

Influencia sobre la respuesta inmune del tamaño del espaciador utilizado en la unión covalente de un polisacárido a una proteína

Maribel Cuello, Osmir Cabrera, Oliver Pérez, Judith del Campo, Carmen R. Soto, Miguel E. Martínez, Jonatan Hernández y Gustavo Sierra.

Instituto Finlay, Avenida 27 No. 19805, La Lisa, Apartado Postal 16017, Código Postal 1600, La Habana, Cuba.

Recibido: 3 de octubre de 2001. Aceptado: 14 de marzo de 2002.

Palabras clave: *Neisseria meningitidis*, inmunogenicidad, espaciadores, conjugados.
Key words: *Neisseria meningitidis*, immunogenicity, spacers, conjugates.

RESUMEN. Los brazos espaciadores son reactivos químicos orgánicos que presentan en su estructura, grupos funcionales útiles para la unión covalente con otras moléculas. Actualmente son varios los que se utilizan para la unión de dos antígenos con el objetivo de aumentar la inmunogenicidad de al menos uno de ellos. La influencia en la respuesta inmune del tamaño del espaciador usado en conjugados de polisacárido de *N. meningitidis* serogrupo C (PMGC) y toxoide tetánico (TT) fue evaluado en ratones Balb/c. Se utilizaron el 1,3-diaminopropano, el 1,6-diaminohexano y el 1,8-diaminooctano como espaciadores de diferentes largos de cadena carbonada unidos al PMGC y al TT por el método de la carbodiimida. Se determinó la generación de anticuerpos IgM antiPMGC, IgG antiPMGC e IgG antiTT en los sueros de los animales, por medio de un ELISA indirecto. También se evaluaron las subclases de IgG (IgG1 e IgG2a) antiPMGC. Los conjugados inoculados fueron capaces de inducir una mayor respuesta de anticuerpos IgG anti PMGC que el polisacárido nativo y fue dependiente del largo de la cadena carbonada del espaciador siendo significativamente superior con el 1,8-diaminooctano; en este grupo, también se encontró un aumento estadísticamente significativo de la IgG2a anti PMGC, lo que sugiere que la respuesta inmune ocurrió mediante inducción de un patrón celular. Se encontró un aumento significativo de la respuesta de IgG anti TT en los conjugados en comparación al TT nativo; aunque no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes espaciadores.

ABSTRACT. The spacer arms are organic chemical reagents that present in their structure, useful functional groups for the covalent union with other molecules. Up to now the moment there are several that are used for the union of two antigens with the objective of increasing the immunogenicity of at least one of them. The influence on immune response of spacer arms with different size used in *N. meningitidis* serogroup C polysaccharide (PMGC)-tetanus toxoid (TT) conjugated was evaluated in Balb/c mice. The 1,3-diaminopropan, 1,6-diaminohexane and 1,8-diaminooctane were used as spacer arms of different size, linked to PMGC and TT by using carbodiimide-mediated coupling. The generation of IgM anti PMGC, IgG anti PMGC and IgG anti TT was evaluated in serum from animals by an indirect ELISA. Also IgG subclasses (IgG1 and IgG2a) anti PMGC were evaluated. The IgG antibodies response of conjugate inoculated was significantly higher than native polysaccharide and this response was size spacer dependent, being significantly higher with 1,8-diaminooctane; a statistically significant increase of IgG2a subclasses was also found in this group. The data suggest that immune response was developed by induction of cellular pattern. The IgG antibodies response of conjugate inoculated was significantly higher than native TT, although significant differences among spacers were not found.

INTRODUCCION

Los principales microorganismos causantes de meningitis bacteriana, enfermedad de elevada incidencia a escala mundial son *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* y *Haemophilus influenzae*. En el mundo industrializado la incidencia anual es de uno a cinco muertes por cada cien mil infectados, mientras que en los países en vías de desarrollo esta es de treinta y cinco mil muertes por cada trescientos treinta mil infectados. Entre ellos, *N. meningitidis* es responsable de aproximadamente el 35 % de las infecciones meningocócicas, afectando fundamentalmente a niños entre tres meses y dos años de edad. Este puede presentarse como microorganismo no encapsulado o encapsulado, siendo este último el más común y su polisacárido capsular el de mayor virulencia. Se ha reportado que los anticuerpos contra la cápsula pueden ser protectores.¹

Existen varias vacunas disponibles comercialmente contra estas enfermedades basadas en el polisacárido capsular purificado a partir de cultivos bacterianos, los cuales han demostrado ser inmunogénicos en adultos, no así en niños pequeños, debido a su timo independiente (TI).² Este inconveniente se ha resuelto en los últimos años, con el surgimiento de las vacunas conjugadas,^{3,4} que consisten en la unión covalente entre un polisacárido y una proteína. Esta proteína al con-

jugarse cambia la tino independencia del polisacárido.⁵⁻⁷ En estas uniones, en ocasiones, se hace necesario la utilización de moléculas espaciadoras, también conocidas como brazos espaciadores, que cumplen varias funciones: funcionalizar a los antígenos para favorecer su unión y separar los dos antígenos con el objetivo de lograr un mejor reconocimiento por el sistema inmune.

Los brazos espaciadores son compuestos químicos que presentan en su estructura, una cadena carbonada y a lo largo de ella se encuentran grupos funcionales útiles para la unión covalente con otras moléculas. Actualmente son varios los que se utilizan para la unión de dos antígenos con el objetivo de aumentar la inmunogenicidad de al menos uno de ellos.

Los linfocitos T CD4⁺ pueden diferenciarse según la expresión de determinados marcadores en su superficie, así como según el patrón de citocinas en CD4 TH1 o CD4 TH2, la conjugación favorece que los antígenos TI se conviertan en tino dependientes (TD). Estos pueden desencadenar una respuesta inmune clasificada en T helper1 o T helper2 (Th1-Th2).^{8,9} El IFN γ y la interleukina-2 son características de la respuesta Th1 o celular, mientras que la IL-4 e IL-5 son más comunes en la respuesta Th2. Estos patrones de respuesta también tienen su expresión a nivel de los isotipos de anticuerpos;¹⁰ pues en murinos, la respuesta Th1 cursa con la producción de IgG y sobre todo, de la subclase IgG2a, mientras que la Th2 induce IgE y la subclase IgG1. Su expresión a nivel funcional se relaciona con la hipersensibilidad retardada y actividad bactericida en la respuesta Th1 y la anafilaxia en la respuesta Th2.

Este trabajo tuvo como objetivo la evaluación de la respuesta inmune en ratones, de conjugados obtenidos por la unión covalente del polisacárido de *N. meningitidis* serogrupo C y el toxoide tetánico como proteína portadora empleando diferentes brazos espaciadores. Además, se estudió el patrón de la respuesta inmune que se establece según el espaciador utilizado en el conjugado.

MATERIALES Y METODOS

Espaciadores

Los espaciadores utilizados en el estudio fueron: el 1,3-diaminopropano (Fluka 33260), el 1,6-diamino-

hexano (BDH 280273 G) y el 1,8-diaminooctano (Sigma D5299). Todos calidad ppa.

Polisacárido de *N. meningitidis* C (PMGC) y toxoide tetánico (TT)

El PMGC utilizado fue procedente de una cepa vacunal de *Neisseria meningitidis* serogrupo C (lot. 00019), así como el TT (Instituto Finlay, La Habana, Cuba).

Obtención de los conjugados

Para activar al polisacárido, se adicionó 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC, Sigma E7750) hasta una concentración final de 25 mg/mL a una disolución de 5 mg/mL de PMGC y se agitó durante 30 min a temperatura ambiente (TA). A continuación, se adicionó el espaciador (25 mg/mL, cada espaciador) y se dejó en agitación 4 h a 4 °C. Posteriormente, se dializó contra una disolución salina amortiguadora de fosfato (PBS) a 4 °C toda la noche.

Al día siguiente, a una disolución de 3 mg/mL de TT, se le adicionó EDAC hasta una concentración final de 25 mg/mL y se dejó en agitación a TA durante 30 min. Posteriormente, se le agregó (v/v) el polisacárido activado el día anterior y se agitó a TA durante 3 h a 4 °C. Transcurrido ese tiempo se dializó contra PBS pH 7,2 por toda la noche a 4 °C.

Como paso final del proceso, la disolución dializada se aplicó en una columna XK-26 (Amersham Pharmacia Biotech) con Sepharosa CL-4B y se colectó en primer lugar, la fracción eluida a 280 nm. A esta fracción se le determinó la concentración de proteína por el método de Lowry y el contenido de ácido siálico por el método de resorcinol. A los conjugados purificados se les adicionó 0,02 % de timerosal y se almacenaron a 4 °C.

Inmunización

Se utilizaron cinco grupos de ocho ratones cada uno de la línea Balb/c entre 18 y 22 g de peso al inicio del experimento. Cada grupo fue inmunizado con un conjugado diferente por vía intraperitoneal con tres dosis de 10 μ g (cada uno) de PMGC a los 0, 14 y 28 d. Como controles se emplearon el PMGC nativo y PBS. Los sueros fueron obtenidos previo a cada inoculación y a los 35 y 42 d de la primera dosis. Los sueros fueron colectados por separado y almacenados a -20 °C hasta el momento de su uso.

Determinación de anticuerpos IgG anti PMGC y anti TT

Se determinó la inmunogenicidad de los conjugados mediante una técnica ELISA de tipo indirecto, para lo cual se utilizaron placas de acetato de polivinilo (Costar 2595).

Para el recubrimiento de la fase sólida se utilizó una disolución de poli-L-lisina (Sigma P1399) a una concentración de 3 μ g/mL en PBS, de la cual se adicionaron 100 μ L por pocillo. La placa se incubó a temperatura ambiente por 30 min en una cámara húmeda. Posteriormente, se realizaron tres lavados con PBS a intervalos de 30 s y se adicionaron 100 μ L por pocillo de una disolución de polisacárido C a 2,5 μ g/mL en PBS. Mientras el TT (20 μ g/mL) se adsorbe directamente en las placas en una disolución amortiguadora de carbonato-hidrogenocarbonato 0,05 mol/L pH 9,6. Las placas se incubaron de 16 a 20 h a 4 °C en una cámara húmeda. Luego, se lavó tres veces a intervalos de 30 s cada uno con PBS. Se adicionaron las muestras en estudio, diluidas 1:200 y 1:400 en PBS + Tween 20 (0,05 %) y se incubó a 37 °C en una cámara húmeda. Se realizaron tres lavados en condiciones idénticas a los anteriores y se añadieron 100 μ L por pocillo de un conjugado anti IgG de ratón-peroxidasa (Sigma 3742) en PBS a una dilución de 1/2 000. Las placas se incubaron durante 1 h a 37 °C en cámara húmeda. Finalmente, se realizaron cinco lavados con PBS + Tween 20 (0,05 %) y se añadió el sustrato o-fenilendiamina (Merck 7243) en disolución amortiguadora citrato pH 5 + H₂O₂, se incubó durante 30 min en la oscuridad a temperatura ambiente y la reacción se detuvo con la adición de 50 μ L/pocillo de ácido sulfúrico 2 mol/L. Posteriormente, se realizó la determinación a 492 nm en un lector de placas de ELISA (Titertek Multiskam).

Determinación de subclases de IgG anti PMGC

La determinación de subclases de IgG se realizó mediante un ELISA¹¹ de amplificación biotinstreptavidina en placas de poliestireno de 96 pocillos (Maxisorp, Nunc). Luego de un tratamiento con 100 μ L/pocillo de poli-L-lisina (3 μ g/mL) durante 30 min a temperatura ambiente en cámara húmeda y de un lavado con PBS/Tween-20, se recubrió con una disolución de PMGC (5 μ g/mL) y se dejó incuban-

do toda la noche en una cámara húmeda a 4 °C. Luego del correspondiente lavado, se bloqueó con PBS/BSA/Tween 20. Las muestras a evaluar se diluyeron 1:100 en PBS/BSA/Tween 20 y se incubaron toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, se lavó tres veces la placa con (200 µL/pocillo cada vez) PBS/Tween-20 y se añadieron los conjugados anti IgG1 o IgG2a biotinilado (Sigma) y se realizó un nuevo lavado en las mismas condiciones que los anteriores. Se añadió streptavidina marcada con peroxidasa (Sigma). Como sustrato se utilizaron 100 µL/pocillo del sustrato *o*-fenilendiamina (Merck 7243) en disolución amortiguadora de citrato a pH 5 + H₂O₂. Se incubó durante 30 min en la oscuridad a temperatura ambiente y la reacción se detuvo con la adición de 50 µL/pocillo de ácido sulfúrico 2 mol/L. Posteriormente, se realizó la determinación a 492 nm en un lector de placas de ELISA (Titertek Multieskam).

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados fue realizado mediante un análisis de varianza (ANOVA), con un nivel de significación del 95 % para normalizar su distribución. En caso de encontrar diferencias, se usaron las pruebas de comparaciones múltiples de LSD (menor diferencia significativa). Se utilizó el paquete estadístico Statgraphics plus (Versión 2.1), así como también, se utilizó el programa Microsoft Excel para la determinación de las medias y desviación estándar de los resultados obtenidos mediante el ELISA.

RESULTADOS Y DISCUSION

Diferentes brazos espaciadores utilizados para la conjugación del polisacárido capsular de *H. influenzae* tipo b (PRP) con diferentes proteínas transportadoras para su uso vacunal, han sido reportados por otros autores.^{4,12-14} Entre ellos, se encuentran las vacunas: Act-Hib de Pasteur Merieux que utiliza la dihidroxida del ácido adípico para la unión del PRP al TT,¹⁵ ProHibit de la Connaught para la unión del PRP al toxoide diftérico emplea el mismo espaciador que utiliza Pasteur Merieux, HbOC de la Biocine-Sclavo utiliza el ácido aminocaproico en su vacuna de PRP-CRM,^{3,16} y Pedvaxhib de Merck, Sharp & Dohme utiliza el 1,4-diaminobutano en su vacuna de PRP unido al complejo de proteínas de membrana

externa de *N. meningitidis* B.¹⁷ En todos los casos mencionados anteriormente es conocido que dichas vacunas son eficaces en niños menores de dos años de edad.¹⁸

Debido a que existen diferencias desde el punto de vista del proceso de obtención de dichas vacunas y que no siempre se utiliza la misma proteína transportadora, se hace imposible la comparación del efecto de la longitud de los brazos espaciadores utilizados en la inmunogenicidad.¹⁹ Por ello, se utilizaron en este trabajo los mismos antígenos (PMGC y TT) e igual método de conjugación, variando solamente los espaciadores utilizados, de manera que la diferencia en la respuesta inmune que generaran los conjugados pudiera estar asociada a las diferencias que existieran en los espaciadores empleados.

Al determinar la respuesta de anticuerpos IgM anti PMGC en los sueros de los animales en estudio

(Fig. 1) se observó que la respuesta de IgM inducida por los conjugados con los diferentes espaciadores fueron similares entre sí y no se detectaron diferencias significativas entre ellos ($P = 0.05$), siendo además superior a la inducida por el PMGC nativo ($P > 0,05$). Un ligero incremento se observó a los 42 d con el conjugado que tenía como brazo espaciador al 1,8-diaminooctano no significativo, mientras que los otros dos conjugados mostraron O muy similares. Teniendo en cuenta estos resultados, se pudiera plantear que el largo del brazo espaciador no influye en la respuesta primaria.

Conociendo que la conjugación permite que los antígenos TI se conviertan en TD y que la respuesta de estos últimos está caracterizada por la inducción de anticuerpos del tipo IgG, se realizó la determinación de este isotipo de anticuerpos en los sueros de los animales (Fig. 2). Se observó que como consecuencia de

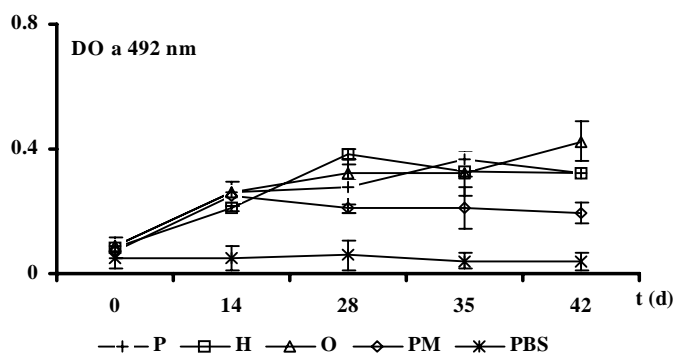


Fig. 1. Determinación de la respuesta de anticuerpos IgM antipolisacárido de *N. meningitidis* serogrupo C (PMGC) en los sueros de ratones Balb/c inmunizados con tres dosis (días: 0, 14 y 28) de conjugados obtenidos a partir del PMGC con diferentes brazos espaciadores y el TT como proteína transportadora. Los conjugados utilizados en el estudio fueron: P = PMGC-1,3-diaminopropano-TT; H = PMGC-1,6-diaminohexano-TT; O = PMGC-1,8-diaminooctano-TT; PM = PMGC y PBS = disolución reguladora fosfato salino.

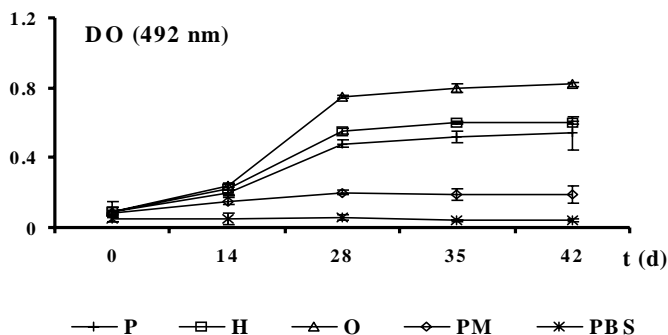


Fig. 2. Determinación de la respuesta de anticuerpos IgG antipolisacárido de *N. meningitidis* serogrupo C (PMGC) en los sueros de ratones Balb/c inmunizados con tres dosis (días: 0, 14 y 28) de conjugados obtenidos a partir del PMGC con diferentes brazos espaciadores y el TT como proteína transportadora. Los conjugados utilizados en el estudio fueron: P = PMGC-1,3-diaminopropano-TT; H = PMGC-1,6-diaminohexano-TT; O = PMGC-1,8-diaminooctano-TT; PM = PMGC y PBS = disolución reguladora fosfato salino.

la primera dosis no se obtuvo una respuesta de IgG superior en los conjugados respecto al PMGC nativo, sin embargo, después de la segunda dosis, los conjugados incrementaron significativamente la respuesta ($P > 0,05$), mientras que el PMGC nativo no lo hizo. También se pudo observar que no existieron diferencias significativas ($P > 0,05$) en la respuesta cuando se utilizaron los conjugados obtenidos con el 1,3-diaminopropano y el 1,6-diaminohexano, mientras que cuando se utilizó el 1,8-diaminooctano los títulos de anticuerpos incrementaron significativamente a partir de los 35 d. Este incremento pudiera deberse a que este compuesto presenta la cadena carbonada más larga entre los grupos funcionales terminales (aminos).

Para profundizar el perfil de la respuesta inducida, se determinaron las subclases de IgG (IgG1 e IgG2a) (Fig. 3) y se encontró que en todos los casos hubo predominio de la subclase IgG1 y no se observaron diferencias significativas ($P = 0,05$) entre los conjugados; sin embargo, la subclase IgG2a aumentó con el 1,8-diaminooctano, lo cual podría explicar el hecho de que no existan diferencias significativas en la IgG1 antiPMGC y sí haya una mayor respuesta de IgG para este espaciador.

El hecho de que se logró una elevada respuesta de tipo IgG en los conjugados y específicamente de la subclase IgG1, indica que con el proceso de conjugación empleado para la obtención de los conjugados con los diferentes espaciadores se logra cambiar la tino independencia del polisacárido utilizado, lo cual coincide con lo reportado por otros autores.^{8,9} Por otra parte, el haber obtenido los títulos más elevados de IgG en general con todos los conjugados y de IgG2a en particular con el 1,8-diaminooctano, indica que a medida que se aumenta la cadena carbonada en el espaciador que se utiliza en la conjugación, al menos en los tamaños evaluados, es mejor la presentación del polisacárido al sistema inmune y por tanto, mayor la respuesta de anticuerpos IgG; incluso sería posible obtener compuestos vacunales que induzcan un patrón Th1, partiendo de un antígeno TI, con solo utilizar el espaciador adecuado.

Al realizar la determinación de anticuerpos IgG anti TT (Fig. 4) se observó que como resultado de la primera inoculación, no se obtuvo respuesta de anticuerpos IgG espe-

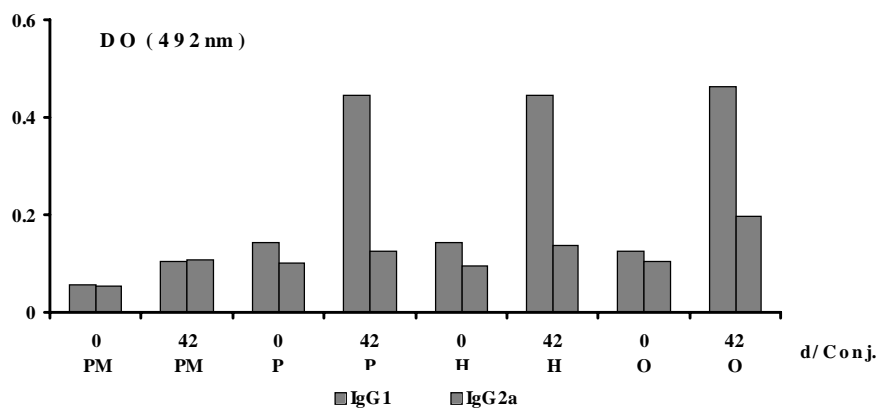


Fig. 3. Determinación de subclases de anticuerpos IgG anti PMGC en sueros de ratones Balb/c inmunizados con tres dosis (días: 0, 14 y 28) de conjugados obtenidos a partir del PMGC, diferentes brazos espaciadores y el TT como proteína transportadora. P = PMGC-1,3-diaminopropano-TT. H = PMGC-1,6-diaminohexano-TT. O = PMGC-1,8-diaminooctano-TT. PM = PMGC.

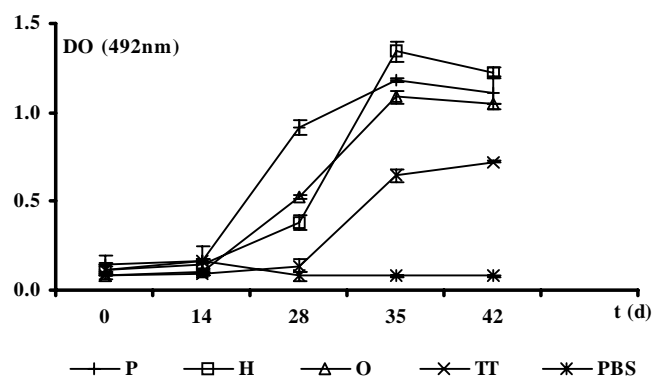


Fig. 4. Determinación de la respuesta de anticuerpos IgG antitoxoide tetánico en los sueros de ratones Balb/c inmunizados con tres dosis (días: 0, 14 y 28) de conjugados obtenidos a partir del PMGC, diferentes brazos espaciadores y el TT como proteína transportadora. Los conjugados utilizados en el estudio fueron: P = PMGC-1,3-diaminopropano-TT. H = PMGC-1,6-diaminohexano-TT. O = PMGC-1,8-diaminooctano-TT. TT = toxoide tetánico y PBS = disolución reguladora fosfato salino.

cíficos para ninguno de los conjugados. Sin embargo, después de la segunda dosis se pudo apreciar una elevada respuesta con los conjugados, no así para el TT nativo, ya que para este, se obtuvo una buena respuesta solo a partir de la tercera dosis y que no llegó a ser tan elevada como la respuesta obtenida con los conjugados. Estos resultados parecen indicar que la conjugación no solo influye en la respuesta contra el PMGC, sino que también influye aumentando la respuesta inmune contra la proteína portadora. Con relación a los conjugados, no se observaron diferencias significativas en la respuesta de anticuerpos obtenida entre ellos a los 42 d.

CONCLUSIONES

Los resultados indican que la longitud de la cadena carbonada del espaciador utilizado, en la unión covalente del polisacárido con la proteína, no ejerce gran influencia

en la respuesta inmune primaria generada en los animales después de la inoculación de los conjugados, lo cual no ocurre con la respuesta inmune secundaria, en la que se puede observar que cuando aumenta el largo de la cadena carbonada del espaciador, aumenta también la respuesta de anticuerpos IgG en los animales. Los títulos de anticuerpos IgG más elevados se observan para los conjugados que presentan en su composición al 1,8-diaminooctano, mientras los títulos de anticuerpos IgG más bajos corresponden al conjugado que contiene al 1,3-diaminopropano en su estructura. Al aumentar el largo de la cadena carbonada del espaciador utilizado, se produce un cambio en la respuesta inmune de los animales, la cual transita de TH2 a TH1.

También se pudieron observar elevados títulos de anticuerpos IgG anti-TT en los sueros de los animales inoculados con los diferentes

conjugados indicativos de la ausencia de alteraciones en sus propiedades antigénicas con el proceso de conjugación utilizado.

BIBLIOGRAFIA

1. Poolman J.T. Development of a meningococcal vaccine. **Infect. Agents Dis.**, 4, 13, 1995.
2. King W.J., McDonald N.E., Wells G., Huang J., Allen U., Chan F., Ferris W., Diaz-Miltoma F. and Ashton F. Total and functional antibody response to a quadrivalent meningococcal Polysaccharide vaccine among children. **Journal Pediatrics**, 128, 197, 1996.
3. Bartoloni A., Norelli F., Ceccarini C., Rappuoli R. and Costantino P. Immunogenicity of meningococcal B polysaccharide conjugated to tetanus toxoid or CRM197 via adipic acid dihydrazide. **Vaccine**, 13, 463, 1995.
4. Klug B. Stability testing in *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. **Dev. Biol. Stand.**, 87, 263, 1996.
5. Jennings H.J. and Lugowski C. Immunochimtry of groups A, B and C meningococcal polysaccharide tetanus toxoid conjugates. **Journal Immunol.**, 127, 1011, 1981.
6. Beuvery E.C., Miedema F., van Delft R., and Haverkamp K. Preparation and immunochemical characterization of meningococcal serogroup C polysaccharide-tetanus toxoid conjugates as a new generation of vaccines. **Infect. Immun.**, 40, 39, 1983.
7. Shaffer D.E., Toll B., Schuman R.F., Nelson B.L., Mond J.J. and Lees A. Activation of soluble polysaccharide with 1-cyano-4-dimethylamino pyridinium tetrafluoroborate (CDAP) for use in protein-polysaccharide conjugate vaccines and immunological reagents. II. Selective crosslinking of proteins to CDAP-activated polysaccharide. **Vaccine**, 18, 1273, 2000.
8. Mossman T.R., Cherwinski H., Bond M.W., Giedlin M.A. and Coffman R.L. Two types of murine helper T cells clone I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J. Immunol.**, 136, 2348, 1986.
9. Pawlowski A., Kallenius G., Svenson S.B. A new method of non cross-linking conjugation of polysaccharide to proteins via thioether bonds for the preparation of saccaride-protein conjugate vaccines. **Vaccine**, 17, 1474, 1999.
10. Peeters C.C.A., Tenbergen-Meekes A.M., Poolman J.T., Beurret M., Zegers B.J.M. and Rijkers G.T. Effect of carrier priming on immunogenicity of Saccharide-Protein conjugate vaccine. **Infect. and Immun.**, 59, 3504, 1991.
11. Ruthus S., Driedijk P.C., Weening R.S., and Out TA. ELISA procedures for the measurement of IgG subclass antibodies to bacterial antigens. **J. Immunol. Methods**, 140, 67, 1991.
12. Schneerson R., Barrera O., Sutton A., Robbins J.B. Preparation, characterization and immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-protein conjugate. **J. Exp. Med.**, 152, 361, 1980.
13. Anderson P.W., Pichichero M.E., Stein E.C., Porcell S., Betts R.F., Connuck D.M., Korones D., Insel R.A., Zahradnik J.M., Eby R. Effect of oligosaccharide chain length, exposed terminal group, and hapten loading on the antibody response of human adults and infants to vaccines consisting of *Haemophilus influenzae* type capsular antigen uniterminally coupled to diphtheria protein CRM 197. **J. Immunol.**, 142, 2464, 1989.
14. Einhorn M.S., Weinberg G.A., Anderson E.L., Granoff P.D., Granoff D.M. Immunogenicity in infants of *Haemophilus influenzae* type polysaccharide in a conjugate vaccine with *Neisseria meningitidis* outer-membrane protein. **Lancet**, 2, 299, 1986.
15. Decker M.D., Edwards K.M., Bradley R., Palmer P. Comparative trial in infants of four conjugate *Haemophilus influenzae* type b vaccines. **J. Pediatr.**, 120, 184, 1992.
16. Jones R.G., Bass J.W., Weisse M.E., Vicent J.M. Antigenuria after immunization with *Haemophilus influenzae* oligosaccharide CRM₁₉₇ conjugate (HbOC) vaccine. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, 161, 557, 1991.
17. Ahonkhai VI., Lukacs L.J., Jonas L.C., et al. *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine (meningococcal protein conjugate) (PedvaxHib): clinical evaluation. **Pediatrics**, 85 (Suppl.), 676, 1990.
18. Eskola J. and Kayhty H. Ten years experience with *Haemophilus influenzae* type b (Hib) conjugate vaccines in Finland. **Rev. Med. Microbiol.**, 7, 231, 1996.
19. Poolman J.T. Polysaccharides and Membrane Vaccines. In A. Mizrahi (ed.), *Bacterial Vaccines*. Wiley-Liss, New York, 57, 1990.



RESULTADOS CIENTIFICOS DESTACADOS
MINISTERIO DE EDUCACION SUPERIOR DE CUBA

VACUNA CONTRA EL *Haemophilus influenzae* TIPO B A PARTIR DE UN NUEVO ANTÍGENO SINTÉTICO CONJUGADO A LA ANATOXINA TETÁNICA. DESARROLLO EXITOSO HASTA LAS FASES INICIALES DEL ENSAYO CLÍNICO

Centro de Estudios de Antígenos Sintéticos, Universidad de la Habana.

El Haemophilus influenzae tipo b (Hib) es una bacteria Gram negativa que ha sido identificada como un importante agente patógeno que provoca serios problemas de salud, fundamentalmente en los niños menores de cinco años, la cual evoluciona, en muchas ocasiones, hacia formas graves de meningitis y neumonías. Su tratamiento requiere de medicamentos de elevado costo y llega a cobrar vidas de infantes o deja secuelas permanentes que limitan la calidad de vida del paciente.

Disponer de una vacuna conjugada monovalente anti-Hib cubana, resolverá este problema y tiene, además, grandes posibilidades en el mercado internacional en una vacuna combinada bivalente con hepatitis b.

Desde 1989, el Laboratorio de Antígenos Sintéticos viene trabajando en un proyecto de vacuna conjugada contra esa enfermedad. En 1997, se logró obtener un primer prototipo de vacuna, que fue un paso importante en el proyecto, pues logró demostrar la inmunogenicidad del preparado realizado.

Posteriormente, se desarrolló un nuevo método para la obtención del antígeno, con el que se lograron rendimientos muy superiores, se modificó el procedimiento de conjugación y se organizó la producción en etapas y se realizó el escalado. Los estudios permitieron caracterizar el nuevo producto y demostrar su inmunogenicidad.

Los ensayos clínicos fase 1 en adultos fueron exitosos y se demostró categóricamente que el preparado es inocuo y no produce reacciones adversas importantes.

Colaboran en el proyecto, el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", Instituto Finlay, Centro Nacional de Biopreparados, Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio y otros.