

Fragmentación del polisacárido de *Neisseria meningitidis* serogrupo C para su uso en vacunas conjugadas

Osmir Cabrera, Carmen R. Soto, Maribel Cuello, Miguel E. Martínez, Juan C. Martínez y Gustavo Sierra.

Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros. Ciudad de La Habana, Cuba.

E-Mail: ocabrera@finlay.edu.cu

Las infecciones meningocócicas son una causa importante de morbilidad y mortalidad en el mundo. Los serogrupos B y C son los responsables de la mayoría de los casos reportados en muchos países e incluso en países desarrollados. Las vacunas meningocócicas que contienen al polisacárido capsular purificado del meningococo C inducen en adultos protección por la presencia de anticuerpos bactericidas en sueros, pero son pobremente inmunogénicos en niños pequeños y pueden inducir tolerancia. La inmunogenicidad de los polisacáridos o sus fragmentos puede ser mejorada por la conjugación a proteínas transportadoras. El objetivo de este estudio fue obtener oligosacáridos C (Os-C) a partir de la depolimerización del polisacárido de *Neisseria meningitidis* serogrupo C (Ps-C) por hidrólisis ácida, calor y peryodato de sodio y evaluar la conservación de sus propiedades antigénicas mediante un ELISA de inhibición. Se determinó la pérdida de grupos O-acetilos, así como, la talla molecular relativa por filtración en gel y se observaron diferencias significativas entre los OS-C obtenidos en cada método. Las propiedades antigénicas fueron dependientes del tamaño molecular de los Os-C, así como de la presencia de los grupos O-acetilos en los oligosacáridos. Los Os-C obtenidos por la hidrólisis ácida mostraron similares propiedades antigénicas a las del polisacárido.

Palabras claves: *Neisseria meningitidis*, oligosacáridos, hidrólisis.

Introducción

Los brotes meningocócicos constituyen uno de los más temidos por la salud pública mundial, principalmente por golpear de forma aleatoria a personas sanas, provocando la muerte a uno de cada siete afectados (1). Más de la mitad de los casos ocurren en niños menores de cinco años y la más alta incidencia en los primeros dos años de vida (2). La forma endémica de la meningitis meningocócica es causada por los serogrupos A, B, C y W135; mientras la epidémica es debido a los serogrupos A, B y C (3).

Del serogrupo C se han reportado brotes en diversos países y un incremento en la incidencia de infecciones debidas al mismo (4); este serogrupo, aunque ocasiona enfermedad de forma esporádica, es la causa más frecuente de brotes epidémicos en algunos países y la mortalidad asociada al mismo es superior a la del serogrupo A y similar o mayor a la del serogrupo B (5,6).

Actualmente se está trabajando con la finalidad de obtener productos vacunales más eficientes en niños pequeños contra diferentes bacterias, por medio de la unión covalente de polisacáridos o sus fragmentos a proteínas transportadoras (7).

Esta unión covalente se hace necesaria ya que los polisacáridos bacterianos presentan el problema de ser moléculas Timo Independientes (TI), lo cual trae como consecuencia que no sean inmunogénicos en niños menores de dos años, que son los más susceptibles a enfermarse con estos microorganismos.

Para la conjugación, se han empleado fragmentos polisacáridicos de diferentes tallas moleculares obtenidos a partir de métodos de depolimerización del polisacárido capsular bacteriano, tales como: la autohidrólisis, la hidrólisis ácida (8), la hidrólisis por sonicación o irradiación (9) y la hidrólisis enzimática con la que se obtienen fragmentos pequeños (10). También se emplean otros procedimientos interesantes como son, los que se basan en la obtención de oligómeros ya activados y listo para la conjugación. Entre estos tenemos la N-acetilación parcial y diaminación con ácido nitroso, en la cual se generan grupos aldehidos libres que se unen a la proteína por el método de aminación reductiva (11). Contamos también con el método de oxidación controlada por peryodato, que ha sido utilizado con éxito en el polisacárido de *Neisseria meningitidis* grupo C (12). Con estos métodos de depolimerización se obtienen fragmentos que respecto al polisacárido de partida, presentan algunas ventajas, como pueden ser: que los fragmentos son más fáciles de activar y que los conjugados producidos con los oligómeros presentan

estructuras más sencillas que los producidos con polisacáridos, entre otras, que se deben tener en cuenta en el momento de obtener una vacuna conjugada (3), por lo que nos propusimos en este trabajo la obtención de fragmentos del PS-C por diferentes métodos y la caracterización de los mismos.

Materiales y Métodos

Materiales: Para la realización de los experimentos trabajamos con el lote de polisacárido No. 6014 procedente de la cepa vacunal de *Neisseria meningitidis* serogrupo C (PS-C), (obtenido con Buenas Prácticas de Producción) en la Planta 3 del Instituto Finlay.

Métodos analíticos: Se realizó la determinación de ácido siálico por el método de Svennerholm (13) y la determinación de grupos O-acetilos por el método de Hestrin (14).

Métodos de depolimerización

Fragmentación por calor: El PS-C fue disuelto en agua destilada (4 mg /mL), se ajustó el pH a 7,2 y se colocó en el horno durante 4,5 h a 100 °C y posteriormente se enfrió a temperatura ambiente (15).

Ruptura con peryodato de sodio (NaIO₄): A 0,058 g de PS-C se le añadieron 6 mL de NaOH 0,02 N y se agitó por 4 h a temperatura ambiente. Seguidamente se añadió 6 mL de NaIO₄ 0.1 M y se agitó por 50 min a temperatura ambiente. Se le adicionó 1 mL de etilenglicol al 50% y se agitó por 20 min. Se Centrifugó a 7000 rpm por 10 min y se dializó contra H₂O destilada toda la noche con dos cambios (12).

Hidrólisis ácida: Se preparó una solución de PS-C de concentración de ácido siálico 14,94 mg/mL y se tomó 1 mL de la misma. Se le añadió HCl hasta lograr el pH 4 (Según papel pH 1-12, Duotest®). Seguidamente se sometió a 60⁰ C en baño termostático por espacio de 20 min; transcurrido este tiempo se colocó en un baño de agua fría y se ajustó el pH a 7 con NaOH 0,1 M (8).

Caracterización de los fragmentos de polisacárido

Determinación de la talla Molecular: De cada método desarrollado se tomó una muestra de oligosacárido y se aplicó a una columna XK26-100 con matriz Sephacryl S-300. El buffer de elución utilizado fue Tris HCl 30 mM, pH 8,5. Se determinó el tamaño molecular relativo de los fragmentos a través de la determinación de sus constantes de distribución (Kd). Se tomó como referencia la Kd del polisacárido de partida y la de un patrón de ácido siálico. Para esto se determinó el volumen de elución (Ve) de las muestras y se escogió, de las

fracciones eluidas de la columna, la de mayor lectura a 580 nm, Se realizó la técnica de determinación de ácido siálico a cada una de ellas. La velocidad de flujo durante la corrida fue de 60 mL/h, el volumen muerto de la columna (Vo) se determinó con 1 mL de una solución de Dextrana azul 2000 (Sigma Cat. N^o 5376) de concentración 1,0 mg/mL y el volumen final (Vf), con 2 mL de una solución de p-Nitrofenol de concentración 2,0 mg/mL. Estos volúmenes se determinaron como la mayor lectura a 280 nm de las fracciones con Dextrana Azul 2000 y como la mayor a 360 nm de las fracciones con P-nitrofenol. El valor de la Kd se calculó por la siguiente expresión:

$$Kd = \frac{Ve - Vo}{Vf - Vo}$$

Determinación de la conservación de la antigenicidad de los fragmentos: Las propiedades antigénicas de los fragmentos fueron determinadas por un ELISA de inhibición (9), determinando la concentración de Ac isotipo IgG contra el PS-C en un suero humano de un individuo vacunado con VA-MENGOC-BC[®], una vez que este suero fue absorbido por los diferentes OS y por el PS-C de partida. Para esto se utilizó un sistema ELISA indirecto que utiliza como suero estándar un suero humano de un individuo vacunado con VA-MENGOC-BC[®] con altos títulos de IgG contra el PS-C. Se utilizó como control negativo un suero humano de un individuo sin vacunar con esta vacuna que no mostró niveles de IgG anti PS-C significativos para este ensayo. Se calculó el porcentaje de inhibición tomando como 100% la concentración de Ac isotipo IgG en el suero humano sin absorber. Para esta técnica, el ajuste y la verificación de la curva, así como el cálculo de la concentración de los sueros se obtuvieron a partir de la introducción de los datos al programa de cálculo ELISA (desarrollado por Brian D. Plikaytis y colaboradores del Centro para el Control de Enfermedades (CDC), Atlanta, GA, USA) instalado en nuestra computadora (16). La cuantificación mediante la aplicación de este programa está basada en una transformación logistic-log con cuatro parámetros y compara el resultado de la muestra en la dilución estudiada con la curva del estándar empleada por el propio sistema.

Tratamiento estadístico

Para la comparación de los resultados obtenidos en cada uno de los métodos de fragmentación utilizado, se determinó la significación estadística por un Análisis de Varianza, con un nivel de significación de 95% y como análisis complementario se realizó un Test de Duncan.

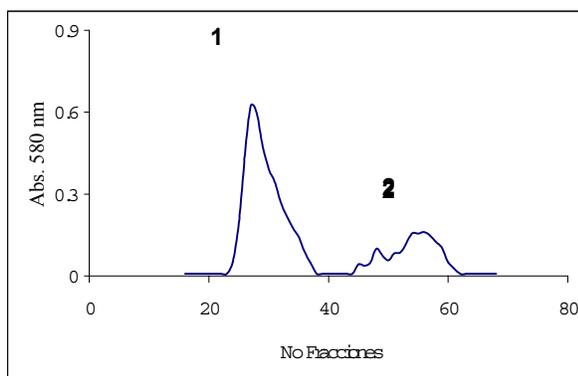
Resultados y Discusión

El acoplamiento directo de una proteína transportadora con el polisacárido nativo no siempre es satisfactorio, debido a la poca incorporación del polisacárido y a la formación de complejos insolubles en agua. Este fenómeno se puede atribuir a reacciones cruzadas que se facilitan por la activación de varios grupos funcionales por molécula de polisacárido (17). Estas deficiencias pueden ser disminuidas con la utilización de fragmentos de polisacáridos y con la generación en la posición terminal de los fragmentos de grupos funcionales reactivos, como por ejemplo grupos aldehídos.

Obtención de fragmentos de PS-C por diferentes métodos

Uno de los métodos utilizados en este trabajo es el método de oxidación controlada con peryodato de sodio el cual ofrece fragmentos que presentan en la posición terminal un grupo aldehído listo para la conjugación, para lo cual utilizamos en primera instancia la metodología reportada en la literatura (12) que obtiene con este método fragmentos de una talla molecular que oscila entre 12 000 y 16 000 Da. Al desarrollar la metodología descrita por este autor, obtuvimos como resultado después de la cromatografía, que la fragmentación era

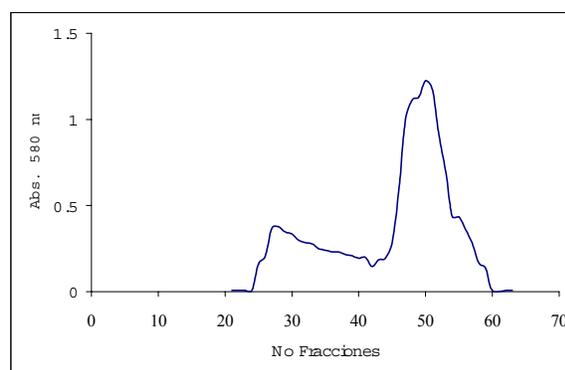
Figura 1. Perfil cromatográfico obtenido en Sephacryl S-300 al PS-C después del tratamiento con peryodato en las condiciones reportadas. 1: PS-C de alto peso molecular después del proceso de depolimerización; 2: Fragmentos obtenidos por la acción del peryodato.



ineficiente ya que los fragmentos obtenidos se encontraban en minoría con respecto al PS-C de partida (Figura 1), por lo que nos dimos a la tarea de realizarle algunas modificaciones al método.

Se conoce que el peryodato actúa sobre grupos hidroxilos vecinales y que en el caso de este polisacárido se generan con la hidrólisis básica que se realiza en el método, por lo que, basamos nuestras modificaciones en este paso y de esta forma decidimos en primer lugar variar la temperatura a la cual se realiza esta hidrólisis por lo que utilizamos 37 °C. Se observó que con esta temperatura se eliminaba una mayor cantidad de grupos O-acetilos y que aumentaba el rendimiento en el proceso de fragmentación (Figura 2). Posteriormente, trabajamos con el tiempo de hidrólisis, ya que se sabe que al aumentar la temperatura, el tiempo necesario para que ocurra la hidrólisis puede variar, para lo cual ensayamos los tiempos de 4 h. reportado (12) y 3, 2 y 1 h. Después de terminado el proceso, obtuvimos como resultado que no había diferencias significativas ($P > 0,05$) entre la fragmentación realizada a las 4 h con respecto a la de 3 h y 2 h de reacción, no ocurriendo así a 1 h, por lo cual, decidimos utilizar la variante de 2 h para fragmentar el polisacárido

Figura 2: Perfil cromatográfico obtenido en Sephacryl S-300 al PS-C después del tratamiento con peryodato en las condiciones de nuestro Laboratorio (37°C y 2 h, en la reacción de hidrólisis). 1: PS-C de alto peso molecular después del proceso de depolimerización; 2: Fragmentos obtenidos por la acción del peryodato.



Con las condiciones de 37 °C y 2 h en el paso de la hidrólisis básica del PS-C, previa a la utilización del peryodato, obtuvimos fragmentos que mostraron valores de Kd mayores que los del polisacárido de partida (Tabla 1), lo que evidencia fragmentos de un peso molecular inferior al del polisacárido.

Otros autores (15) depolimerizaron el polisacárido del meningococo C con calor y obtuvieron oligómeros en rango de peso molecular entre 200 000- 2 000 000 Da. Para la realización de este método nos basamos en la metodología aplicada por estos autores. Como se puede observar en la Tabla 1 los fragmentos en su totalidad presentaron un valor de Kd mayor que la del polisacárido nativo, lo que indica que tienen un peso molecular menor y este resultado se corresponde con lo descrito en la literatura.

El otro método utilizado fue la hidrólisis ácida, la cual es utilizada por algunos autores (8,18) para depolimerizar el PS-C. Para llevar a cabo este método se han utilizado diferentes soluciones como es el caso del buffer acetato a pH 5 (18) y ácido clorhídrico a diferentes pH (8); en estos casos se obtienen fragmentos de diferentes tamaños en dependencia de las condiciones utilizadas. Nosotros escogimos para nuestro trabajo las condiciones óptimas planteadas en el trabajo descrito por los autores que trabajaron con HCl (8) y obtuvimos fragmentos que presentaron valores de Kd mayores que los del polisacárido de partida (Tabla 1), lo que indica que se obtuvieron fragmentos con menor talla molecular que el PS-C de partida.

Tabla 1. Tamaños moleculares relativos (Kd) determinados por cromatografía de exclusión molecular de los fragmentos obtenidos por los diferentes métodos de depolimerización

| Muestras | Tr (min) | Kd (media) |
|--|----------|------------|
| PS-C | 224 | 0,074 |
| Fragmentos (Hidrólisis ácida) | 240 | 0,111 |
| Fragmentos (Fragmentación con calor) | 272 | 0,272 |
| Fragmentos (Fragmentación con Peryodato) | 316 | 0,355 |

Los resultados mostrados en Tabla 1, concuerdan con lo reportado en la literatura (15) en lo relacionado con los tamaños que se obtienen por los diferentes métodos de fragmentación ya que como se puede observar, cuando se utiliza el método de fragmentación con calor los fragmentos obtenidos presentaron menores valores de Kd y por tanto mayor talla molecular que los obtenidos por el método de fragmentación con peryodato.

Del análisis estadístico realizado a los resultados obtenidos entre cada una de las fragmentaciones, se obtuvo que los fragmentos obtenidos por los diferentes métodos de depolimerización mostraron diferencias significativas en cuanto a los valores de Kd determinados.

Determinación de Grupos O-acetilos

Los grupos O-acetilos en el PS-C tienen gran importancia en la inmunogenicidad de este polisacárido y los valores obtenidos en la determinación (Tabla 2) nos permiten conocer en qué medida se ven afectados estos grupos después de la fragmentación. Partiendo del valor de concentración de grupos O-Acetilos del polisacárido nativo, se puede ver como varía después de las diferentes fragmentaciones.

Tabla 2: Determinación de grupos O-acetilos en los fragmentos obtenidos por los diferentes métodos de fragmentación

| Muestras | Conc. de grupos O-acetilo (µmol/mL) | O-acetilos eliminados (%) |
|--|-------------------------------------|---------------------------|
| PS-C | 2,01 | - |
| Fragmentos (Hidrólisis ácida) | 1,59 | 20,9 |
| Fragmentos (Fragmentación con calor) | 1,11 | 44,78 |
| Fragmentos (Fragmentación con Peryodato) | 0,72 | 64,18 |

Como se puede observar en la Tabla 2, en el método de fragmentación con peryodato es donde se ven más afectados los grupos O-acetilos, ya que es donde ocurre la mayor pérdida de los mismos, mientras con el método de hidrólisis ácida es donde se conservan en mayor cantidad estos grupos.

Con el método del calor se pierden una cantidad considerable de los grupos O-acetilos por lo que sí fuera de interés para futuros trabajos, se pudieran obtener fragmentos más pequeños que los obtenidos y con un grupo aldehído en la posición terminal. Esto sería posible con el empleo adicionalmente de la oxidación controlada con peryodato, ya que con la metodología empleada para la fragmentación con calor se eliminó el 44,78% de los grupos O-acetilos del PS-C, lo cual indica que en la misma proporción se generaron grupos hidróxilos vecinales y por tanto, se vería favorecida la ruptura de esos enlaces con el peryodato. Los fragmentos obtenidos de esta forma serían menores que los obtenidos con la

fragmentación con calor y mayores que los obtenidos en la fragmentación con peryodato, debido a que la cantidad de grupos hidróxilos vecinales generado por la fragmentación con calor es menor que la que se generó con el método de la oxidación controlada con peryodato.

Determinación de la conservación de las propiedades antigenicas de los fragmentos

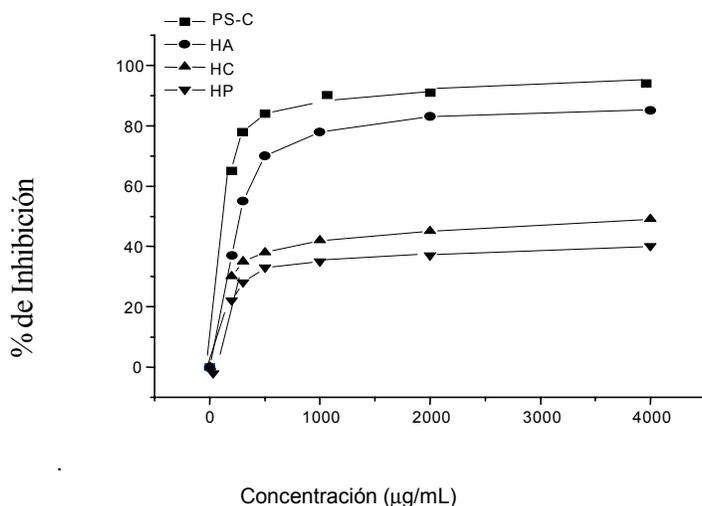
En trabajos anteriores se plantea que los grupos O-Acetilos desempeñan un papel importante en la serología de los polisacáridos. Estudios de inhibición con polisacáridos O-Acetilo negativos y O-Acetilo positivos demuestran antigenicidades diferentes, y por lo general los O-acetilo negativos presentan un porcentaje de inhibición inferior a los O-Acetilo positivos (8).

Se realizaron dos ensayos para la determinación de la antigenicidad, los cuales se ajustaron por el programa ELISA (CDC,USA) (16) y en los mismos las muestras analizadas mostraron valores de densidad óptica

menores que el primer punto de la curva estándar, por lo que no requirieron ser repetidas en una dilución mayor. Se obtuvo un coeficiente de variación promedio (CV) entre las réplicas de 6,1% con un intervalo de confianza del 95%. Este resultado es adecuado para el trabajo en el laboratorio donde se acepta un CV menor que el 20%. El coeficiente de variación interensayo fue de 5,15%, el cual se considera correcto debido a que en trabajos similares se reportan CV entre 1-19% (19). En cada ensayo se utilizó el polisacárido nativo como inhibidor de referencia para evaluar la capacidad de inhibición de los oligómeros.

Los fragmentos obtenidos mediante la ruptura con peryodato de sodio y con calor mostraron de forma general grandes pérdidas de su antigenicidad comparados con la antigenicidad mostrada por el polisacárido nativo, ya que sus porcentos de inhibición fueron mucho más bajos (Figura 3).

Figura 3: Inhibición de la IgG anti-PS-C por el PS-C y por los fragmentos obtenidos por diferentes métodos de fragmentación. HA: Fragmentos obtenidos por el método de la hidrólisis ácida, HC: Fragmentos obtenidos por el método de la hidrólisis con calor y HP: Fragmentos obtenidos por el método de la oxidación controlada con Peryodato



resultado concuerda con los reportados por otros autores (8), que encontraron que las propiedades antigénicas de las moléculas obtenidas a pH 4, fueron muy similares a las del polisacárido de partida y que la hidrólisis bajo estas condiciones se evidenció por el aumento de la Kd respecto a la Kd del polisacárido de partida.

Es lógico esperar luego de cualquier fragmentación del polisacárido, reducciones de la antigenicidad, ya que por cada ruptura del polisacárido hay un sitio de unión del mismo a los anticuerpos que se ve afectado al separarse de los sitios vecinales del polisacárido.

Los menores porcentajes de inhibición (encontrados en las fragmentaciones con peryodato y calor) se corresponden con los valores más elevados de Kd y de porcentaje de pérdida de grupos O-acetilos obtenidos, mientras que las propiedades inhibitorias de los fragmentos obtenidos por la hidrólisis ácida fueron de las mayores, y también se corresponden con los menores valores de Kd obtenidos y los menores porcentajes de pérdida de los grupos O-acetilos. Este

Referencias

1. Jackson LA, Schuchat A, Reeves MW, Wenger JD. Serogroup C meningococcal outbreaks in the United States. *JAMA*. 1995; 273:383-389.
2. Borrow R, Richmond P, Kaczmarski EB, Iverson A, Martin SL, 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*. 2000; 28:79-85.
3. Richmond P, Borrow R, Miller E, Clark S, Sadler F, Fox A, Begg N, Morris R, and Cartwright K. Meningococcal serogroup C conjugate vaccine is immunogenic in infancy and prime for memory. *JID*. 1999; 179:1569-72.
 4. Kin WJ, MacDonald NE Wells G, Huang J, Allen U, Chan F, Ferris W, Diaz-Mitoma F, and Ashton F. Total and functional antibody response to a quadrivalent meningococcal polysaccharide vaccines among children. *Journal of Pediatrics*. 1996; 128:196-202
 5. Jackson LA, Schuchat A, Reeves MW, Wenger JD. Serogroup C meningococcal outbreaks in the United States. *JAMA*. 1995; 273:383-389.
 6. Riordan FAI, Marzouck O, Thomson APJ, Sills JA, Hart CA. Mortality from group C meningococcal disease: a case for a conjugate vaccine? *Eur. Journal of Pediatrics*. 1994; 153:821-824.
 7. Peltola H. Meningococcal vaccines. Current status and future possibilities. *Drugs*. 1998; 55(3):347-366
 8. Martínez JC, Rodríguez V, Merchán Y, Ochoa R, Estrada EA, Nerey M, Blanco R, Licea T. Preparación de Oligosacáridos de *Neisseria meningitidis* serogrupo C por hidrólisis ácida. *Biotecnología Aplicada*. 1999; 16:25-28.
 9. Pawlowski A, Kallenius G, and Svenson SB. Preparation of pneumococcal capsular polysaccharide-protein conjugate vaccines utilizing new fragmentation and conjugation technologies. *Vaccine*. 2000; 18(8):1873-1885.
 10. Jennings H.J. and Sood R.K. Synthetic Glycoconjugates as human vaccines. *Neoglycoconjugate*. 1994; 334-340.
 11. Sood RK, Michon F, de Muys JM, and Jennings HJ. Synthesis and Immunogenicity in rabbits of *Streptococcus pneumoniae* type 14 polysaccharide-tetanus toxoid conjugates. In "Abstracts of XIIth International Carbohydrate, Paris". 1992; 370.
 12. Tai JY, Hronowski LJJ, Mates Sh, inventors. Vaccines against group C *Neisseria meningitidis*. US Patent 5 425 946. 1995.
 13. Svennerholm L. Quantitative estimation of Sialic II. A colorimetric resorcinol hydrochloric acid method. *Biochem. Biophys Acta*. 1957; 24: 609.
 14. Hentrin S. The reaction of acetyl choline and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamina and its analytic application. *Journal of Biological Chemistry*. 1949; 180:249.
 15. Bird W. and Kadis S. Preparation, Characterization, and immunogenicity of conjugate vaccines directed against *Actinobacillus pleuropneumoniae* virulence determinants. *Infect. Immun*. 1992; 60 (8):3042-3051.
 16. Plikaytis B.D, Turner S.H, Gheesling LL, Carlone G.M. Comparisons of standard curve-fitting methods to quantitative *Neisseria meningitidis* group A polysaccharide antibody level by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol*. 1991; 29:1439-46.
 17. Pawlowski A, Kallenius G, and Svenson SB. A new method of non-cross linking conjugation of polysaccharide to proteins via thioether bonds for the preparation of saccharide-protein conjugate vaccines. *Vaccine*. 1999; 17(11-12) 1474-83.
 18. Constantino P, Norelli F, Giannozzi AS, D'Ascenzi S, Bartoloni A, Kaur S, et al. Size fractionation of bacterial capsular polysaccharides for their use in conjugate vaccines. *Vaccine*. 1999; 17:1251-1263.
 19. Andersen J, Berthelsen L, and Lind I. Measurement of antibodies against meningococcal capsular polysaccharides B and C in enzyme-linked immunosorbent assay: towards an improved surveillance of meningococcal disease. *Clin. Diagn. Lab. Immunol*. 1997; 4:345-51.

Size fragmentation of *Neisseria meningitidis* grupo C polysaccharide for their use in conjugated vaccine

Abstract

Meningococcal infections are an important cause of morbidity and mortality worldwide. Serogroups B and C strains are responsible for most cases in the developed world. Meningococcal vaccines containing purified serogroup C capsular polysaccharide induce protective serum bactericidal antibodies in adults, but are poorly immunogenic in young children and may induce tolerance. The immunogenicity of polysaccharide or its fragments can be improved by conjugation to a protein carrier. In this study the purified meningococcal C polysaccharide (Ps-C) was depolymerized by acid hydrolysis, heat and sodium peryodate, to obtain oligosaccharides (Os-C) and it was evaluated the integrity of their antigenic properties by inhibition ELISA. The molecular size was determined by gel filtration and the loss of O-acetyl groups was evaluated. Significant differences between the molecular size of the OS-C and the values of O-acetyls were obtained by different depolymerization method. The antigenic properties were dependent on the molecular size and the O-acetyls groups. Oligosaccharides obtained by acid hydrolysis showed the same antigenic properties as PS-C.

Keywords: *Neisseria meningitidis*, oligosaccharides, hydrolysis.