos drástico de oxidação apresentaram níveis inferiores de polissacarídeo livre quando comparado ao processo previamente estabelecido. O elevado conteúdo de polissacarídeo não conjugado presente nesses lotes pode ser justificado pela utilização da diálise para purificação e pela baixa eficiência da reação de conjugação. O método de diálise, empregado em função do tamanho dos lotes produzidos, é diferente do que foi utilizado para a produção da vacina nos estudos clínicos de Fase I. Os conjugados obtidos a partir dos polissacarídeos oxidados sob as condições testadas serão avaliados posteriormente em ensaios de imunogenicidade. A estabilidade da proteína ativada e estocada a -4°C foi de dois dias. O método do Trinitrobenzeno Sulfônico (TNBS), aplicado para quantificar grupos amino, foi eficiente para discriminar as diferenças entre a proteína nativa e a ativada. Em relação à otimização da reação de conjugação, a mesma quando efetuada em temperatura ambiente apresentou maiores quantidades de polissacarídeo livre do que na reação a 45°C . A utilização do NaBH_4 ao invés de NaCNBH_3 como agente redutor, mostrou bons resultados no bloqueio dos grupos aldeído e no consequente término da reação de conjugação. As etapas de purificação estabelecidas usando filtração tangencial foram avaliadas com o intuito de diminuir o tempo do processo e o volume gasto nas etapas de diafiltração. Quanto ao PSC oxidado, a etapa de concentração antes da diafiltração, usando três membranas, foi capaz de eliminar completamente os subprodutos. Os mesmos resultados foram obtidos na purificação da proteína ativada usando apenas uma membrana. Entretanto, utilizando a mesma abordagem para a purificação do conjugado, verificou-se que a metodologia foi capaz de eliminar o Ácido Adípico (ADH), mas não de remover o íon cianeto. Em

conclusão, os resultados deste estudo podem ser aplicados na produção escalonada da vacina experimental para os estudos clínicos de Fase II.