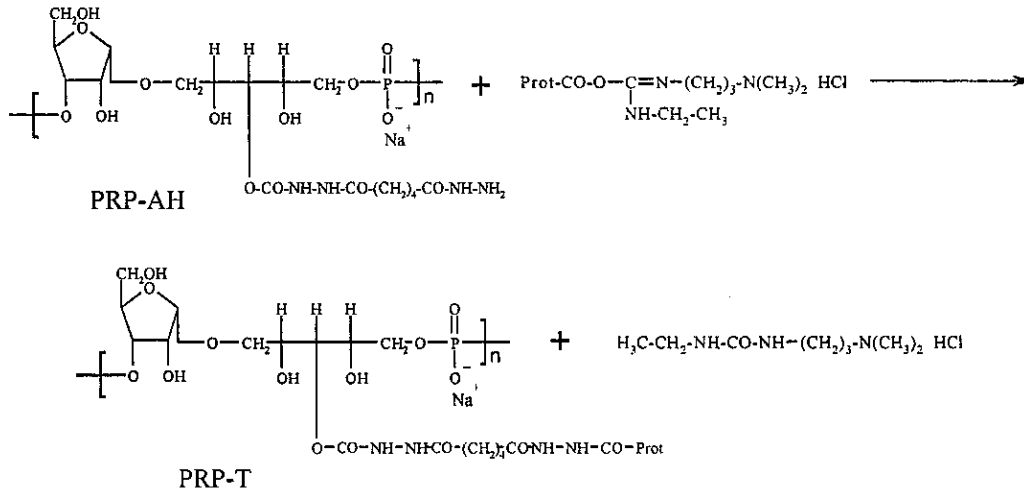
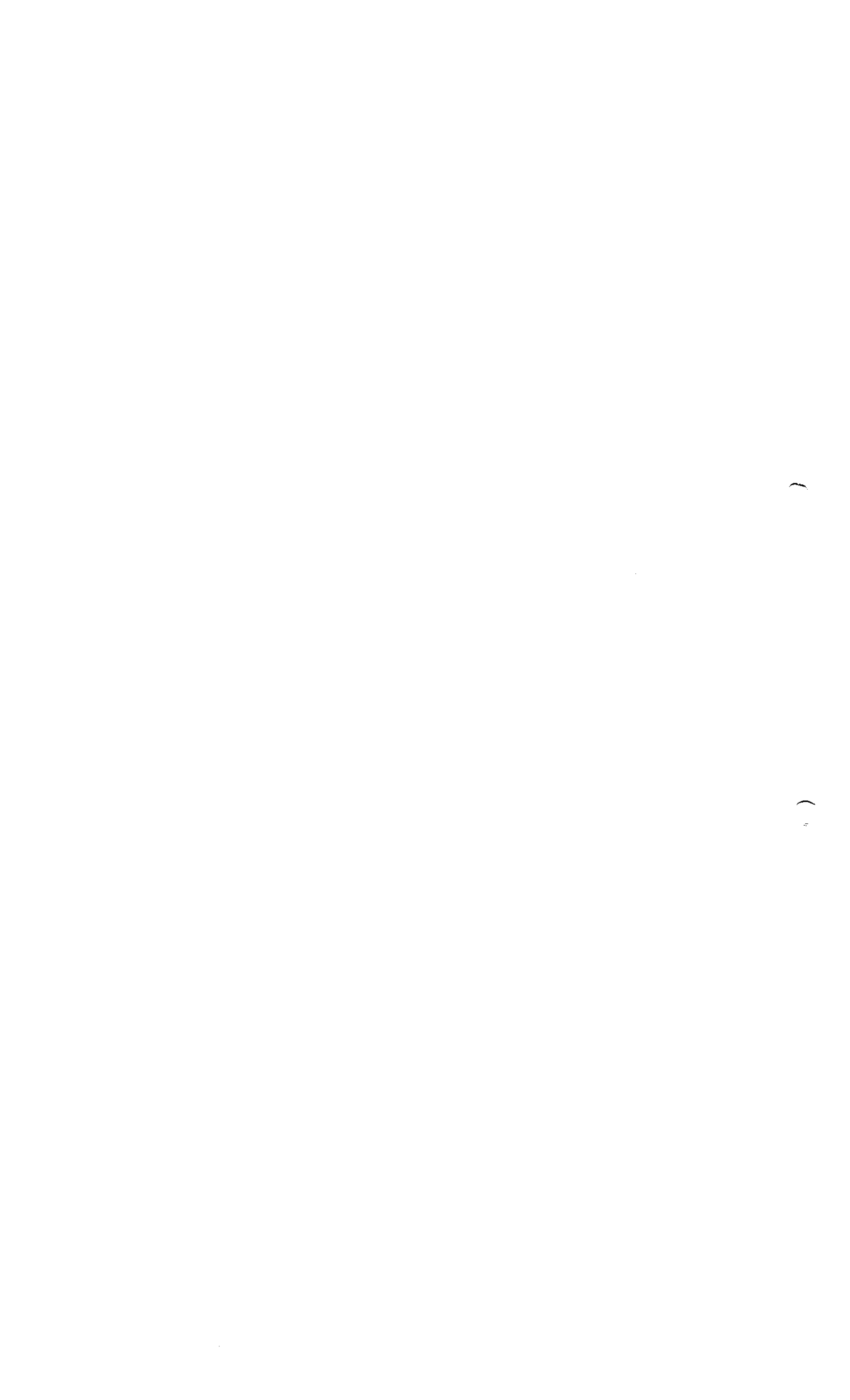
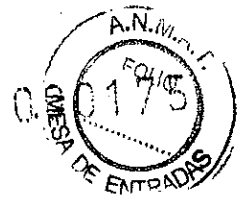




Figura 4: Reacción de conjugación de la proteína tetánica activada con el polisacárido de *Haemophilus* tipo b activado





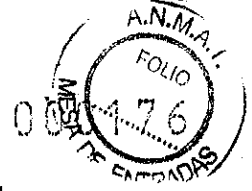


3.2.S.1.3

Información General - PRP-T


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.



Sección 3.2.S.1.3 - Propiedades generales

Índice

1	Introducción.....	2
2	Propiedades fisicoquímicas.....	2
3	Propiedades biológicas.....	3



Lista de abreviaturas: vea la sección 2.3 Resumen general de calidad, Introducción.

1 Introducción

La bacteria *Haemophilus influenzae* tipo b causa varias enfermedades en los seres humanos, las más comunes y graves son la meningitis y la neumonía, en especial en los niños menores de 5 años.

Se ha demostrado que los anticuerpos séricos contra el polisacárido capsular de *Haemophilus influenzae* tipo b son capaces de dar inmunidad protectora contra enfermedades invasivas producidas por este organismo. Sin embargo, el polisacárido purificado de *Haemophilus* tipo b tiene un uso limitado como vacuna ya que no induce una respuesta protectora de anticuerpos séricos en niños menores de 18 meses, el grupo etario con la incidencia más alta de enfermedades invasivas por *Haemophilus influenzae*. Además de este problema de inmunogenicidad relacionada con la edad, el polisacárido de *Haemophilus* tipo b no produce memoria inmunitaria.

Estas son las principales razones por las que el polisacárido de *Haemophilus* tipo b se conjuga con una proteína transportadora capaz de aumentar la respuesta de la vacuna.

La capacidad de los conjugados polisacárido-proteína para aumentar la inmunogenia de un polisacárido capsular bacteriano, y por consiguiente la respuesta antisacáridos dependiente de las células T, fue informada por primera vez por Goebel y Avery en 1929 (Goebel and Avery: Chemo-immunological studies on conjugated carbohydrate protein. The synthesis of p-aminophenol β -glucoside, p-aminophenol β -galactoside and their coupling with serum globulin. J. Exp. Med. 1929, 50: 521,32). Varios tipos distintos de conjugados de polisacárido estimulan la síntesis de anticuerpos dependiente de células T en lactantes y niños pequeños con una respuesta de refuerzo y, en comparación con la vacuna de polisacárido, una mayor proporción de anticuerpos IgG en relación con los anticuerpos IgM.

Según estas observaciones, el antígeno concentrado de conjugado de polisacárido de *Haemophilus* se ve reforzado por la conjugación del polisacárido de *Haemophilus* tipo b con la proteína tetánica (proteína transportadora purificada y detoxificada).

2 Propiedades fisicoquímicas

En vista de la gran implicación del índice de conjugación del polisacárido en la inmunogenicidad de la vacuna, se prestó mayor atención a la caracterización del nivel de conjugación. Con este fin, se analizaron varios parámetros en el PRP-T y estos análisis se llevaron a cabo como pruebas de liberación del principio activo:

- El contenido de proteína transportadora libre debe ser inferior al 1 % del contenido proteico total.
- El contenido de polisacárido libre: sólo el polisacárido que está ligado con enlace covalente a la proteína transportadora; es decir, el polisacárido conjugado es importante desde el punto de vista inmunológico para la protección clínica. El contenido de polisacárido no conjugado debe ser inferior al 20 % del contenido total de polisacárido.



- Proporción entre el polisacárido y la proteína: la razón PRP/proteína garantiza que el polisacárido y la proteína tetánica se conjugan en una proporción constante que debe estar comprendida entre 0,33 y 0,55.
- Distribución del tamaño molecular: coeficiente de partición $K_D \leq 0,37$, radio hidrodinámico $R_h \geq 30$ nm y peso molecular $M_w \geq 4,2 \cdot 10^6$ Da.

3 Propiedades biológicas

El polisacárido libre (polisacárido no conjugado a la proteína transportadora) no presenta inmunogenicidad, mientras que el otro elemento conjugado, la proteína tetánica, puede inducir una respuesta inmunitaria humoral dependiente de células T. De hecho, se ha relacionado la IgG antipolisacárido con la eficacia de la vacuna.

Por consiguiente, la inmunogenicidad y la capacidad de inducir una memoria de producción de anticuerpos del antígeno concentrado del conjugado de polisacárido de *Haemophilus* se debe evaluar en animales. Sin embargo, los resultados de dichos estudios no se correlacionan con las propiedades inmunitarias de la vacuna en lactantes humanos. Por ello, a pesar de que es necesario analizar la inmunogenicidad en animales durante el desarrollo de la vacuna para demostrar la capacidad de inducir una respuesta inmunitaria dependiente de células T en las células B, no se emplea una prueba de potencia (inmunogenicidad) en animales para la liberación rutinaria de lotes. ^a

Como parte de la evaluación de las propiedades biológicas, el análisis de la irreversibilidad de la proteína tetánica garantiza una seguridad completa del granel concentrado conjugado de polisacárido de *Haemophilus* con respecto al potente desarrollo de la enfermedad tetánica. La irreversibilidad de la proteína tetánica se analiza en el intermedio de la proteína tetánica concentrada (CTP) (vea la sección 3.2.S.2.4 Control de pasos críticos e intermedios, Intermedio de CTP)

a WHO Informal Consultation on the Standardization and Control of *Haemophilus influenzae* type b (Hib) Conjugate Vaccines - Scientific Institute of Public Health (SEPH) Louis Pasteur, Brussels 10 & 11 April 1997



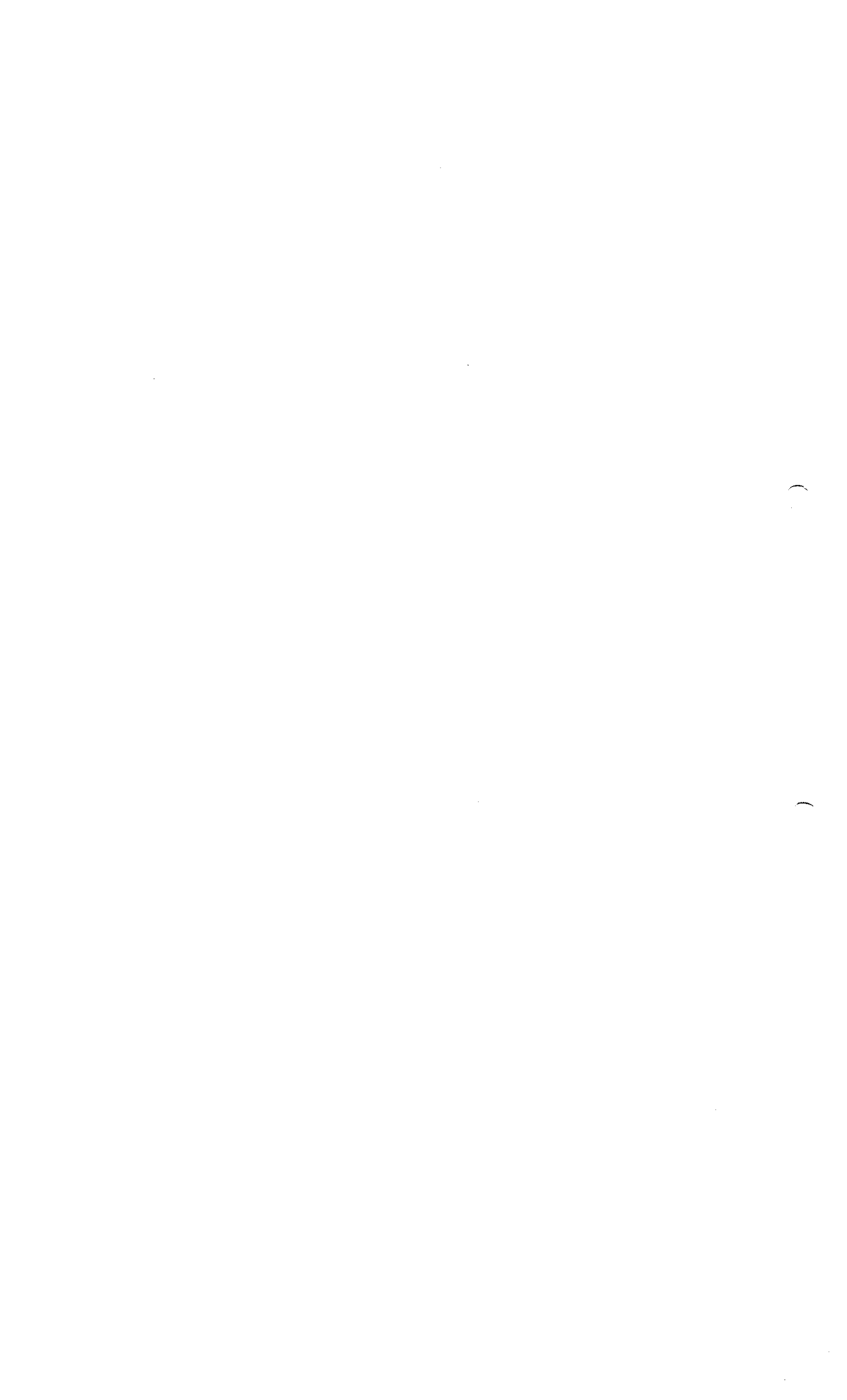


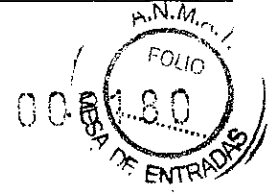
3.2.S.2.1

Fabricante(s) - PRP-T


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.





Sección 3.2.S.2.1 - Fabricante(s)

Lista de abreviaturas: vea la sección 2.3 Resumen general de calidad, Introducción

1 Nombre y dirección del fabricante

Dirección de la planta de elaboración y pruebas:

Sanofi pasteur
1541 avenue Marcel Mérieux
69280 – Marcy l’Etoile – Francia

(

)



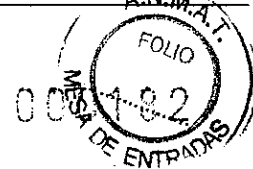
3.2.S.1.1

Nomenclatura - HBsAg


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.





Sección 3.2.S.1.1 - Nomenclatura

Lista de abreviaturas: vea la sección 2.3 Resumen general de calidad, introducción.

- Nombre de la Farmacopea Europea:

Antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) [Monografía n.º1056, Hepatitis B Vaccine (rDNA) (vacuna contra la hepatitis B (ADNr))].

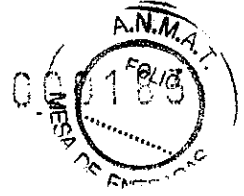
- Nombre de la OMS:

Antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) [otorgado en las recomendaciones de la OMS para asegurar la calidad, seguridad y eficacia de las vacunas recombinantes contra la hepatitis B, adoptadas por el ECBS en octubre de 2010 (TRS 786 revisado)].

- Nombres de uso interno en la compañía (utilizados en esta solicitud):

Antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg).



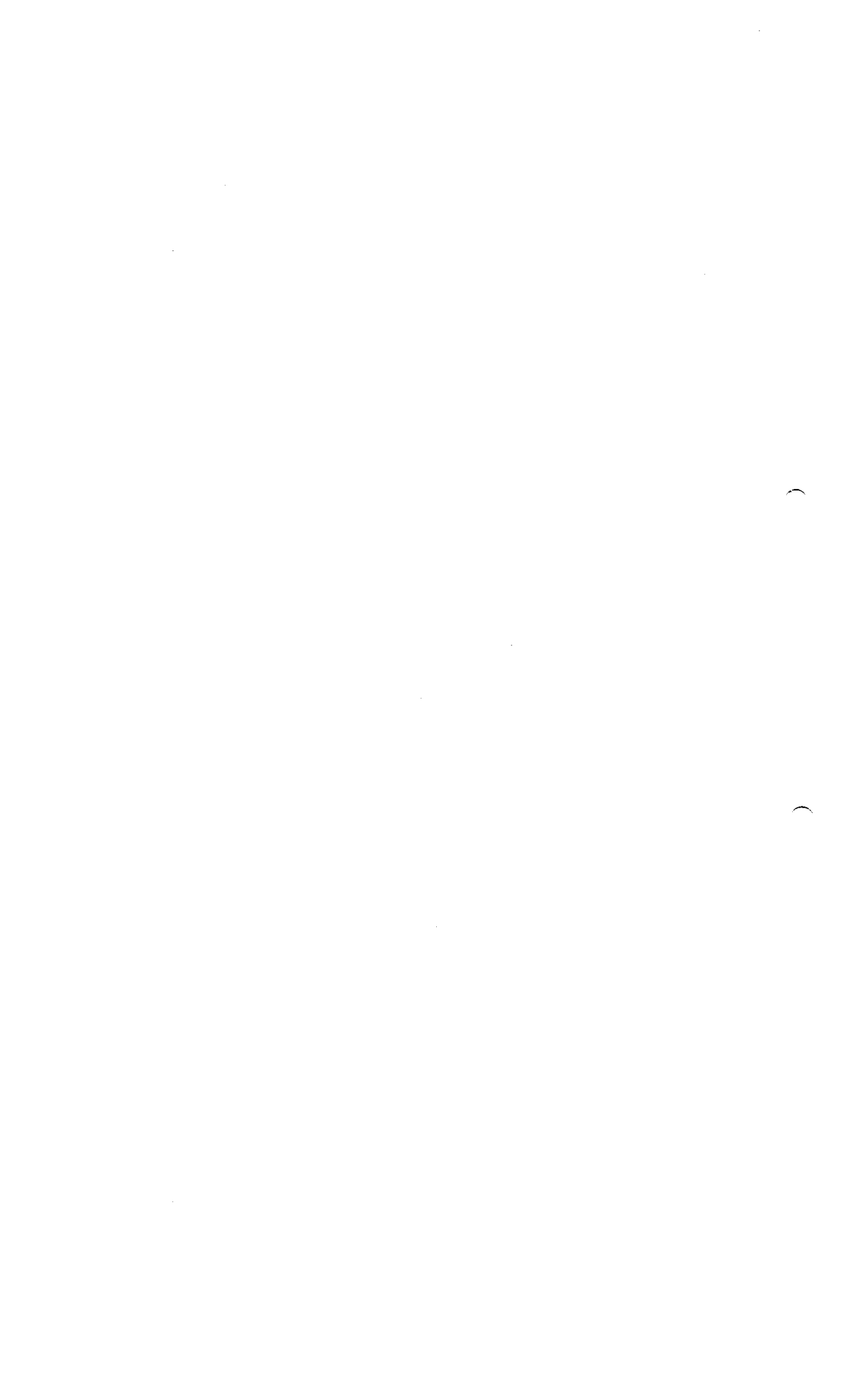


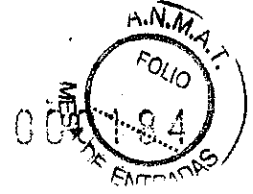
3.2.S.1.2

Estructura - HBsAg


ROXANA MONTEMLONE
DIRECTORA TECNICA
SANOFI PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.





Sección 3.2.S.1.2 - Estructura

Índice

Lista de figuras	2
1 Información general.....	3
2 Estructura de la proteína S	3
3 Estructura de la partícula.....	4
Lista de referencias	7



Lista de figuras

Figura 1: Secuencia de ADN y secuencia de aminoácidos deducidas de la codificación genética de la proteína S expresada en la levadura *H. polymorpha*.5



Lista de abreviaturas: vea la sección 2.3 Resumen general de calidad, introducción



1 Información general

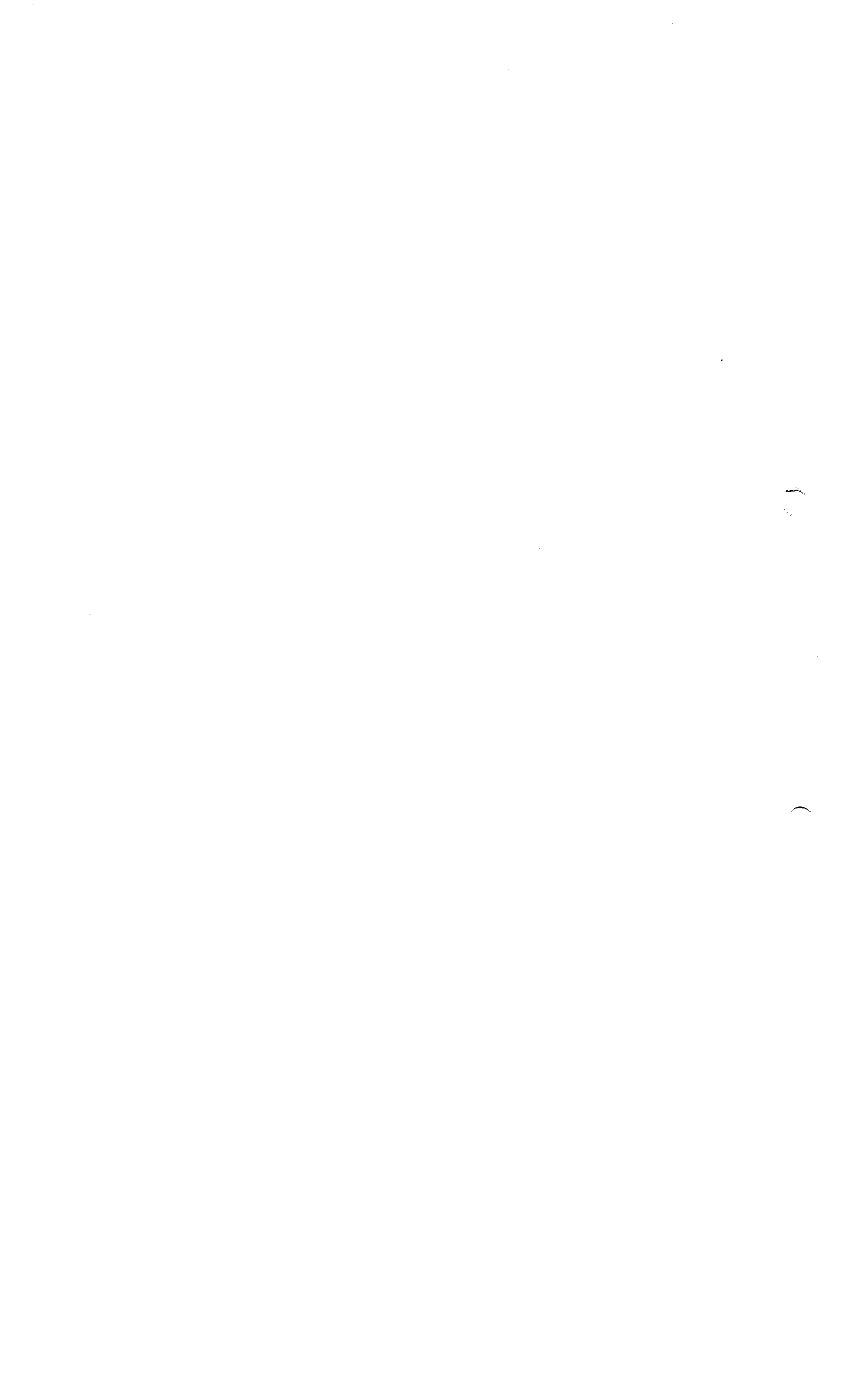
El antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) se produce en la levadura recombinante *Hansenula polymorpha* mediante pasos sucesivos de fermentación, cosecha, purificación y maduración. Este antígeno existe como partícula compuesta de proteínas y lípidos (60% proteínas y 40% lípidos por peso). El componente proteico es la pequeña proteína de superficie (proteína S) del virus de la hepatitis B, que es una proteína de membrana de alrededor de 25 kDa. El componente lipídico está compuesto por lípidos de la levadura, principalmente fosfolípidos (1), (2), (3), (4).

2 Estructura de la proteína S

La codificación genética de la proteína S se amplificó mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) partiendo de un aislado viral y se clonó en un plásmido utilizado para transformar la cepa RB11 de *H. polymorpha*. La secuenciación genética produjo 678 pares de bases que codifican una proteína de 226 aminoácidos. En la figura 1 se presentan la secuencia de ADN y la secuencia de aminoácidos deducidos se presentan. Un análisis de electroforesis con gel (SDS-PAGE) en condiciones reductoras mostró una banda principal de masa molecular cercana a los 25 kDa. El análisis mediante secuenciación con el método de Edman del extremo N-terminal de esta proteína produjo la secuencia Met-Glu-Asn-Ile-Thr-Ser-Gly-Phe-Leu correspondiente a la traducción de aminoácidos de la secuencia de ADN presentada en la figura 1. El análisis de espectrometría de masas confirmó la secuencia esperada de la proteína S.

Se pueden distinguir cuatro determinantes antigénicos principales (*adw*, *ayw*, *adr*, *ayr*) con anticuerpos que reconocen distintos epítomos en la superficie de la partícula de HBsAg. Todos los subtipos conocidos contienen el determinante "a", que es codificado por los aminoácidos 124 a 147 de la proteína S. Los anticuerpos dirigidos contra el determinante "a" protegen contra la infección (5), (6). La sustitución de la lisina (Lys) por la arginina (Arg) en el residuo 160 determina el determinante w/r específico de subtipo mutuamente excluyente. La sustitución de la lisina (Lys) por la arginina (Arg) en el residuo 122 determina el determinante d/y específico de subtipo mutuamente excluyente. La presencia de una prolina (Pro) en el residuo 127 determina la especificidad w1/w2 (la reactividad w1 requiere asimismo una arginina en la posición 122, una fenilalanina en la posición 134 y/o una arginina en la posición 159) (7). La secuencia de aminoácidos presentada en la figura 1 indica que tenemos el subtipo *adw*₂ (Lys en la posición 122, Pro en la posición 127 y Lys en la posición 160).

El análisis *in silico* de la secuencia de la proteína S presentada en la Figura 1 indica que la proteína es altamente hidrofóbica (55% de aminoácidos hidrofóbicos), con solamente dos regiones relativamente hidrofílicas. Es probable que en las regiones hidrofóbicas se formen múltiples hélices α a través de la capa de lípidos (8), lo cual confirma el análisis de la estructura secundaria mediante espectroscopía infrarroja (alrededor de un 59% de hélice α). La proteína S tiene un posible lugar de glicosilación en la asparagina (Asn) 146, del cual se presume que no está glicosilado en el presente caso, como lo demuestra el análisis de composición de azúcares (1), (4), (2). La metionina del terminal N podría estar acetilada (9), (2). En nuestro caso, la proteína S está



parcialmente acetilada, lo cual se confirma mediante los análisis de espectrometría de masas/secuenciación del terminal N..



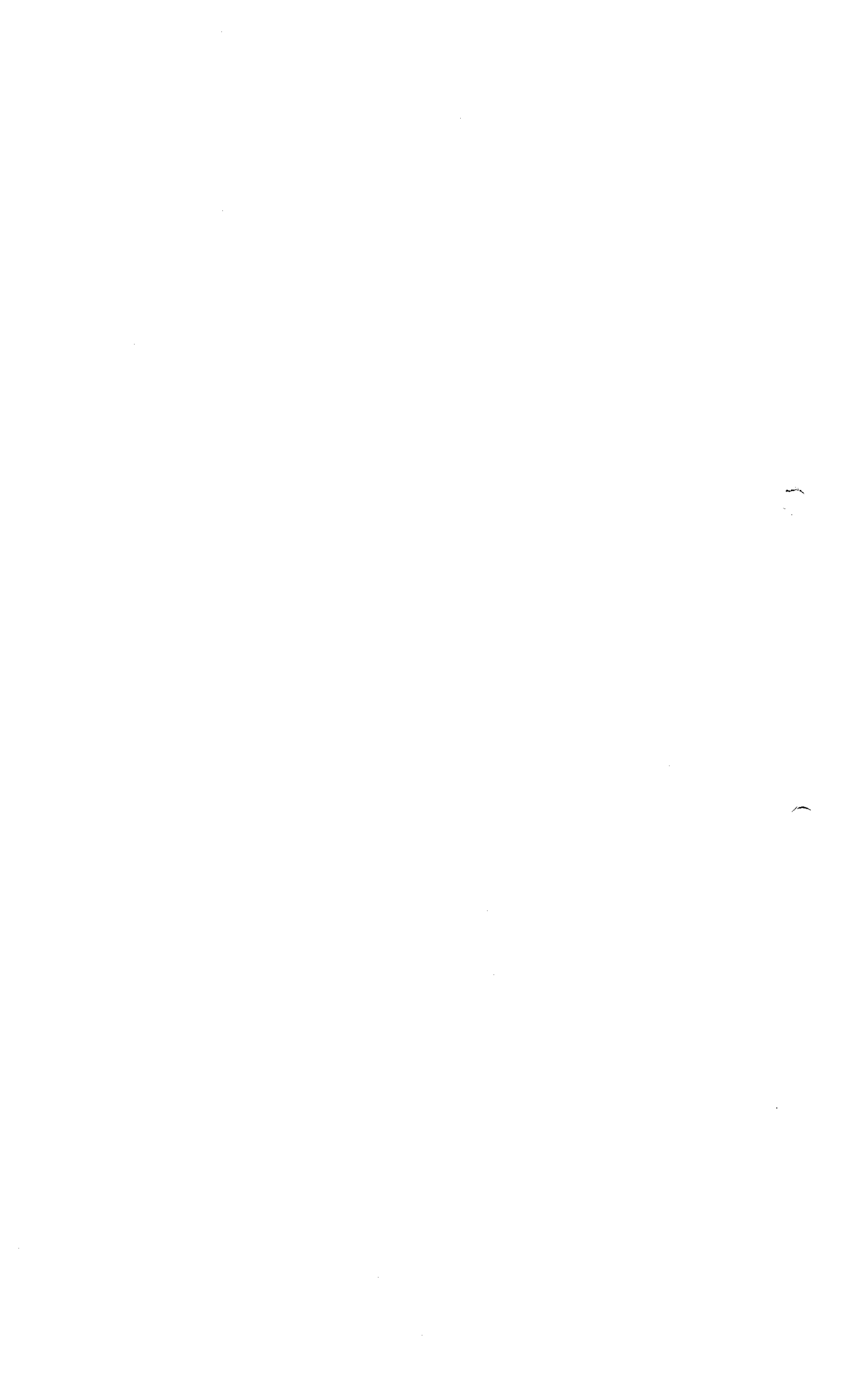
3 Estructura de la partícula

Durante la expresión en la levadura, alrededor de cien monómeros de proteína S se asocian de manera espontánea para formar una partícula de alrededor de 23 nanómetros de diámetro (3) cuya masa molecular es de alrededor de $4 \cdot 10^6$ Da (10), como se demostró mediante un análisis de microscopía electrónica y análisis de filtración por gel aunado a detección por dispersión de la luz. El ensamble de esta partícula de lipoproteína se inicia mediante la inserción de segmentos hidrofóbicos de la proteína S en la membrana del retículo endoplasmático de la levadura (11), (12). La formación de partículas probablemente se produce a raíz de un proceso de gemación como el que se observa con otras partículas que contienen lípidos, en especial virus. Las partículas se mantienen intracelulares en esencia y se liberan cuando se rompen las células de levadura.

Es posible que la organización lipídica general de estas partículas no sea una bicapa lipídica convencional; este punto sigue siendo controvertido (13), (14). No obstante, es muy probable que la organización y composición lipídica afecten la exposición de los epítomos de la proteína S en la superficie de la partícula, y por ende la inmunogenicidad (15), (16), (17), (18). La composición lipídica de la partícula es constante. Los lípidos son principalmente fosfolípidos, en especial fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol y fosfatidiletanolamina, triglicéridos y ácidos grasos libres.

La proteína S contiene 14 residuos de cisteína que se oxidan durante el proceso de elaboración y forman enlaces disulfuro inter- e intramoleculares. Algunos de los enlaces disulfuro inter- e intramoleculares se forman durante la síntesis proteica en la célula de levadura (19). Se forman enlaces disulfuro adicionales luego de la fragmentación celular durante el proceso de purificación (20), (21). De este modo, esta partícula es una entidad hidrofóbica, altamente reticulada por enlaces disulfuro, como lo demuestra la electroforesis en gel no reductora así como el ensayo de grupos sulfhidrilo libres.

La conformación de las moléculas de proteína S de esta partícula es tal que hay múltiples epítomos conformacionales, que dependen principalmente de los enlaces disulfuro, presentes en la superficie de la capa lipídica. Las propiedades antigénicas e inmunológicas de la partícula dependen de la formación satisfactoria de estos enlaces disulfuro (22), (23). Estos epítomos, presentes entre otros al nivel del determinante "a", inducen una respuesta de anticuerpos que brinda protección contra el virus de la hepatitis B tanto en animales como en el ser humano (24), (25), (26). La antigenicidad se documenta a través de la interacción con distintos anticuerpos monoclonales que reconocen los epítomos dependientes de los enlaces disulfuro (26), (27), (28), (29), (30), (31).



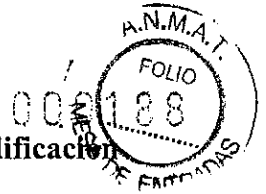


Figura 1: Secuencia de ADN y secuencia de aminoácidos deducidas de la codificación genética de la proteína S expresada en la levadura *H. polymorpha*.

Los aminoácidos que determinan el subtipo adw2 están en negrita. El sitio de la posible glicosilación está en itálica.

30 60
ATG GAG AAC ATC ACA TCA GGA TTC CTA GGA CCC CTG CTC GTG TTA CAG GCG GGG TTT TTC
Met Glu Asn Ile Thr Ser Gly Phe Leu Gly Pro Leu Leu Val Leu Gln Ala Gly Phe Phe

90 120
TTG TTG ACA AGA ATC CTC ACA ATA CCG CAG AGT CTA GAC TCG TGG TGG ACT TCT CTC AAT
Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn

150 180
TTT CTA GGG GGA TCA CCC GTG TGT CTT GGC CAA AAT TCG CAG TCC CCA ACC TCC AAT CAC
Phe Leu Gly Gly Ser Pro Val Cys Leu Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser Asn His

210 240
TCA CCA ACC TCC TGT CCT CCA ATT TGT CCT GGT TAT CGC TGG ATG TGT CTG CGG CGT TTT
Ser Pro Thr Ser Cys Pro Pro Ile Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe

270 300
ATC ATA TTC CTC TTC ATC CTG CTG CTA TGC CTC ATC TTC TTA TTG GTT CTT CTG GAT TAT
Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu Leu Val Leu Leu Asp Tyr

330 360
CAA GGT ATG TTG CCC GTT TGT CCT CTA ATT CCA GGA TCA ACA ACA ACC AGT ACG GGA CCA
Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Thr Thr Thr Ser Thr Gly Pro

390 420
TGC AAA ACC TGC ACG ACT CCT GCT CAA GGC AAC TCT ATG TTT CCC TCA TGT TGC TGT ACA
Cys **Lys** Thr Cys Thr Thr **Pro** Ala Gln Gly Asn Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr

450 480
AAA CCT ACG GAT GGA AAT TGC ACC TGT ATT CCC ATC CCA TCG TCC TGG GCT TTC GCA AAA
Lys Pro Thr Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala **Lys**

