

Inmunogenicidad de conjugados de polisacárido de *Neisseria meningitidis* serogrupo C unido al toxoide tetánico por diferentes brazos espaciadores

Osmir Cabrera,* Maribel Cuello, Oliver Pérez, Judith del Campo, Mildrey Fariñas y Gustavo Sierra.

Instituto Finlay. Avenida. 27 No. 19805, La Lisa, Apartado Postal 16017, Código Postal 11600, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 11 de julio de 2003. Aceptado: 22 de diciembre de 2003.

Palabras clave: *Neisseria meningitidis*, Inmunogenicidad, brazos espaciadores, vacunas conjugadas.
Key words: *Neisseria meningitidis*, Immunogenicity, spacer arms, conjugates vaccines.

RESUMEN. El desarrollo de las vacunas conjugadas compuestas por polisacáridos unidos covalentemente a proteínas contra *Haemophilus influenzae* type b, han demostrado ser eficaces en infantes, lo que condujo al desarrollo activo de las vacunas conjugadas contra otros microorganismos por varios grupos de investigación. La influencia en la respuesta inmune de la estructura de los brazos espaciadores utilizados en conjugados de polisacárido de *N. meningitidis* serogrupo C (PMGC)-toxoides tetánicos (TT) fue evaluado en ratones Balb/c. Se determinó la generación de anticuerpos IgG anti-PMGC e IgG anti-TT en los sueros de los animales inoculados por medio de un ELISA indirecto. También se evaluaron las subclases de anticuerpos IgG1 e IgG2a anti PMGC. El 1,6-diaminohexano (AH), el 1,8-diaminooctano (AO), el ácido 6-aminohexanoico (AA) y la dihidrazida del ácido adípico (ADH), fueron utilizados como brazos espaciadores con diferentes estructuras químicas, unidos al PMGC y al TT por medio de la reacción con carbodiimida. El suero de todos los ratones que fueron inoculados con los conjugados presentaron elevados títulos de IgG anti-PMGC y los valores más elevados se encontraron en los sueros de animales inoculados con el conjugado en los que se utilizó al ADH como brazo espaciador. En los grupos de animales inmunizados con los conjugados que utilizaron al AO y al ADH se detectaron títulos de IgG2a superiores a los detectados para el PMGC no conjugado; se observaron los títulos de IgG2a más elevados en los sueros de ratones inmunizados con conjugados con ADH. Las concentraciones de anticuerpos IgG anti-TT observados en los sueros de los ratones inmunizados con los conjugados fueron más elevados que los determinados en el suero de animales inmunizados con el TT. Se concluyó que la respuesta inmune obtenida en los ratones después de ser inoculados con los conjugados varía en dependencia del brazo del espaciador utilizado, siendo más elevada cuando se utiliza el ADH.

ABSTRACT. The development of polysaccharide-protein conjugate vaccines for *Haemophilus influenzae* type b, which have proven to be efficacious in infants and young children, has led to active development by a number of investigators of conjugate vaccines for other diseases. The influence on immune response of the structure of spacer arms used in *N. meningitidis* serogroup C polysaccharide (MGCP)-tetanus toxoid (TT) conjugate was evaluated in Balb/c mice. The IgG anti-MGCP and IgG anti-TT elicited in sera of mice immunized with conjugates and MGCP unconjugated, were evaluated by an ELISA method. The IgG subclass (IgG1 and IgG2a) anti-MGCP elicited in sera of animals immunized with conjugates and MGCP unconjugated, were also evaluated. 1,6-diaminohexane (AH), 1,8-diaminooctane (AO), 6-aminohexanoic acid (AA) and adipic acid dihydrazide (ADH) were used like spacer arms with different structure, linked to MGCP and TT using carbodiimide-mediated coupling. All mice that were inoculated with conjugates, showed high titles of IgG anti-MGCP, but the higher titles were found in sera of mice immunized with conjugates with ADH as spacer arm. In serum of mice immunized with conjugates with AO or ADH were detected higher titles of IgG2a anti-MGCP than in mice immunized with MGCP unconjugated, and the higher titles of IgG2a anti-MGCP were observed in sera of

mice immunized with conjugates with ADH. Higher levels of anti-TT antibodies were observed in sera of mice immunized with conjugates than titles observed in sera of mice immunized with TT itself. As conclusion, it was obtained that the immune response of conjugates varied in dependence of chemical structure of spacer arms used in the link MGCP to TT, being higher when it is used ADH.

INTRODUCCION

Las meningitis meningocócicas constituyen un problema de salud mundial, ocurriendo en ambas formas: epidémica y endémica,¹ siendo los serogrupos más importantes: A, B, C, Y y W135. Aunque el serogrupo B es el más frecuentemente aislado en los casos de enfermedades por este germen, la incidencia del meningococo del serogrupo C se ha incrementado en años recientes en Europa² y Canadá.³

Existen varias vacunas comerciales disponibles contra estas enfermedades basadas en el polisacárido capsular purificado a partir de cultivos bacterianos, las cuales han demostrado ser inmunogénicas en adultos, no así, en niños pequeños, debido a su timo independencia (TI).² Este inconveniente se ha resuelto en los últimos años, con el surgimiento de las vacunas conjugadas,^{4,6} que consisten en la unión covalente entre un polisacárido y una proteína. Esta proteína al conjugarse, cambia la timo independencia del polisacárido.⁷⁻¹² En estas uniones, en ocasiones, se hace necesario la utilización de moléculas

espaciadoras, también conocidas como brazos espaciadores, que cumplen dos objetivos: 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.

Es evidente que estas vacunas conjugadas difieren en un número de criterios esenciales tales como: peso molecular, longitud de las moléculas de los sacáridos, la proteína transportadora, la unión (presencia o no de brazos espaciadores) y el grado de sustitución de la proteína con el sacárido. Estas diferencias hacen que sea más difícil relacionar la potencia de las vacunas conjugadas con la estructura de cada una de ellas.⁸

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la respuesta inmune de ratones, inducida contra conjugados obtenidos por la unión covalente del polisacárido de *N. meningitidis* serogrupo C, el toxoide tetánico como proteína portadora y brazos espaciadores con diferentes estructuras químicas. Por otro lado, estudiar 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: ácido 6-aminohexanoico (AA) (Fluka), 1,6-diaminohexano (AH) (BDH), 1,8-diaminooctano (AO) (Sigma) e dihidrazida del ácido adípico (ADH) (Sigma). Todos de calidad certificada puro para análisis.

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

El PMGC utilizado fue procedente de una cepa vacunal de *Neisseria meningitidis* serogrupo C (Lote P-9016 con Kav = 0,2) producido en la planta 3 del Instituto Finlay, Ciudad de La Habana, Cuba y el TT (Lote 028/96 con 1 500 Lf) fue producido en la planta 2, también de ese Instituto. Ambos fueron obtenidos con buenas prácticas de producción.

Obtención de los conjugados

Para activar al polisacárido, se le adicionó 1-etil-3-(3-dimetilamino-propil)-carbodiimida (EDAC, Sigma E7750) a una disolución de 5 mg/mL de PMGC. Se dejó en agitación por 30 min, se le adicionó el espaciador y se dejó en agitación 4 h. Luego, se dializó contra disolución reguladora de fosfato salino (PBS, pH 7,2)

a 4 °C toda la noche. Al día siguiente, se le adicionó una disolución de 1 mg/mL TT y se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 30 min. Se le agregó (v/v) la disolución de polisacárido activado el día anterior y se dejó agitando a temperatura ambiente por 3 h. Transcurrido este tiempo, se dializó con PBS toda la noche a 4 °C.

Como paso final del proceso, el dializado se aplicó en una columna XK-26 con sepharosa CL-4B, de la que se recogió la fracción eluida a 280 nm. A esta, se le determinó la concentración de proteína por el método de Lowry¹³ y el contenido de ácido siálico por el método del resorcinol.¹⁴ Los conjugados resultantes fueron almacenados a 4 °C con 0,02 % de timerosal adicionado.

Determinación de PMGC libre en los conjugados

A los conjugados obtenidos se les determinó el porcentaje de polisacárido libre a través de una precipitación antígeno-anticuerpo en sueros con elevados títulos anti-TT. Para realizar la técnica, se tomaron 0,5 mL de conjugado y se le adicionaron 0,5 mL del suero anti-TT (Instituto Finlay), se incubó a 37 °C durante 1 h. Posteriormente, se le añadieron 350 µL de una disolución de polietilenglicol 6000 en PBS (1 : 3 m/v) y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 45 min; se centrifugó a 10 000 r/min por 40 min; se decantó el sobrenadante y a este, se le determinó el PMGC presente.

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 µg (cada uno) de PMGC a los 0, 14 y 28 d. Como controles se emplearon el PMGC nativo y PBS. Los sueros fueron obtenidos previamente a cada inoculación y a los 35 y 42 d de la primera dosis. Fueron colectados por separado y almacenados a -20 °C hasta su uso.¹⁵

Determinación de anticuerpos IgG anti-PMGC y anti-TT

Se determinó la inmunogenicidad de los conjugados mediante la técnica ELISA, para lo cual, se utilizaron placas de acetato de polivinilo (Costar 2595). Como antígenos de recubrimiento se utilizó el polisacárido de *N. meningitidis*

serogrupo C de partida, el cual, se fijó después de un tratamiento previo con Poli-L-lisina (3 µg/mL) (Sigma P1399)¹⁶ y el TT de partida en disolución reguladora de carbonato pH 9,6.¹⁷ Las muestras se diluyeron 1 : 400 y 1 : 200 en PBS-Tween 20, respectivamente. Se utilizó un conjugado anti-IgG de ratón unido a peroxidasa (Sigma 3742). Como sustrato se utilizó o-fenilendiamina (Merck 7243) y la absorbancia se midió en un equipo Titertek Multiskan a una λ de 492 nm.

Determinación de subclases de IgG anti-PMGC

La determinación de subclases de IgG en sueros de ratones inmunizados, se realizó mediante un ELISA de amplificación biotina-streptavidina en placas de poliestireno de 96 pocillos (Maxisorp, Nunc). Luego de un tratamiento con 100 µL/pocillo de Poli-L- Lisina (3 µg/mL) durante 30 min a temperatura ambiente en cámara húmeda y un lavado con PBS/Tween-20 (disolución de lavado), se recubrió con una disolución de PMGC (5 mg/mL) y se dejó toda la noche en una cámara húmeda a 4 °C. Luego del correspondiente lavado, se bloqueó con PBS-BSA- Tween 20 por incubación a temperatura ambiente en cámara húmeda por 1 h. Las muestras utilizadas fueron aplicadas en una dilución 1 : 100 en PBS-BSA-Tween 20 y se incubaron toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, se lavó la placa con la disolución de lavado y se añadieron los conjugados anti-IgG1 o IgG2a biotinilados (Sigma). Luego de un paso de lavado idéntico a los anteriores, se añadió streptavidina (Sigma). Como sustrato se utilizó 100 µL/pozo de H₂O₂ al 0,15 % con o-fenilendiamina (1 mg/mL) (Sigma) y se detuvo la reacción con H₂SO₄ 2,5 mol/L. La absorbancia se midió a 492 nm en el lector de ELISA.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los resultados fue utilizado un análisis de varianza (ANOVA), con un nivel de significación del 95 % para normalizar su distribución. Cuando se encontraron diferencias, se usaron las pruebas de comparaciones múltiples de LSD (menor diferencia significativa). Se utilizó el programa estadístico Statgraphics Plus (V.2.1), así como también, el Microsoft Excel para la determinación de las medias y la desviación estándar de los resultados obtenidos con el ELISA.

RESULTADOS

Composición de los conjugados

Los grupos aminos incorporados en la cadena polisacáridica, la relación molar PMGC/TT, así como los rendimientos de los conjugados obtenidos en todos los experimentos ($n = 5$) con los diferentes brazos espaciadores fueron similares (Tabla 1). El ensayo de contrainmuno difusión mostró bandas de precipitación anti-PMGC para todos los conjugados, así como también, para el PMGC nativo.

Determinación de anticuerpos IgM específico anti-PMGC

La respuesta de anticuerpos IgM anti-PMGC fue medida en todos los sueros y los títulos observados fueron bajos, incluso en los sueros de los animales inmunizados con el PMGP nativo y no se encontraron diferencias significativas entre los conjugados.

Determinación de anticuerpos IgG anti-PMGC

La cinética de producción de anticuerpos IgG fue medida en los sueros de los animales por ELISA y se observó que los conjugados preparados con ADH y AO produjeron aumentos estadísticamente significativos en las concentraciones de anticuerpos IgG anti-PMGC después de la segunda dosis (día 28). Sin embargo, después de la tercera dosis, las concentraciones de anticuerpos IgG detectados en los sueros de los animales inmunizados con los conjugados, aumentaron significativamente en el día 42 ($P < 0.05$) (Tabla 2).

Los títulos de anticuerpos IgG anti-PMGC más elevados fueron observados en los sueros de los animales inmunizados con el conjugado que utilizó al ADH como brazo espaciador (Tabla 2).

Determinación de subclases de anticuerpos IgG anti-PMGC

Se observó que el incremento de la concentración de anticuerpos IgG anti-PMGC obtenido contra los conjugados preparados con AH o AA fue debido fundamentalmente al incremento de la subclase IgG1, ya que para la IgG2a no se observó un incremento significativo de los títulos después de la tercera dosis (día 42) ($P = 0,01$) (Fig. 1). Sin embargo, para los conjugados con ADH y AO, sí se observó un incremento significativo de los títulos de anticuerpos en ambas subclases (IgG1, IgG2a), siendo superiores los títulos

Tabla 1. Caracterización de los conjugados.

Conjugado (n = 5)	NH ₂ en PMGC (mmol)	PMGC	Proteína	PMGC/TT	PMGC libre
		(mg · mL ⁻¹)			(%)
PMGC-AA-TT	–	1,18	1,60	0,74	25
PMGC-AH-TT	1,57	1,14	1,32	0,86	22
PMGC-AO-TT	1,67	0,86	1,05	0,82	23
PMGC-ADH-TT	1,52	1,54	1,74	0,88	20

PMGC Polisacárido de meningococo grupo C. TT Toxide tetánico. AA Acido 6-aminohexanoico. AH 1,6-diaminohexano. AO 1,8-Diaminooctano. ADH Dihidrazida del ácido adipico.

Tabla 2. Títulos de anticuerpos IgG anti-PMGC obtenidos en sueros de ratones Balb/c después de ser inmunizados con conjugados de PMGC con diferentes brazos espaciadores y TT como proteína transportadora.

Conjugado	GMT ($\pm$ DE)			Ratones positivos /ratones muestreados
	14	28 (d)	42	
PMGC	356 ($\pm$ 3,5)	461 ($\pm$ 7,5)	352 ($\pm$ 4,9)	7/8
PMGC-AA-TT	304 ($\pm$ 12,9)	522 ($\pm$ 11,7)	682 ($\pm$ 13,3)	9/10
PMGC-AH-TT	339 ($\pm$ 7,7)	959 ($\pm$ 10,8)	1 118 ($\pm$ 5,6)	10/10
PMGC-AO-TT	389 ($\pm$ 15,0)	1 626 ($\pm$ 12,4)	1 942 ($\pm$ 14,0)	10/10
PMGC-ADH-TT	1 432 ($\pm$ 9,8)	15 773 ($\pm$ 12,4)	16 116 ($\pm$ 11,7)	10/10

GMT Media geométrica de los títulos de anticuerpos (U/ mL). DE Desviación estándar. AA Acido 6-aminohexanoico. AH 1,6-diaminohexano. AO 1,8-diaminooctano. ADH Dihidrazida del ácido adipico. $n = 5$. Ratones positivos Ratones que respondieron positivamente.

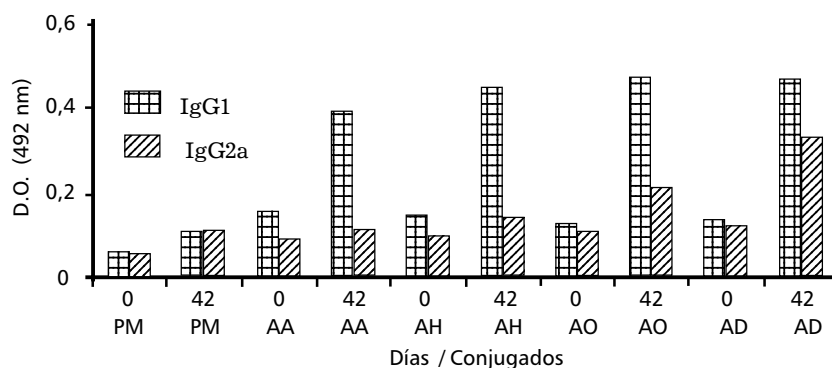


Fig. 1. Subclases de anticuerpos IgG (IgG1, IgG2a) anti-PMGC producidos en los sueros de ratones inmunizados con los conjugados en estudio. Títulos por ELISA de sueros de Balb/c obtenidos a 0 y 42 d. Los títulos fueron expresados como la absorbancia obtenida a una λ de 492 nm, con una dilución de 1 : 200 de los sueros. PM = PMGC. AA = PMGC-ácido 6-aminohexanoico-TT. AH = PMGC-1,6-diaminohexano-TT. AO = PMGC-1,8-diaminooctano-TT. AD = PMGC-dihidrazida del ácido adipico-TT.

los de anticuerpos IgG2a para los conjugados con ADH.

Determinación de anticuerpos IgG específicos anti-TT

La cinética de producción de anticuerpos IgG anti-TT (Fig. 2) medidos en sueros de ratones inmunizados con los diferentes conjuga-

dos demostró que en todos los casos, se producen aumentos significativos de los títulos de anticuerpos IgG después de la segunda inoculación ($P < 0,05$) y con un aumento creciente después de la tercera inoculación. Las diferencias observadas en los títulos de anticuerpos IgG anti-TT obtenidos en los sueros

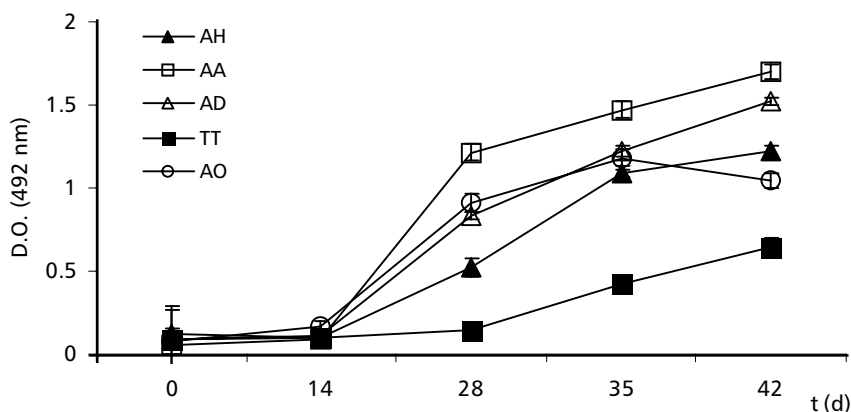


Fig. 2. Cinética de producción de anticuerpos IgG específicos anti-TT de ratones inducidos por los conjugados en estudio, obtenida por ELISA. Los ratones fueron inoculados con tres dosis de TT a los 0, 14 y 28 d y sangrados en el momento de la inoculación y a los 7 y 14 d después de la última dosis. Los títulos son expresados como la absorbancia obtenida a una λ de 492 nm, con una dilución de 1 : 200 de los sueros. AA = PMGC-ácido 6-aminohexanoico-TT. AH = PMGC-1,6-diaminohexano-TT. AO = PMGC-1,8-diaminooctano-TT. AD = PMGC-dihidrazida del ácido adipico-TT. TT = toxoide tetánico. PMGC = polisacárido de meningococo grupo C.

de ratones inoculados con los diferentes conjugados, no fueron significativas.

DISCUSION

El presente estudio se realizó con el objetivo de evaluar el efecto de la estructura de los brazos espaciadores utilizados en la conjugación de polisacáridos a proteínas sobre la respuesta inmune generada por esos conjugados inoculados en ratones Balb/c.

Es conocido que las conjugaciones de polisacáridos a proteínas en preparaciones vacunales aumentan la respuesta inmune del hospedero y generan una respuesta de anticuerpos de memoria, incluso, en niños en edades por debajo de los dos años. Actualmente, existen en el mercado varias vacunas conjugadas contra *Haemophilus influenzae* tipo b⁷⁻¹⁰ y dos contra *N. meningitidis* serogrupo C,^{11,12} que han demostrado su eficacia en ensayos clínicos.

La magnitud de la respuesta y la extensión de la dependencia de las células T-cooperadoras en los conjugados, están relacionadas con las características químicas del conjugado en cuestión, tales como: la presencia o ausencia de entrecruzamientos entre las moléculas de polisacárido o proteína, presencia o ausencia de brazos espaciadores, características del brazo espaciador, tipo de proteína transportadora, tamaño del polisacárido conjugado y grado de sustitución.⁸

En este trabajo, todos los conjugados fueron obtenidos utilizando la misma proteína transportadora y

tuvieron similares porcentajes de polisacáridos libres (Tabla 1) y los resultados revelaron diferencias significativas en la respuesta inmune (IgG anti-PMGC, subclases de IgG anti-PMGC) generada en ratones Balb/c por los conjugados obtenidos con diferentes brazos espaciadores.

Se ha visto en trabajos anteriores que la inmunogenicidad de la porción polisacáridica del conjugado ha demostrado ser dependiente de la distancia que los separa de las proteínas.¹⁸⁻²² La utilización del ácido 6-aminohexanoico resulta en una estructura lineal de ocho átomos de largo (uno de N, otro de O y seis de C), con un grupo carboxilo en un extremo y uno amino en el otro; también el 1,6-diaminohexano presenta una cadena lineal con ocho átomos de largo, solo que el tipo de átomos que lo constituye es diferente, (dos de N y seis de C), mientras que el 1,8-diaminooctano tiene una estructura lineal compuesta por 10 átomos (dos de N y ocho de C). En las moléculas de estos dos últimos, los átomos de nitrógeno se encuentran en grupos amino situados en cada extremo de la cadena. Por último, la dihidrazida del ácido adipico presenta una estructura compuesta por 10 átomos (cuatro de N y seis de C), que también es lineal, pero a diferencia de aquellas, esta posee un grupo hidrazida (NH₂-NH-) en cada extremo.

Los enlaces entre los espaciadores y el PMGC son idénticos. Todos se llevan a cabo a través del carboxilo del polisacárido y los grupos

amino de los espaciadores, al igual que en las uniones entre el AH, AO y ADH con el TT. Mientras que el enlace del AA-PMGC con el TT ocurre por el grupo carboxilo del AA y los grupos ϵ -amino de los residuos de lisina presentes en el TT. Los conjugados preparados con el ADH y el AO tienen un tamaño molecular más grande que el resto de los obtenidos con AA y AH.

Se conoce que la inmunogenicidad del polisacárido no está relacionada directamente con los títulos de anticuerpos anti-proteína portadora obtenidos por la inoculación de los conjugados.¹⁴⁻²³ Estas observaciones sugieren que el efecto mediado por la proteína transportadora sobre la inmunogenicidad del polisacárido es dirigida hacia eventos que preceden la síntesis de anticuerpos por células B, posiblemente a través de la estimulación de la población de células T-cooperadoras.^{24,25}

Estos resultados indican que no solo con el tamaño más largo de la cadena del espaciador se obtiene una respuesta de IgG anti-PMGC más elevada, ya que los conjugados obtenidos con el ADH y el AO, los cuales cuentan con 10 átomos en su cadena, generan una respuesta de IgG anti-PMGC diferente, con concentraciones de anticuerpos más elevados para el conjugado con ADH (Tabla 2). La presencia del grupo hidrazida en el ADH (y no en el AO), sugiere que sea este el motivo de la diferencia en los títulos de IgG y subclases de IgG anti-PMGC, ya que para el ADH, se obtuvieron las mayores concentraciones de IgG2 también (Tabla 2 y Fig. 1).

Por otra parte, los resultados del presente estudio confirman la hipótesis reportada en otros artículos con relación a que el incremento de la inmunogenicidad del polisacárido en el conjugado puede deberse a la estructura del brazo espaciador y que este puede ser capaz de cambiar el tipo de respuesta inmune de TH2 a TH1.²¹

Otro aspecto a resaltar del estudio se relaciona con los elevados títulos de anticuerpos IgG anti-TT encontrados en el suero de los animales inoculados con los diferentes conjugados, lo cual corrobora reportes previos.

CONCLUSIONES

Los resultados indican que la estructura química del espaciador utilizado en la unión covalente del polisacárido con la proteína ejerce

gran influencia en la respuesta inmune generada en los animales después de la inoculación de los conjugado, ya que al utilizar un espaciador con una hidrazida en el extremo de la cadena carbonada, se logra la mayor respuesta de anticuerpos IgG y subclases de IgG (IgG1, IgG2a) en los animales. Se obtiene una respuesta menor de anticuerpos IgG cuando se utiliza el conjugado preparado con el 1,8-diaminooctano, el que presenta en su estructura un grupo amino en cada extremo de su cadena carbonada. Los valores de anticuerpos más bajos corresponden al conjugado que contiene al ácido 6-aminohexanoico, el cual cuenta con un grupo amino en un extremo de su cadena y un grupo carboxilo en el otro extremo.

La presencia de títulos de anticuerpos IgG anti-TT elevados en los sueros de los animales inoculados con los diferentes conjugados indica que en la respuesta inmune contra la proteína transportadora no se produce afectación por el proceso de conjugación utilizado.

BIBLIOGRAFIA

1. Pinner R.W., Onyango F., Perkins B.A., Mirza N.B., Ngacha D.M., Reeves M., Dewitt W., Njerv E., Agata N.N. and Broome C.V. Epidemic meningococcal disease in Nairobi 1989. **J. Infect. Dis.**, **66**, 360-364, 1992.
2. Connolly M. and Noah N. Is group C meningococcal disease increasing in Europe? A report of surveillance of meningococcal infection in Europe 1993-6. **Epidemiology and infection**, **122**, 41-49, 1999.
3. Whalen C.M., Hockin J.C., Ryan A. and Ashton F. The changing epidemiology of invasive meningococcal disease in Canada, 1985 through 1992. Emergence of a virulent clone of *Neisseria meningitidis*. **JAMA**, **273**, 390-94, 1995.
4. Granoff D.M., Gupta R.K., Belshe R.B. and Anderson E.L. Induction of immunologic refractoriness in adults by meningococcal C polysaccharide vaccination. **J. infect. Dis.**, **178**, 870-74, 1998.
5. Brand B.L. and Artenstein M.S. Duration of antibody responses after vaccination with group C *Neisseria meningitidis* polysaccharide. **J. Infect. Dis.**, **131** (Suppl.), 569-72, 1975.
6. Lepow M.L., Goldschneider I., Gold R., Randolph M. and Gotschlich E.C. Persistence of antibody following immunization of children with group A and group C meningococcal polysaccharides. **Pediatrics**, **60**, 673-80, 1977.
7. Eskola J. and Kayhty H. Ten years' experience with *Haemophilus influenzae* type b (Hib) conjugate vaccines in Finland. **Rev. Med. Microbiol.**, **7**, 231-41, 1996.
8. Poolman J.T. Polysaccharide and membrane vaccines. In A. Mizrahi (Ed.), *Bacterial vaccines*. Wiley-Liss, New York, 57-86, 1990.
9. Decker M.D., Edwards K.M., Bradley R. and Palmer P. Comparative trial in infants for four conjugates *Haemophilus influenzae* type b vaccines. **J. Pediatrics**, **120**, Part I, 184-189, 1992.
10. Bergquist C., Lagergard T. and Holmgren J. AnticARRIER Immunity suppresses the antibody response to polysaccharide antigens after intranasal immunization with the polysaccharide-protein conjugate. **Infect. Immun.**, **65**, 1579-1583, 1997.
11. Borrow R., Richmond P., Kaczmarek E.B., Iverson A., Martin S.L., Findlow J., Acuna M., Longworth E., O'Connor R., Paul J. and Miller E. Meningococcal serogroup C-specific IgG antibody responses and serum Bactericidal titres in children following vaccination with a meningococcal A/C polysaccharide vaccine. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, **28**, 79-85, 2000.
12. Richmond P.C., Miller E., Borrow R., Clark S., Sadler F., Fox A.J., Begg N.T., Morris R. and Cartwright K.A.V. Meningococcal serogroup C conjugate vaccine is immunogenic in infancy and primes for memory. **J. Infect. Dis.**, **179**, 1569-1572, 1999.
13. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent, **Biol. Chem.**, **193**, 265-275, 1951.
14. Svennerholm L. Quantitative estimation of Sialic II. A colorimetric resorcinol hydrochloric acid method. **Biochem. Biophys. Acta.**, **24**, 609, 1957.
15. Fukasawa L.O., Gorla M.C.O., Schenkman R.P.F., Garcia L.R., Carneiro S.M., Raw I. and Tanizaki M.M. *Neisseria meningitidis* serogroup C polysaccharide and serogroup B outer membrane vesicle conjugate as a bivalent meningococcus vaccine candidate. **Vaccine**, **17**, 2951-58, 1999.
16. Wessels M.R., Paoletti L.C., Pinel J. and Kasper D.L. Immunogenicity and protective activity in animals of type V group B streptococcal polysaccharide-Tetanus toxoid conjugate vaccine. **J. Infect. Dis.**, **171**, 879-884, 1995.
17. Peeters C.C.A.M., Terbergen-Meekes A.J., Evenberg D.E., Poolman J.T., Beurret M., Zegers B.J.M. and Rikers G.T. Effect of carrier priming on immunogenicity of saccharide-protein conjugate vaccines. **Infect. Immun.**, **59**, 3504-3510, 1991.
18. Peeters C.C.A.M., Terbergen-Meekes A.J., Evenberg D.E., Poolman J.T., Zegers B.J.M. and Rikers G.T. A comparative study of the immunogenicity of Pneumococcal type 4 polysaccharide and oligosaccharide-Tetanus toxoid conjugates in adult mice. **J. Immunol.**, **146**, 4308-4314, 1991.
19. Robbins J.B. and Schneerson R. Polysaccharide-protein conjugates. A new generation of vaccines. **J. Infect. Dis.**, **161**, 821-832, 1990.
20. Schneerson R., Barrera O., Sutton A. and Robbins J.B. Preparation, characterization and immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-protein conjugate. **J. Exp. Med.**, **152**, 361-376, 1980.
21. Fattom A., Shiloach J., Bryla D., Fitzgerald D., Pastan I., Karakawa W.W., Robbins J.B. and Schneerson R. Comparative immunogenicity of conjugates composed of the *Staphylococcus aureus* type 8 capsular polysaccharide bound to carrier proteins by adipic acid dihydrazide or N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionate. **Infect. Immun.**, **60**, 584-589, 1992.
22. Cuello M., Cabrera O., Pérez O., del Campo J., Balboa J., Soto C.R., Martínez M.E., Hernández J., y Sierra G. Respuesta inmune del tamaño del espaciador en la unión covalente de un polisacárido a proteína. **Revista CENIC Ciencias Biológicas**, **33**, 71-75, 2002.
23. Schneerson R., Robbins J.B., Parke J.C. Jr., Bell C., Schlesselman J.J., Sutton A., Wang Z., Schiffman G., Karkas A. and Shiloach J. Quantitative and qualitative analyses of serum antibodies elicited in adults by *Haemophilus influenzae* type b and *Pneumococcus* type 6a capsular polysaccharide-Tetanus toxoid conjugates. **Infect. Immun.**, **52**, 519-528, 1986.
24. Janeway C.A. Jr., Ron J. and Katz M.E. The B cell is the initiation antigen-presenting cell in peripheral lymph nodes. **J. Immunol.**, **138**, 1051-1055, 1987.
25. Kupfer A., Swain S.L., Janeway C.A. and Singer S.J. The specific direct interaction of helper T cells and antigen presenting B cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **83**, 6080-6083, 1986.