

## Sección 3.2.S.1.2 Estructura

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

El toxoide diftérico purificado (PDT) se convierte a partir de la toxina diftérica (DT) secretada por el crecimiento de *Corynebacterium diphtheriae*, un bacilo gram positivo delgado que por lo general tiene un extremo más ancho.

La DT excretada es un polipéptido intacto de una sola cadena (masa molecular relativa de 58,3 kD) que contiene dos enlaces disulfuro. La figura 1 ilustra la secuencia de aminoácidos de la toxina diftérica. El polipéptido de la toxina posee dos dominios funcionales: un dominio de ADP ribosil transferasa que cataliza la ribosilación ADP del EF-2 (factor de elongación 2) y un dominio de enlace celular. Estos dos dominios funcionales están divididos en dos fragmentos (A y B) conectados por un enlace péptido y un puente disulfuro. El fragmento A (masa molecular relativa de 21,0 kD) y el fragmento B (masa molecular relativa de 37,3 kD) se pueden separar por una reacción proteolítica, pero permanecen conectados por el puente disulfuro (vea la figura 2), que representa la forma escindida de la toxina diftérica. En la cosecha del medio de cultivo que se obtiene a partir de la propagación de *Corynebacterium diphtheriae*, puede existir la toxina diftérica en sus dos formas: intacta y escindida. El efecto citolítico de la toxina que ejerce la actividad enzimática del fragmento A requiere la entrada a la célula huésped a través del fragmento B y la liberación del fragmento A mediante el proceso de proteólisis y el proceso de reducción del disulfuro.



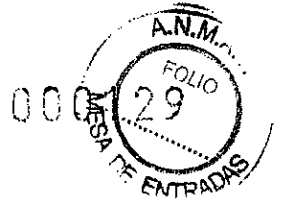


Figura 1: Secuencia esquemática de los aminoácidos de la toxina diftérica

NH<sub>2</sub>-GADDVVDS SKS FVMENFSSYHGTPGYVDSIQKGIQKPKSGTQGNYYDDWK  
GFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVTYPGLTKVLALKVDNAETIKKEL  
GLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFGDGASRVVLSLPFAEGSSVEYINNWEQAKALSV

S ————— S  
| |

ELEINFETRGRGQDAMYEMYAQACAGNRVRRSVGSSLSCINLDWDVIRDKTKTK

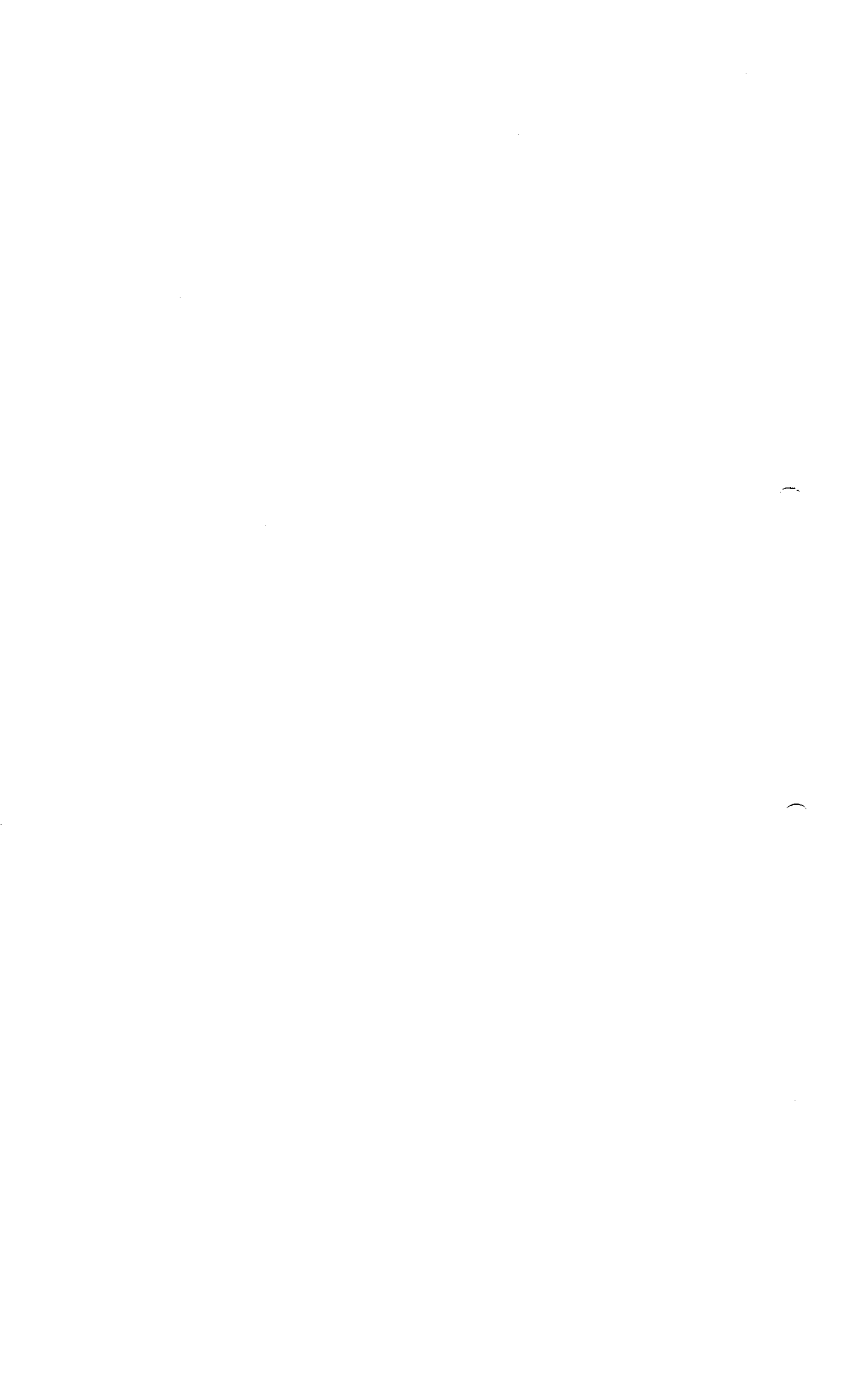
Lugar

proteolítico

IESLKEHGPIKNKMSESPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHPELSELKTVTGTP  
VFAGANYAAWAVNVAQVIDSETADNLEKTTAALSILPGIGSVMGIADGAVHHNTE  
EIVAQSIALS SLMVAQAIPLVGELVDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRPAYS  
PGHKTQPF LHDGYAVSWNTVEDSII RTGFQGESGHDIKITAENTPLPIAGVLLPT

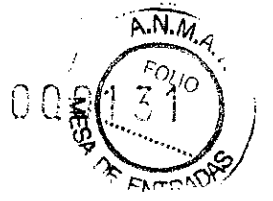
S ————— S  
| |

IPGKLDVNKSKTHISVNGRKIRMRCRAIDGDVTF CRPKSPVYVGNVHANLHVAF  
HRSSSEKIHSNEISSDSIGVLGYQKTV DHTKVNSKLSLFFEIKS -COOH







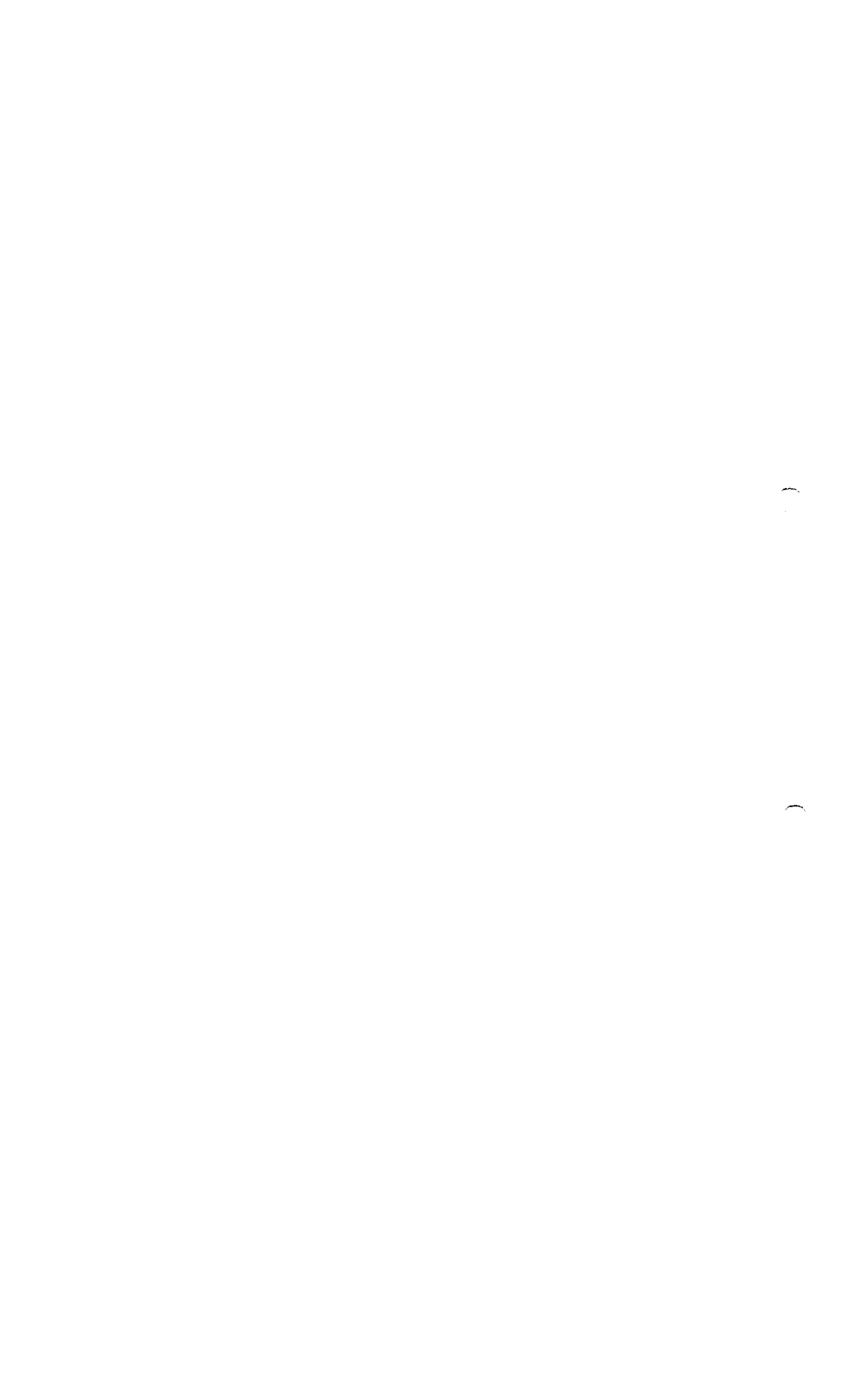


3.2.S.1.3

**Información General - Diftérico**

  
ROXANA MONTEMILONE  
DIRECTORA TÉCNICA  
SANOFI PASTEUR S.A.

  
CHRISTIAN DOMÍNGUEZ  
APODERADO  
SANOFI PASTEUR S.A.





## Sección 3.2.S.1.3 Propiedades generales

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

### 1 Descripción general

La toxina diftérica es una exotoxina producida por la *Corynebacterium diphtheriae* y puede producir pseudomembranas obstructivas en el tracto respiratorio superior (laringitis diftérica) o daño al miocardio o a otros tejidos, principalmente en niños.

La toxina está compuesta por una fracción terminal N, fragmento A, que conlleva una actividad de ribosilación (ribosilación ADP) del difosfato de adenosina, y una fracción terminal C, fragmento B, que se supone que tiene una función de unión al receptor. Las fracciones A y B están unidas por un enlace péptido y un puente disulfuro. Se requiere la escisión proteolítica del polipéptido, así como la reducción del disulfuro, para que los fragmentos A y B se separen y para que se exprese la actividad enzimática del fragmento A. La toxina diftérica es una enzima que cataliza específicamente la ribosilación ADP del factor de elongación 2 (EF2), bloqueando así la síntesis proteica. Esta modificación es la causa de la toxicidad de la molécula.

La cepa utilizada es la Utrecht No. IM 1514 de *Corynebacterium diphtheriae*, que se somete a subcultivos consecutivos, seguidos de fermentación, clarificación del medio que contiene la toxina, concentración y diafiltración antes de que la toxina sea sometida a detoxificación con formaldehído y a purificación y para obtener el toxoide diftérico purificado (PDT) final.





## 2 Propiedades fisicoquímicas

La toxina diftérica tiene 535 residuos de aminoácidos y un peso molecular de 58,3 kDa en la forma estructural de cadena única y, en la forma escindida, dos fragmentos de 21,0 kDa (fragmento A) y 37,3 kDa (fragmento B) conectados por un puente disulfuro. La estructura cristalográfica revela tres campos que corresponden a las tres funciones principales:

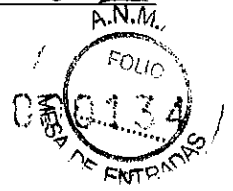
- el dominio catalítico C, llamado fragmento A, es del tipo  $\alpha + \beta$ ;
- el dominio transmembrana T consiste en un paquete de hélices  $\alpha$ ,
- y el dominio R de unión al receptor es un barril  $\beta$  aplanado.

Tanto el dominio transmembrana T como el dominio R de unión al receptor corresponden al fragmento B.

La detoxificación con formaldehído reduce el número de grupos amino primarios y forma enlaces cruzados intra- e intermoleculares que estabilizan la estructura de la proteína, haciéndola así más resistente a la desnaturalización.

La estructura secundaria no se ve afectada por el proceso de detoxificación, ya que se ha probado mediante espectros de dicroísmo circular en la región UV lejana; sin embargo, se encuentran diferencias en la estructura terciaria de la región UV cercana.





### 3 Actividad biológica

#### 3.1 Propiedades biológicas

El toxoide purificado a granel cumple con los requisitos de la Farmacopea Europea en cuanto a:

- Esterilidad
- Ausencia de toxina e irreversibilidad del toxoide
- Pureza antigénica

La prueba de ausencia de toxina garantiza la ausencia de toxicidad causada por la toxina que muestra una citotoxicidad específica hacia las células Vero. Esta propiedad se usa para detectar la presencia de toxina diftérica en un medio de cultivo mediante la inhibición del crecimiento celular.

La prueba de irreversibilidad del toxoide demuestra que no puede tener lugar la reversión de la toxicidad durante el almacenamiento. Esta prueba también se basa en la propiedad de la toxina diftérica de mostrar una citotoxicidad específica hacia las células Vero. No se puede observar un efecto citotóxico.

La pureza antigénica se calcula obteniendo la proporción entre el título de floculación y el contenido de nitrógeno proteico. El título de floculación expresado en la unidad de floculación (Lf) se determina mediante la prueba de floculación. La unidad de floculación de un toxoide está determinada por el número de unidades Lf de antitoxina que induce una floculación visible cuando se mezcla con la muestra.

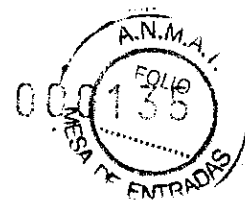
#### 3.2 Evaluación cualitativa

La prueba de actividad biológica (ensayo de potencia) se lleva a cabo con el producto final a granel, es decir, después de mezclar el principio activo de difteria con los otros componentes de la vacuna. Se determina mediante una comparación con material de referencia calibrado con respecto al estándar internacional de toxoide diftérico adsorbido.

### 4 Propiedades inmunoquímicas

La avidéz de los anticuerpos dirigidos hacia la porción del fragmento B de la toxina diftérica es mayor que la de los anticuerpos antifragemento A. Parece que el formaldehído protege la región B del ataque proteolítico; por lo tanto, se conserva la inmunogenicidad del fragmento B en el PDT.





**3.2.S.2.1**

**Fabricante(s) - Diftérico**

  
ROXANA MONTEMILONE  
DIRECTORA TÉCNICA  
SANOFI PASTEUR S.A.

  
CHRISTIAN DOMINGUEZ  
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

