

Otimização do Processo de Obtenção, Separação e Purificação das Vesículas de Membrana Externa de *Neisseria meningitidis* Sorogrupo B

Denise Aparecida Ramos do Nascimento

RESUMO

A vacina anti-meningocócica contra o sorogrupo B, de origem cubana, utilizada nas campanhas vacinais de diversos países, inclusive o Brasil, apresentou eficácia variada de acordo com a faixa etária imunizada. Em crianças com idade abaixo de 2 anos, faixa etária mais afetada pela doença, a vacina apresentou baixa eficácia, o que motivou um projeto nacional para o desenvolvimento de uma vacina adequada ao quadro epidemiológico brasileiro. Para os sorogrupos A, B, C, W135 e Y, principais responsáveis pela doença meningocócica no mundo, existem vacinas polissacarídicas eficazes para adultos e vacinas conjugadas para crianças. Diante da baixa imunogenicidade apresentada pelo polissacarídeo oriundo de *N. meningitidis* sorogrupo B, surgiram novas perspectivas vacinais empregando-se estruturas de envoltório diferentes dos polissacarídeos. Nesta perspectiva se inclui o uso de vesículas de membrana externa como complexo antigênico constituído de fragmentos de membrana ricos em proteínas e endotoxina que podem induzir uma boa resposta imune. Utilizando tecnologia nacional, o Laboratório de Tecnologias Bacterianas da unidade de Bio-Manguinhos, na Fundação Oswaldo Cruz, está desenvolvendo a primeira vacina composta destas vesículas contra *N. meningitidis* sorogrupo B, que atualmente se encontra na etapa final da fase I do estudo clínico em adultos. No decorrer do processo de desenvolvimento da vacina, observou-se a necessidade de otimizar o processo de obtenção, separação e purificação das vesículas de membrana externa do meningococo para produção em escala industrial. Esta otimização teve como objetivo aumentar o rendimento do processo de obtenção e purificação das vesículas de membrana externa além de avaliar algumas etapas deste procedimento adequando-o aos equipamentos disponíveis na planta industrial da Unidade para produção dos antígenos bacterianos. Para isto, foram feitas variações na condição de cultivo e no método de separação da biomassa. Foi incluída neste estudo, a avaliação da cinética de liberação das vesículas durante o cultivo e a caracterização do perfil protéico dos produtos obtidos após as otimizações. As alterações sugeridas não modificaram as características padronizadas durante o desenvolvimento da vacina possibilitando seu uso nas próximas etapas dos estudos clínicos. O processo definido pelo presente estudo inclui o processo fermentativo com pO_2 30% e pH controlados, uso de centrífuga de fluxo contínuo para recolhimento de biomassa e ultrafiltração do sobrenadante da centrifugação em membrana de 100kDa. Ao avaliar a cinética de liberação das vesículas durante o processo fermentativo, identificamos que a coleta do cultivo em 12 horas, que já vinha sendo utilizado, é a melhor maneira para início do processo de purificação do produto. As modificações introduzidas (pO_2) em 2006 permitiram um aumento do rendimento de processo de 426% em massa de vesículas purificadas, em relação à condição de cultivo ($k_L a$) utilizada em 2005, o que representa uma perspectiva de aumento na produção de igual valor no número de doses de vacina/cultivo. O novo processo, definido por esse trabalho, será aplicado na obtenção dos antígenos para o estudo de fase II em crianças em que serão avaliadas a reatogenicidade e imunogenicidade da vacina brasileira.

