



Tabla 39: Resultados del contenido de sacarosa para comprobar la homogeneidad de la mezcla

	Serie n.º 1		Serie n.º 2		Serie n.º 3	
	Antes de agitar T = 0 min	Después de agitar T = 30 min	Antes de agitar T = 0 min	Después de agitar T = 30 min	Antes de agitar T = 0 min	Después de agitar T = 30 min
Contenido de sacarosa (R1-R2-R3-R4-R5) (g/L)	137-112-130-132-74	119-125-121-132-126	108-107-126-134-86	123-121-128-126-121	134-130-131-133-78	117-119-121-116-122
Criterios de aceptación	[106 ; 128]	[113 ; 137]	[101 ; 123]	[112 ; 136]	[110 ; 133]	[108 ; 130]
Conclusión	Heterogeneidad de la solución.	Homogeneidad de la solución.	Heterogeneidad de la solución.	Homogeneidad de la solución.	Heterogeneidad de la solución.	Homogeneidad de la solución.

Los resultados de la densidad óptica y del contenido de sacarosa obtenidos para los tres lotes antes de la agitación se encuentran fuera de los criterios de aceptación. Esto confirma la heterogeneidad de la solución antes de la agitación.

Los resultados de la densidad óptica y del contenido de sacarosa obtenidos para los tres lotes después de la agitación se encuentran dentro de los criterios de aceptación y demuestran que las soluciones elaboradas son homogéneas tras un mínimo de 30 minutos de agitación.

No hubo ninguna desviación (menor o mayor) del protocolo durante la realización de los estudios de validación.

3.2.3 Conclusión de la validación del paso de agitación durante la mezcla

Todos los resultados de validación cumplen con los criterios de aceptación. Por lo tanto, el paso de agitación durante la mezcla queda validado para el tamaño de lote de 300 L.

3.3 Validación del paso de mezcla

El paso de mezcla del trivalente concentrado se validó para el tamaño de lote de 300 L, para garantizar que el producto elaborado cumple las especificaciones vigentes en el momento del estudio de validación, de forma reproducible y comparable.

3.3.1 Resumen del protocolo para la validación del paso de mezcla

Para el estudio de validación se elaboraron tres lotes de trivalente concentrado.

Resumen del protocolo de validación

La validación del paso de mezcla se demuestra por la ausencia de degradación del producto y se basa en el cumplimiento de las especificaciones del trivalente concentrado (reproducibilidad).



Se analizaron dos características: el contenido de antígeno D y la medición del pH. Se llevó a cabo una comparación de resultados analíticos con intervalos de confianza establecidos con datos históricos. Los intervalos de confianza se determinaron estadísticamente a partir de resultados analíticos de lotes elaborados en el año 2000.

Parámetros operativos para el estudio de validación y para los lotes de validación

Entre los tres lotes de validación de trivalente concentrado, un lote (FA074603) se elaboró en condiciones desfavorables (máxima velocidad de agitación) para la calidad del producto. En la tabla 40 se presentan los parámetros operativos utilizados para el estudio de validación dependiendo de los lotes (estos lotes no se elaboran con monovalentes incluidos en la validación de la producción de los monovalentes tipo 1, 2 y 3 presentada previamente).

Tabla 40: Parámetros operativos y lotes de validación utilizados en la validación de la mezcla

Número de lote	Fecha de elaboración	Tamaño del lote	Velocidad de agitación	Duración de la agitación
FA074603	19 abr 2001	300 L	310 rpm	30 min
FA076901	03 may 2001	300 L	290 rpm	30 min
FA081248	20 jun 2001	300 L	290 rpm	30 min

3.3.2 Datos de validación del proceso de mezcla

Los resultados de las pruebas de liberación de los lotes deben estar dentro de las especificaciones de liberación. Las pruebas de control de calidad para la liberación de los tres lotes de trivalente concentrado y sus especificaciones se presentan en la tabla 41.

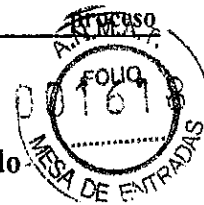


Tabla 41: Resultados de control de calidad para los lotes de trivalente concentrado

Pruebas	Criterios de aceptación	Resultados		
		FA 074603*	FA 076901*	FA 081248*
Aspecto†	Transparente, incoloro.	Transparente, incoloro.	Transparente, incoloro.	Transparente, incoloro.
Medición del pH	6,5 - 7,5	7,10	7,18	7,16
Contenido de formaldehído residual	≤200 µg/mL	49,78	46,82	52,21
Contenido de albúmina de suero bovino	≤100 ng/mL	<3,9	<3,9	<3,9
Contenido de endotoxinas bacterianas	≤1000 UI/mL	<0,5	<0,5	<0,5
Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica	No se observa crecimiento microbiano.	Cumple	Cumple	Cumple
Contenido de antígeno D (por el método de líneas paralelas)‡	Tipo 1: unas 400 UD§/mL. Tipo 2: unas 80 UD/mL. Tipo 3: unas 320 UD/mL.	390 75,2 330	391 78,4 332 =	409 86,5 335
Prueba de inactivación efectiva†	Sin efecto citopático.	Cumple.	Cumple	Cumple

* Los tres lotes, no destinados al mercado europeo, no se controlan de conformidad con las especificaciones europeas. El método de líneas paralelas para el contenido de antígeno D se describe en la sección 3.2.S.7.3 Datos de estabilidad.

† De acuerdo con el perfil de control de calidad vigente estas pruebas ya no se realizan.

‡ Los criterios de aceptación para el contenido de antígeno D han sido revisados para el tercer lote FA081248 y son:

Tipo 1: 400 UD/mL ± 30 %; es decir, 280 – 520 UD/mL.

Tipo 2: 80 UD/mL ± 30 %; es decir, 56 – 104 UD/mL.

Tipo 3: 320 UD/mL ± 30 %; es decir, 224 – 416 UD/mL.

Todos los resultados obtenidos para los tres lotes se encuentran dentro de los nuevos criterios de aceptación.

El método aplicado fue el método vigente en el momento del estudio (método actual: método sigmoideo).

§ UD: unidad de antígeno D.





Todos los resultados analíticos obtenidos para 3 lotes industriales cumplieron los criterios de aceptación.

Las diferencias de resultados entre los 3 lotes de validación para el contenido de antígeno D y para la medición del pH deben estar comprendidas dentro de los intervalos de confianza basados en datos históricos (media \pm 2 desviaciones estándar).

Estos intervalos de confianza son:

- Antígeno D tipo 1: [348,08 ; 461,94].
- Antígeno D tipo 2: [67,53 ; 87,73].
- Antígeno D tipo 3: [283,28 ; 380,92].
- Medición del pH: [7,08 ; 7,28].


Todos los resultados obtenidos para el contenido de antígeno D y para la medición del pH se encuentran dentro de los intervalos de confianza.

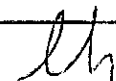
No hubo ninguna desviación (menor o mayor) del protocolo durante la realización de los estudios de validación.

El proceso de mezcla es reproducible.

3.4 Conclusión de la validación del paso de mezcla

Todos los resultados obtenidos en lotes de trivalente concentrado demuestran que el paso de mezcla del trivalente concentrado está validado para un tamaño de lote de 300 L de trivalente concentrado.


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.





4 Validación del equipo

En los capítulos siguientes se describen los estudios de validación del actual soporte cerámico HyperD DEAE (GM y PM) y del soporte Sepharose CL6B:

- La validación de la limpieza de las columnas cromatográficas empleadas durante la purificación.
- La validación del almacenamiento de las columnas cromatográficas empleadas durante la purificación.
- La validación de la vida útil de las columnas cromatográficas.

Nota: el cambio de la concentración de tampón de fosfato de 25 mM a 35 mM durante el paso de purificación no tiene impacto alguno sobre la validación de la limpieza y la vida útil de las columnas cromatográficas con soporte cerámico HyperD DEAE (GM y PM) y de Sepharose.

4.1 Estudios de validación de las columnas cromatográficas con soporte cerámico HyperD DEAE

4.1.1 Validación de la limpieza de las columnas cromatográficas con soporte cerámico HyperD DEAE

Con la introducción del soporte cerámico HyperD DEAE para cromatografía utilizado en las etapas de purificación, las dimensiones de las columnas de cromatografía por intercambio iónico (IEC), gran capacidad (GM = Grand Modèle) y pequeña capacidad (PM = Petit Modèle) han cambiado. El estudio de la dimensión de IEC para ambas columnas se presenta en la sección 3.2.S.2.6 Desarrollo del proceso de elaboración. El objeto de este estudio de validación es mostrar la eficiencia, la reproducibilidad y el control del proceso de limpieza de las columnas de IEC.

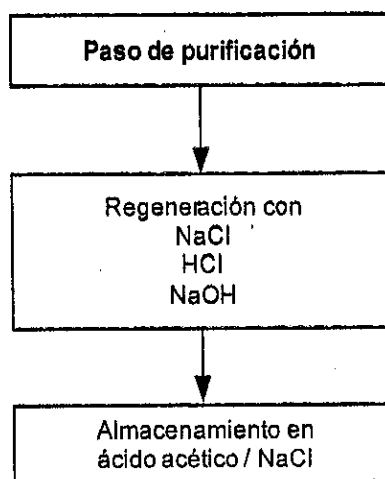
4.1.1.1 Principio de validación de la limpieza

El proceso de limpieza actual que se debe utilizar para las columnas de IEC GM y PM rellenas con soporte cerámico HyperD DEAE se describe en la figura 14.

Después de cada paso de purificación, la columna de IEC se regenera con solución de NaCl, HCl y NaOH sucesivamente, con objeto de eliminar las impurezas fijadas al soporte cerámico HyperD DEAE durante la purificación. La columna con soporte cerámico HyperD DEAE se conserva después en solución de ácido acético / NaCl hasta su siguiente uso. Esta conservación va seguida siempre de un paso de equilibrado para eliminar los residuos de ácido acético antes del uso y para ajustar con tampón de fosfato el soporte cerámico HyperD DEAE a las condiciones de pH y conductividad de la purificación.



Figura 14: Diagrama de flujo del proceso de limpieza para las columnas de IEC GM y PM



La validación del proceso de limpieza se llevó a cabo en 3 pruebas sucesivas para las columnas de IEC GM y PM después de un ciclo de purificación completo. Antes de cada ciclo de purificación se lleva a cabo un paso de equilibrado con tampón de fosfato.

Los parámetros seguidos para la validación de la limpieza fueron:

- Contenido de carbono orgánico total (TOC) después del paso de equilibrado para comprobar la ausencia de residuos del producto previamente purificado en la columna de IEC GM o PM. El criterio de aceptación es ≤ 10 ppm.
- Contenido de carbono total (TC) después del paso de equilibrado para comprobar la eliminación del ácido acético utilizado para la conservación. El criterio de aceptación es ≤ 10 ppm.
- Carga biológica y contenido de endotoxinas después del paso de equilibrado para comprobar la ausencia de cualquier contaminación biológica. El criterio de aceptación es < 5 UFC/10 mL para la carga biológica y $< 0,25$ UI/mL para las endotoxinas.

4.1.1.2 Resultados de la validación

Resultados obtenidos con las columnas de IEC, gran capacidad (GM)

Se llevaron a cabo tres pruebas consecutivas para la validación de la limpieza de las columnas de IEC de gran capacidad (GM) rellenas con soporte cerámico HyperD DEAE. Los lotes de suspensión viral purificada y concentrada utilizados para la validación de la columna de IEC GM se presentan en la tabla 42.





Tabla 42: Lotes de suspensión viral purificada y concentrada incluidos en la validación de la limpieza de las columnas de IEC GM

Número de lote	Fecha de elaboración
FA334188 (tipo 2)	14 ene 2009
FA334264 (tipo 2)	21 ene 2009
FA334297 (tipo 2)	28 ene 2009

Note: el proceso de limpieza y su eficiencia no dependen del serotipo; la validación se llevó a cabo en los tres primeros lotes.

Los criterios de aceptación y los resultados obtenidos para la validación de la limpieza de las columnas de IEC GM se presentan en la tabla 43.

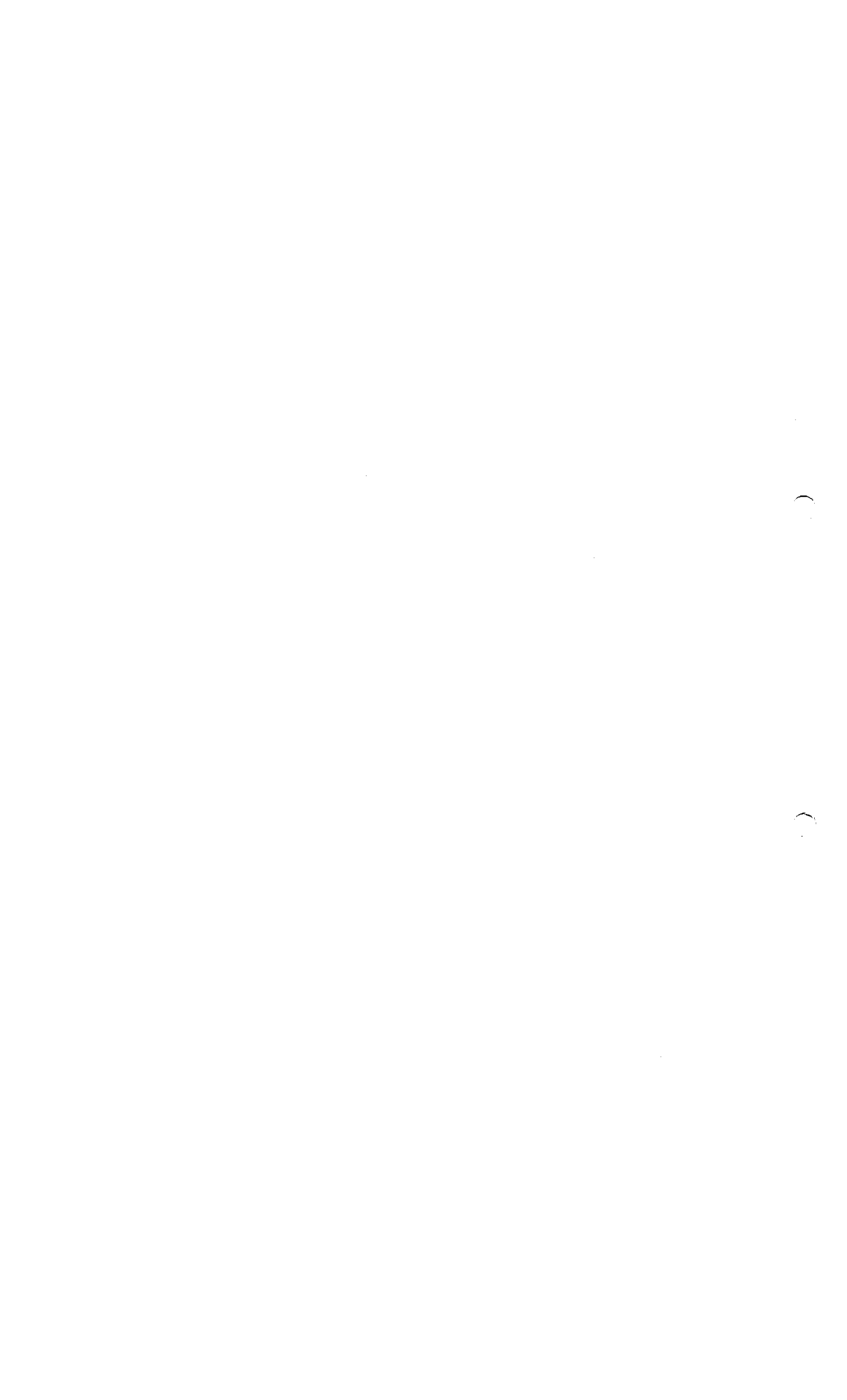
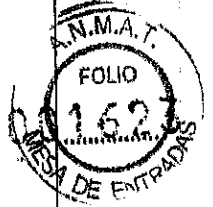


Tabla 43: Resultados de las pruebas obtenidos durante la validación de la limpieza de las columnas de IEC GM

Ensayos de elementos marcadores	Pruebas		Criterios de aceptación	FA334188	FA334264	FA334297	Estado
	TOC	TC					
	TOC		≤10 ppm	0,43	0,65	1,10	Cumple.
	TC		≤10 ppm	1,44	2,34	1,95	Cumple.
	Contenido de carga biológica		<5 UFC/10 mL	0	0	0	Cumple.
	Contenido de endotoxinas		<0,25 UI/mL	<0,25	<0,25	<0,25	Cumple.


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A


CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A







Todos los resultados cumplen con los criterios de aceptación.

- El contenido de TOC al final del enjuague (equilibrado con tampón de fosfato) cumple con los criterios de aceptación. Los residuos del producto fueron eliminados por la limpieza y el enjuague con tampón de fosfato.
- El contenido de TC al final del enjuague (equilibrado con tampón de fosfato) después del almacenamiento cumple con los criterios de aceptación. La eliminación del ácido acético y de los productos de regeneración queda demostrada.
- La carga biológica y el contenido de endotoxinas al final del enjuague (equilibrado con tampón de fosfato) después del almacenamiento cumple con los criterios de aceptación. El nivel de contaminación biológica se controla durante la conservación.

Por tanto, el proceso de limpieza (presentado en la figura 14) está validado y ha demostrado ser adecuado para el uso rutinario para las columnas de IEC de gran capacidad (GM) rellenas del soporte cerámico HyperD DEAE.

Resultados obtenidos con las columnas de IEC, pequeña capacidad (PM)

La evaluación de la limpieza de las columnas de IEC de pequeña capacidad (PM) rellenas con el soporte cerámico HyperD DEAE se evaluó a partir de los resultados obtenidos en tres pruebas consecutivas.

Tras un resultado fuera de especificaciones para el contenido de carga biológica en la tercera prueba debido a una contaminación que tuvo lugar durante la toma de muestras, esta tercera prueba fue declarada inválida y se llevó a cabo, por lo tanto, una prueba adicional consecutiva.

Los cuatro lotes de suspensión viral purificada y concentrada que se utilizaron para la validación de la columna de IEC PM se presentan en la tabla 44.

Tabla 44: Lotes de suspensión viral purificada y concentrada incluidos en la validación de la limpieza de las columnas de IEC PM

Número de lote	Fecha de elaboración
FA334188 (tipo 2)	14 ene 2009
FA334264 (tipo 2)	21 ene 2009
FA334297 (tipo 2)	28 ene 2009
FA334539 (tipo 1)	06 mar 2009

Nota: el proceso de limpieza y su eficiencia no dependen del serotipo; la validación se llevó a cabo en los primeros lotes durante la campaña de elaboración.

Los criterios de aceptación y los resultados obtenidos para la validación de la limpieza de las columnas de IEC PM se presentan en la tabla 45.

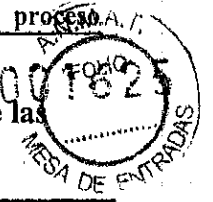


Tabla 45: Resultados de las pruebas obtenidos durante la validación de la limpieza de las columnas de IEC PM

Pruebas		Criterios de aceptación	FA334188	FA334264	FA334297*	FA334539	Estado
Ensayos de elementos	TOC	≤10 ppm	0,82	0,68	0,64	0,90	Cumple.
	TC	≤10 ppm	1,59	2,16	1,29	1,96	Cumple.
	Contenido de carga biológica	<5 UFC/10 mL	0	0	9 †	0	Cumple.
	Contenido de endotoxinas	<0,25 UI/mL	<0,25	<0,25	0,25	<0,25	Cumple.

* Prueba inválida debido al resultado fuera de especificaciones obtenido en el contenido de carga biológica.

† Nueva prueba en una muestra de archivo debido a un problema de contaminación durante la toma de muestras.





- El contenido de TOC al final del enjuague (equilibrado con tampón de fosfato) después del almacenamiento cumple con los criterios de aceptación. Los residuos de productos, ácido acético y productos de regeneración fueron, por lo tanto, eliminados por el lavado y el enjuague.
- El contenido de TC al final del enjuague (equilibrado con tampón de fosfato) después del almacenamiento cumple con los criterios de aceptación. La eliminación del ácido acético queda demostrada.
- La carga biológica y el contenido de endotoxinas al final del enjuague (equilibrado con tampón de fosfato) después del almacenamiento cumple con los criterios de aceptación salvo para el lote FA334297 en el que se observó un resultado fuera de especificaciones para el contenido de carga biológica. Según la investigación realizada, se identificó una contaminación durante la toma de muestras como la causa raíz de este resultado fuera de especificaciones. Se llevó a cabo una segunda prueba en una muestra de archivo y el resultado obtenido cumplió (0 UFC/mL). Además, el contenido de carga biológica cumple con los criterios de aceptación en el lote adicional. El nivel de contaminación biológica está, por lo tanto, controlado durante el almacenamiento.

Por consiguiente, el proceso de limpieza (presentado en la figura 14) está validado y ha demostrado ser adecuado para el uso rutinario en las columnas de IEC de pequeña capacidad (PM) rellenas con el soporte cerámico HyperD DEAE.

4.1.1.3 Conclusión

El proceso de limpieza está validado y será establecido para uso rutinario.

4.1.2 Validación del almacenamiento de las columnas cromatográficas con soporte cerámico HyperD DEAE

Después de cada paso de purificación, las columnas de IEC GM y PM rellenas con el soporte cerámico HyperD DEAE se regeneran con solución de NaCl, HCl y NaOH, sucesivamente.

Después, las columnas de IEC GM y PM se almacenan en solución de ácido acético / NaCl hasta el siguiente uso. Este almacenamiento va seguido de un paso de equilibrado con tampón de fosfato 35 mM para eliminar los residuos de ácido acético antes del uso y para ajustar el gel cerámico HyperD DEAE a las condiciones de pH y conductividad de la purificación. El ciclo de vida de las columnas de IEC (incluido el paso de almacenamiento) que se aplica de forma rutinaria se describe en la figura 15.

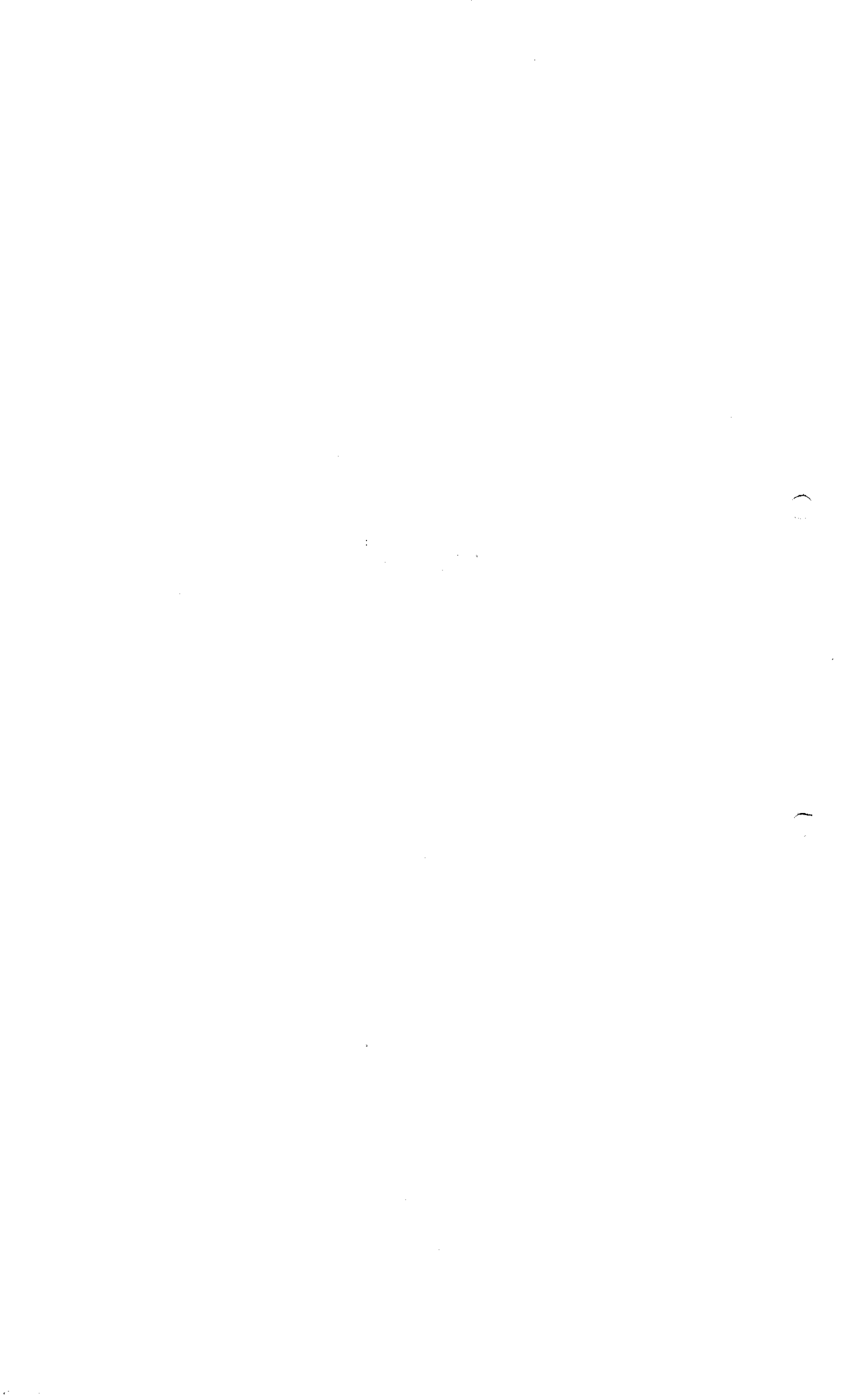
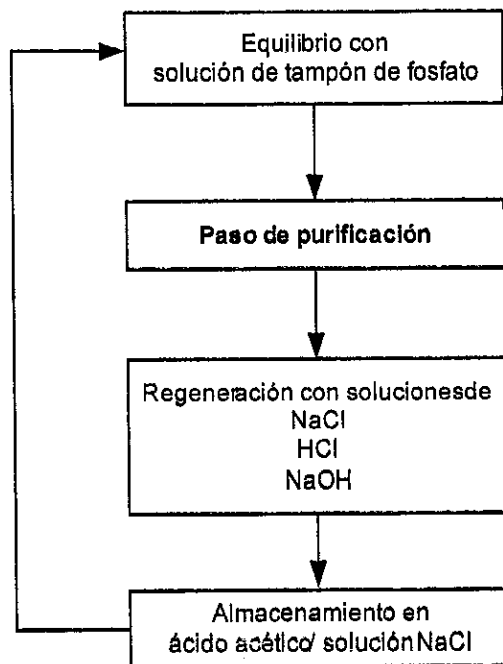




Figura 15: Ciclo de vida de las columnas de IEC GM y PM



La validación del proceso de conservación se llevó a cabo en 3 columnas de IEC GM idénticas rellenas con el nuevo soporte cerámico HyperD.

Nota: como se utiliza el mismo soporte (cerámico HyperD DEAE), el mismo tampón y la misma solución de almacenamiento durante el almacenamiento del IEC GM y PM, los resultados de validación obtenidos en la columna de IEC GM son también válidos para la columna de IEC PM.

Los parámetros sometidos a seguimiento durante la validación del almacenamiento para comprobar la ausencia de contaminación biológica fueron los siguientes:

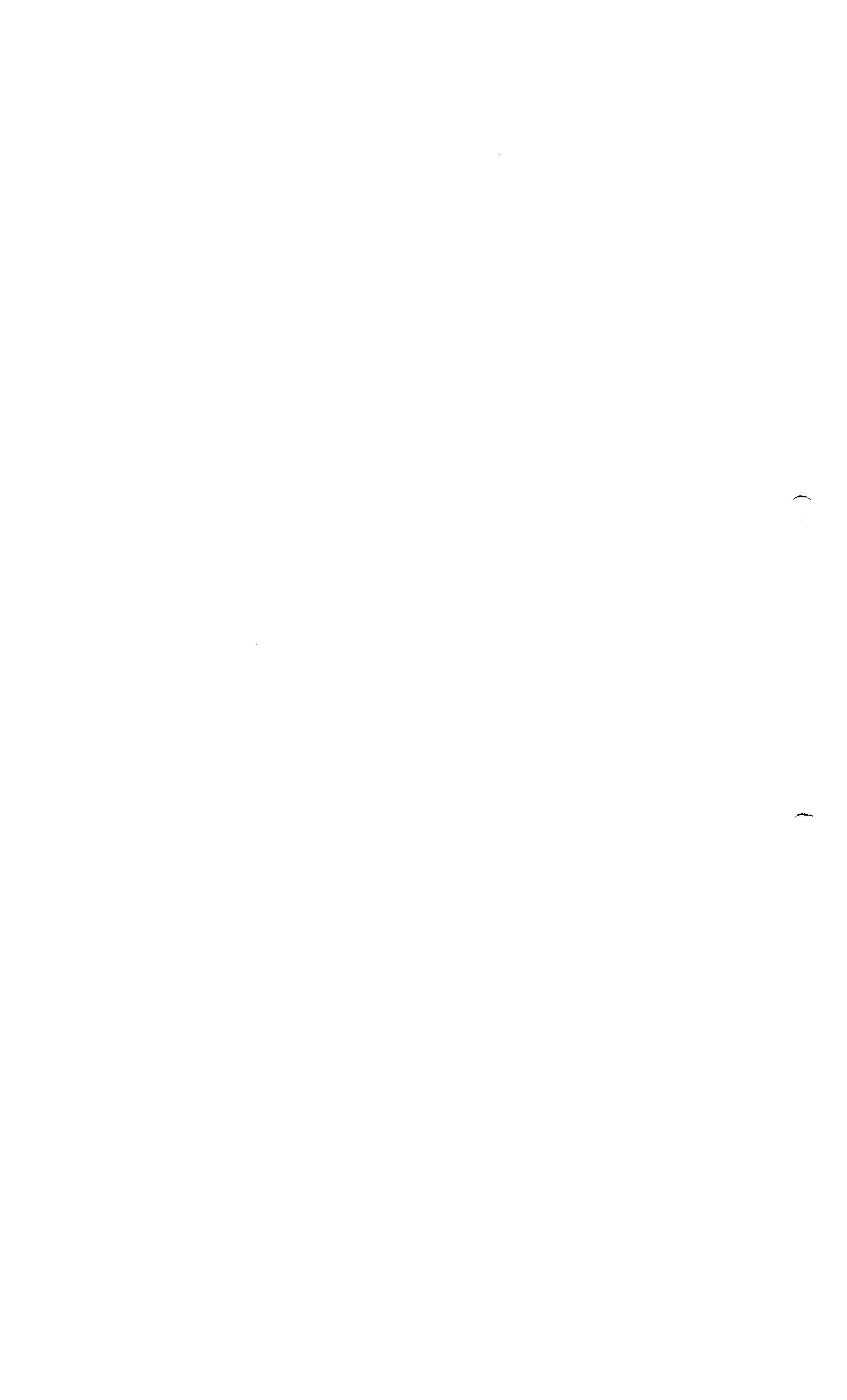
- Contenido de carga biológica. El criterio de aceptación es <5 UFC/10 mL.
- Contenido de endotoxinas. El criterio de aceptación es <0,25 UI/10 mL.

4.1.2.1 Resultados de la validación

Los números de lote del soporte de relleno utilizado para estas tres pruebas y el periodo de almacenamiento correspondiente se presentan en la tabla 46.

Tabla 46: Números de lote del soporte cerámico HyperD DEAE de relleno y período de almacenamiento

	Prueba n.º 1	Prueba n.º 2	Prueba n.º 3
Número de lote del soporte cerámico HyperD DEAE	FA346826	FA347314	FA347321





	Prueba n.º 1	Prueba n.º 2	Prueba n.º 3
Fecha de inicio del almacenamiento	14 sep 2009	17 sep 2009	24 sep 2009
Fecha del fin del almacenamiento	03 may 2010	04 may 2010	06 may 2010
Período de conservación	7 meses y 19 días.	7 meses y 17 días.	7 meses y 12 días.

Nota: se llevó a cabo una primera serie de pruebas pero fue invalidada debido a la toma de muestras (toma de muestras en fase abierta con material no estéril).

Los resultados obtenidos para la validación del almacenamiento se presentan en la tabla 47.



Tabla 47: Resultados de la validación del almacenamiento

Pruebas	Criterios de aceptación		Prueba n.º 1 Duración del almacenamiento: 7 meses y 19 días Inicio del almacenamiento: 14 sep 2009 Fin del almacenamiento: 03 may 2010	Prueba n.º 2 Duración del almacenamiento: 7 meses y 17 días Inicio del almacenamiento: 17 sep 2009 Fin del almacenamiento: 04 may 2010	Prueba n.º 3 Duración del almacenamiento: 7 meses y 12 días Inicio del almacenamiento: 24 sep 2009 Fin del almacenamiento: 06 may 2010
	Antes del almacenamiento	Después del almacenamiento			
Contenido de carga biológica	Análisis	Análisis	0	0	0
	Antes del almacenamiento	Después del almacenamiento	<5 UFC/10 mL	<5 UFC/10 mL	<5 UFC/10 mL
Contenido de endotoxinas	Análisis	Análisis	<0,25 UI/mL	<0,25 UI/mL	<0,25 UI/mL
	Antes del almacenamiento	Después del almacenamiento	<0,25 UI/mL	<0,25 UI/mL	<0,25 UI/mL

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
REGISTRADO
SANOFI PASTEUR S.A.







Todos los resultados del contenido de carga biológica y de endotoxinas cumplen con los criterios de aceptación. El nivel de contaminación biológica está, por lo tanto, controlado durante el almacenamiento.

4.1.2.2 Conclusión

Todos los resultados presentados permiten concluir que el nivel de contaminación biológica está controlado cuando las columnas de IEC se almacenan en solución de ácido acético / NaCl.

Por lo tanto, el almacenamiento en solución de ácido acético / NaCl está validado para un período máximo de 7 meses y 12 días y ha demostrado ser aceptable para el uso rutinario en las columnas de IEC, GM y PM, rellenas con el soporte cerámico HyperD DEAE.

4.1.3 Estudio de la vida útil del soporte cerámico HyperD DEAE

4.1.3.1 Objeto del estudio

El objeto del presente estudio es determinar mediante una validación concurrente realizada a escala industrial el número máximo de ciclos del soporte cerámico HyperD DEAE para cromatografía que se pueden utilizar durante las etapas de purificación de IEC de gran capacidad (GM) y de pequeña capacidad (PM) sin afectar a la calidad del producto.

4.1.3.2 Principio del estudio

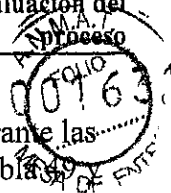
La validación de la vida útil del soporte cromatográfico cerámico HyperD DEAE se lanza a escala industrial en:

- Dos pruebas (2 columnas) para la columna de IEC de gran capacidad (GM) cuando se evaluó una vida útil de 30 ciclos de purificación durante los estudios de viabilidad (vea la sección 3.2.S.2.6 Desarrollo del proceso de elaboración). La vida útil validada del soporte cromatográfico cerámico HyperD DEAE para la columna de IEC GM será el número mínimo de ciclos obtenidos durante ambas pruebas realizadas en el estudio de escala industrial.
- Dos pruebas (2 columnas) para la columna de IEC de pequeña capacidad (PM). La validación de la vida útil del soporte cromatográfico HyperD cerámico DEAE para la columna de IEC PM será el número mínimo de ciclos obtenidos durante ambas pruebas realizadas a escala industrial.

La validación de la vida útil del soporte cerámico HyperD DEAE para cromatografía está controlada por:

- Parámetros de rendimiento de las condiciones de desinfección:
 - Contenido de carga biológica.
 - Contenido de endotoxinas.





- Parámetros de rendimiento del proceso: parámetros de producción controlados durante las etapas de cromatografía con soporte cerámico HyperD DEAE GM y PM (vea la tabla 49 y la tabla 50).
- Parámetros de caracterización del producto:
 - Contenido de antígeno D (recuperación de antígeno D del paso).
 - Contenido de proteínas (tasa de eliminación de las proteínas).
 - Contenido de ADN residual.
 - Contenido de BSA.

La validación está en curso para la columna de IEC de gran capacidad (GM) y para la columna de IEC de pequeña capacidad (PM).

4.1.3.3 Protocolo

Para cada ciclo de purificación, el producto que se va a purificar se inyecta tras el equilibrado de la columna y después se eluye. Al final de la purificación, el soporte cerámico HyperD DEAE se regenera con solución de NaCl, HCl y NaOH y se almacena en solución de ácido acético / NaCl hasta el siguiente uso. Se evalúan diferentes parámetros (vea los capítulos siguientes) para controlar la evolución de la vida útil del soporte cerámico HyperD DEAE.

Rendimiento de las condiciones de desinfección

Las pruebas adicionales y los criterios de aceptación controlados durante el paso de equilibrado del ciclo de purificación para caracterizar la evolución del rendimiento de limpieza a lo largo del tiempo se presentan en la tabla 48.

Tabla 48: Especificaciones para el rendimiento de las condiciones de higienización

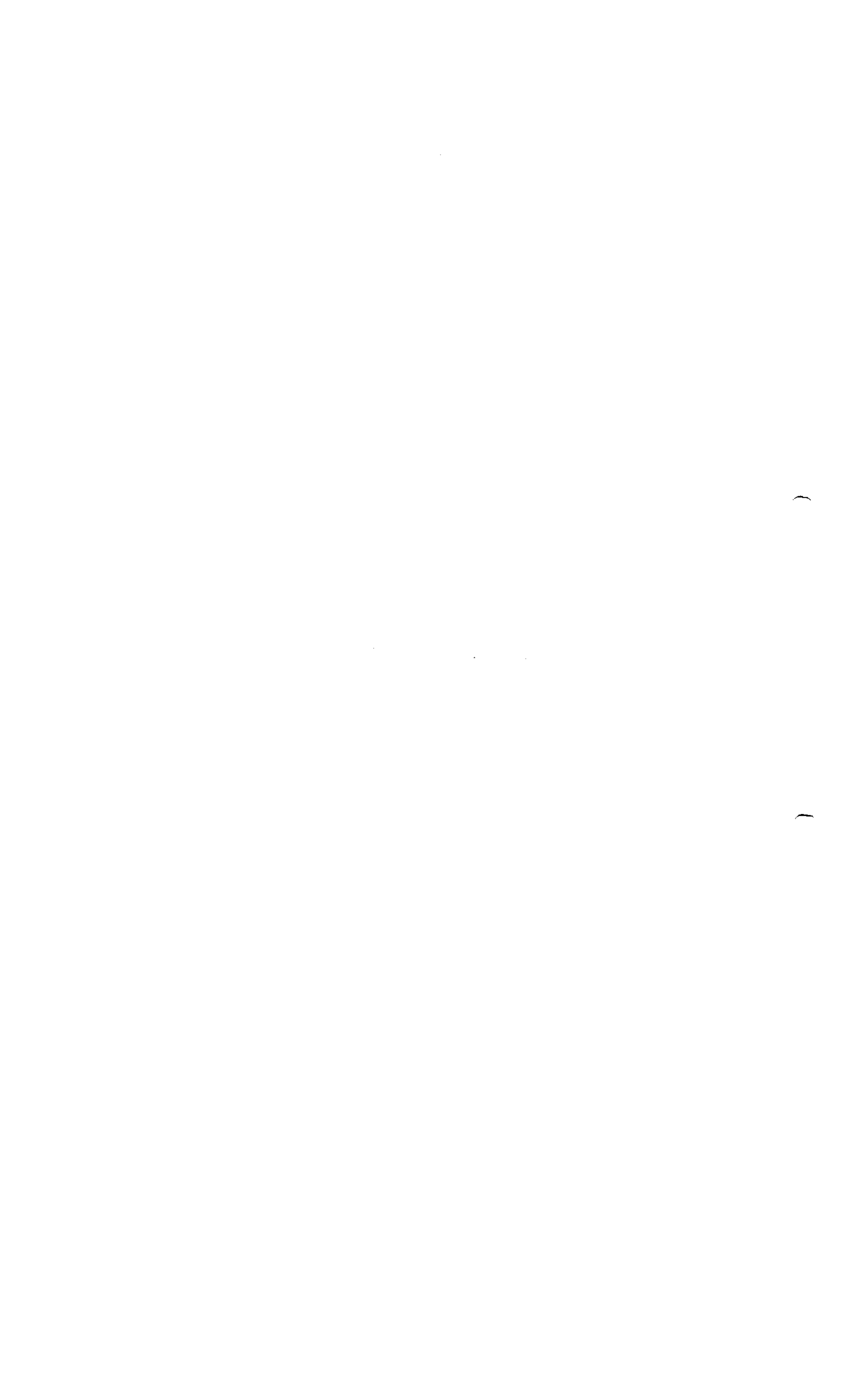
Pruebas	Etapas de purificación	Criterios de aceptación
Contenido de carga biológica	Equilibrado de la columna GM/PM.	<5 UFC/10 mL.
Contenido de endotoxinas	Equilibrado de la columna GM/PM.	<0,25 UI/mL

Rendimiento del proceso de purificación

Para caracterizar la evolución del rendimiento del proceso de purificación a lo largo del tiempo se controlan parámetros de producción durante la cromatografía IEC GM y PM en cada ciclo de purificación. Los parámetros de producción y los criterios de aceptación controlados durante las cromatografías IEC se presentan en la tabla 49 para la cromatografía GM y en la tabla 50 para la cromatografía PM, respectivamente.

Tabla 49: Parámetros de producción controlados durante la cromatografía con soporte cerámico HyperD DEAE GM

Etapas / parámetros		Valores objetivo*
Columna	Volumen de gel	45,2 L
Equilibrado de la columna	Volumen de tampón de fosfato	900 L



Proceso-7



Etapa / parámetros		Valores objetivo
	Medición del pH	7,0
	Conductividad	3,0 mS/cm
Purificación	Caudal de elución de la suspensión purificada GM	80 L/h
Regeneración de la columna	Volumen de NaCl	130 L
	Volumen de HCl	90 L
	Volumen de NaOH	130 L
Almacenamiento de la columna	Volumen de ácido acético / NaCl	150 L

* Los valores objetivo y los intervalos asociados se definirán de forma concurrente después de la elaboración de 30 lotes.

Tabla 50: Parámetros de producción controlados durante la cromatografía con soporte cerámico HyperD DEAE PM

Etapa / parámetros		Valores objetivo*
Columna	Volumen de gel	5 L
Equilibrado de la columna	Volumen de tampón de fosfato	100 L
	Medición del pH	7,0
	Conductividad	3,0 mS/cm
Purificación	Caudal de elución de la suspensión purificada PM	37,5 L/h
Regeneración de la columna	Volumen de NaCl	15 L
	Volumen de HCl	10 L
	Volumen de NaOH	16 L
Conservación de la columna	Volumen de ácido acético / NaCl	19 L

* Los valores objetivo y los intervalos asociados se definirán de forma concurrente después de la elaboración de 30 lotes.

Caracterización de la suspensión viral purificada y concentrada

La evolución de las características del producto purificado se somete a seguimiento a lo largo del tiempo para comprobar que la vida útil del soporte no tiene impacto alguno sobre la calidad de la suspensión viral purificada y concentrada.

Los parámetros seguidos para la caracterización de la suspensión viral purificada y concentrada son los siguientes:

- Contenido de antígeno D.
- Contenido de proteínas.
- Contenido de ADN residual.
- Contenido de BSA.

El contenido de antígeno D y el contenido de proteínas se determinan de forma rutinaria en cada suspensión viral purificada y concentrada como prueba de liberación.

El contenido de ADN y el contenido de BSA son pruebas de caracterización adicionales que se realizan cada 5 ciclos de purificación para la columna de IEC GM. Para la columna de IEC PM, la frecuencia de las pruebas es cada 20 ciclos de purificación hasta el ciclo n.º 100 y después cada 5 ciclos.

Hasta la fecha, no existen datos históricos disponibles para establecer criterios de aceptación para estos parámetros ya que se trata de un soporte reciente. Se observarán las tendencias a medida que evolucione la validación y después se llevará a cabo un análisis estadístico para establecer criterios de aceptación para estos parámetros.

4.1.3.4 Análisis de los resultados

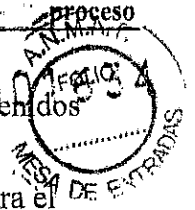
El uso del soporte se interrumpirá tan pronto como uno de los parámetros sometidos a seguimiento deje de cumplir los criterios de aceptación y si la causa del incumplimiento resulta ser la vida útil del soporte. En el caso de que se observe alguna desviación durante la validación concurrente, se iniciará una nueva validación.

El estudio de validación de la vida útil está basado en los resultados obtenidos a escala reducida en la columna de IEC GM (vea la sección 3.2.S.2.6 Desarrollo del proceso de elaboración). Se determinó un objetivo estimado de 30 ciclos de purificación para la columna de IEC GM y se extrapoló a 120 ciclos de purificación para la columna de IEC PM.

La estrategia de validación para el estudio de la vida útil es confirmar a escala industrial la vida útil estimada de ambas columnas de IEC realizando dos pruebas independientes (utilizando dos columnas cromatográficas). El número de ciclos de purificación se validará con el valor mínimo obtenido para las dos pruebas. Los datos obtenidos durante la validación de la vida útil definirán el número de ciclos industriales aplicado sistemáticamente para la columna de IEC GM y PM.

Hasta la fecha, los resultados obtenidos para la primera prueba de la columna de IEC GM respaldan 42 ciclos de purificación a escala industrial. Para la segunda prueba, la validación está en curso. Basándose en estos resultados, la vida útil de la columna de IEC GM se establece en un





máximo de 42 ciclos de purificación y se puede reducir en función de los resultados obtenidos para la segunda prueba.

Para la columna de IEC PM, se han completado 60 ciclos de purificación y la prueba para el estudio de la vida útil de PM sigue en curso. Por lo tanto, sanofi pasteur propone ampliar gradualmente la vida útil de IEC PM basándose en los datos procedentes del estudio de vida útil en curso. No obstante, la vida útil de la columna de IEC PM se establecerá en un máximo de 120 ciclos de purificación y se puede reducir en función de los resultados obtenidos como parte del estudio en curso.

4.2 Estudios de validación de la columna cromatográfica Sepharose CL6B

4.2.1 Validación de la limpieza de la columna cromatográfica Sepharose CL6B

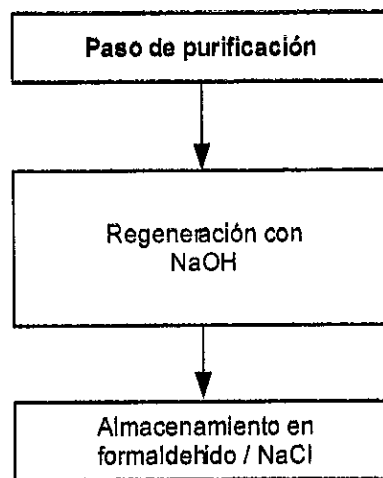
El objeto de este estudio de validación es mostrar la eficiencia, la reproducibilidad y el control del proceso de limpieza de la columna Sepharose CL6B.

4.2.1.1 Principio de validación de la limpieza

El proceso de limpieza utilizado para la columna Sepharose CL6B se describe en la figura 16.

Después de cada paso de purificación, la columna Sepharose CL6B se regenera con solución de NaOH, con objeto de eliminar las impurezas fijadas al soporte Sepharose CL6B durante la purificación. Después, la columna Sepharose CL6B se conserva en solución de formaldehído / NaCl hasta el siguiente uso. Esta conservación va seguida siempre de un paso de equilibrado para eliminar posibles residuos antes del uso y para ajustar la columna Sepharose CL6B con tampón de fosfato a las condiciones de pH y conductividad de la purificación.

Figura 16: Diagrama de flujo del proceso de limpieza para la columna Sepharose



La validación del proceso de limpieza se llevó a cabo en dos columnas. En cada columna se llevaron a cabo 3 pruebas después de un ciclo completo de purificación. Antes de cada ciclo de





purificación se lleva a cabo un paso de equilibrado con tampón de fosfato para eliminar posibles residuos.

Los parámetros que se siguieron para la validación de la limpieza fueron:

- Contenido de carbono total (TC) después del paso de almacenamiento para comprobar la eliminación de la solución de limpieza utilizada para el almacenamiento. El criterio de aceptación es ≤ 10 ppm.
- Carga biológica y contenido de endotoxinas después del paso de equilibrado para comprobar la ausencia de cualquier contaminación biológica. El criterio de aceptación es < 5 UFC/10 mL para la carga biológica y $< 0,5$ UI/mL para las endotoxinas.
- Contenido de formaldehído. El criterio de aceptación es < 5 $\mu\text{g/mL}$.
- El contenido de antígeno D, el contenido de poliovirus y el contenido de proteínas se obtienen para información.

4.2.1.2 Resultados de la validación

Se llevaron a cabo seis pruebas para la validación de la limpieza de la columna Sepharose rellena con soporte cromatográfico Sepharose CL6B. Los lotes utilizados para la validación de la columna Sepharose se presentan en la tabla 51.





Tabla 51: Lotes incluidos en la validación de la limpieza de la columna Sepharose

Columna	Número de lote	Fecha de elaboración
Columna 1	FA127843 (tipo 1)	29 oct 2002
	FA128716 (tipo 1)	05 nov 2002
	FA219007 (tipo 3)	12 nov 2002
Columna 2	FA127251 (tipo 1)	11 nov 2002
	FA129794 (tipo 3)	18 nov 2002
	FA130767 (tipo 3)	25 nov 2002

Nota: el proceso de limpieza y su eficiencia no dependen del serotipo; la validación se llevó a cabo en los tres primeros lotes para cada columna.

Los criterios de aceptación y los resultados obtenidos para la validación de la limpieza de la columna Sepharose a se presentan en la tabla 52.

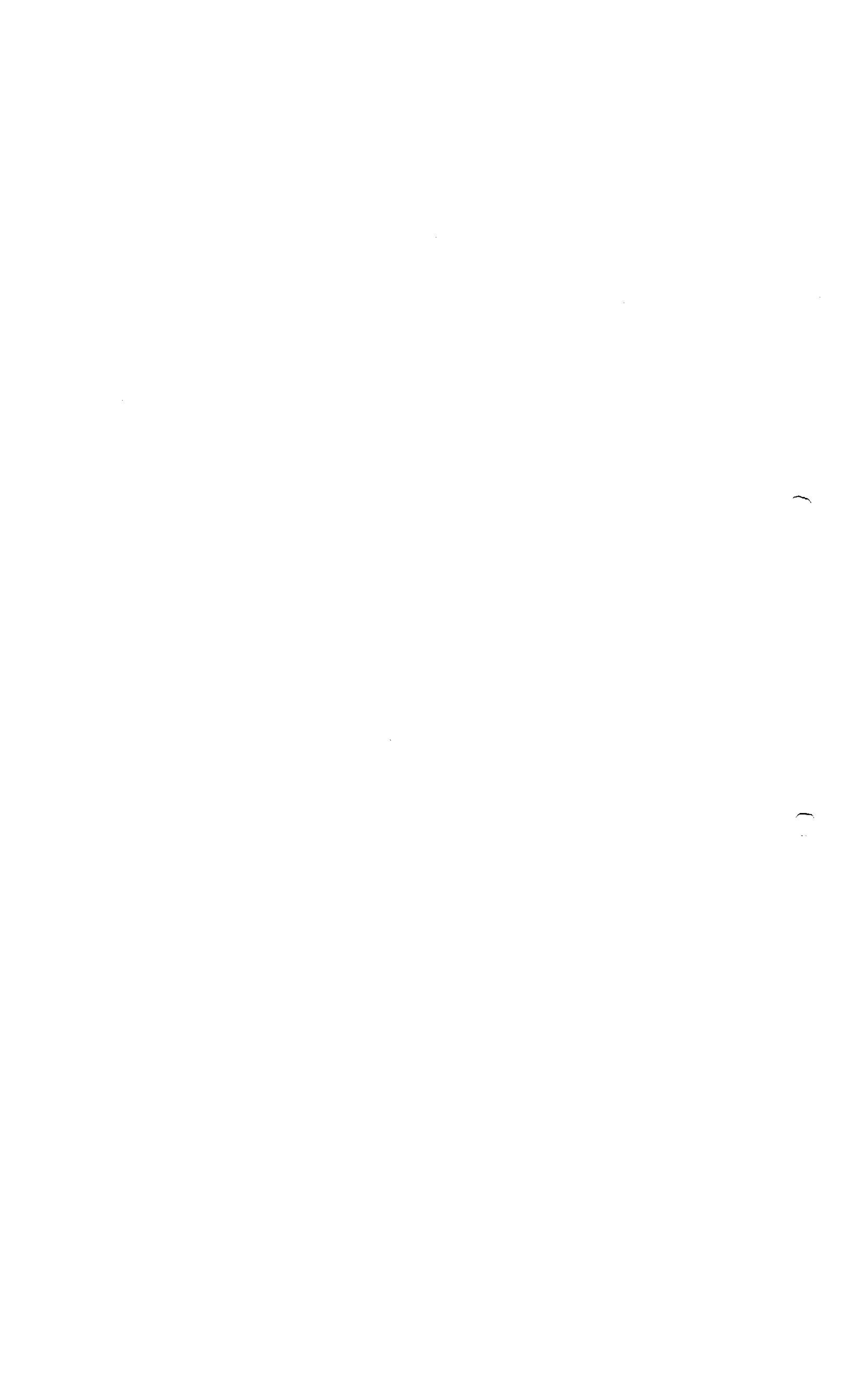


Tabla 52: Resultados de las pruebas obtenidos durante la validación de la limpieza de la columna Sepharose

Pruebas		FA127843	FA128716	FA219007	FA127251	FA129794	FA130767	Estado
Ensayos de elementos marcadores	TC	3,48	3,24	3,48	3,58	3,52	3,68	Cumple.
	Contenido de carga biológica	0	0	0	0	0	0	Cumple.
	Contenido de endotoxinas	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	Cumple.
	Contenido de formaldehído	1,82	1,78	1,87	1,89	1,85	1,85	Cumple.
Pruebas adicionales	Concentración de poliovirus	$\leq 10^{1,5}$	$\leq 10^{1,5}$	$\leq 10^{1,5}$	$\leq 10^{1,5}$	$\leq 10^{1,5}$	$\leq 10^{1,5}$	Cumple.
	Contenido de antígeno D	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	Cumple.
	Contenido de proteínas	<14,4	<14,4	<14,4	<14,4	<14,4	<14,4	Cumple.
	Criterios de aceptación							
	≤ 10 ppm							
	≤ 5 UFC/10 mL							
	$< 0,5$ UI/mL							
	≤ 5 µg/mL							
	Para información (DICC/mL)							
	Para información (UD/mL)							
	Indicios (µg/mL)							


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.

RA_0302316







Todos los resultados cumplen con los criterios de aceptación.

- El contenido de TC al final del enjuague (equilibrado con tampón de fosfato) después del almacenamiento cumple con los criterios de aceptación. La eliminación de los productos de limpieza y regeneración queda demostrada.
- La carga biológica y el contenido de endotoxinas al final del enjuague (equilibrado con tampón de fosfato) después del almacenamiento cumple con los criterios de aceptación. El nivel de contaminación biológica está controlado durante el almacenamiento.
- El contenido de formaldehído al final del enjuague (equilibrado con tampón de fosfato) después del almacenamiento cumple con los criterios de aceptación.
- El contenido de antígeno D, la concentración de poliovirus y el contenido de proteínas son inferiores al umbral de cuantificación de los métodos analíticos.

Por consiguiente, el proceso de limpieza (presentado en la figura 16) está validado y ha demostrado ser adecuado para uso sistemático para las columnas Sepharose rellenas con soporte cromatográfico Sepharose CL6B.

4.2.1.3 Conclusión

El proceso de limpieza está validado y establecido para uso sistemático.

4.2.2 Validación del almacenamiento de la columna cromatográfica Sepharose CL6B

Después de cada paso de purificación, las columnas Sepharose rellenas con soporte CL6B se regeneran con solución de NaOH.

Después, la columna Sepharose CL6B se almacena en solución de formaldehído-NaCl hasta el siguiente uso. El almacenamiento va seguido de un paso de equilibrado con tampón de fosfato 25 mM para eliminar los posibles residuos antes del uso y para equilibrar la columna Sepharose antes de la purificación. El ciclo de vida de las columnas (incluido el paso de almacenamiento) aplicado de forma rutinaria se describe en la figura 17.

Nota: en el momento del estudio de validación del almacenamiento de la columna Sepharose, la concentración del tampón de fosfato utilizado en la producción sistemática estaba establecida en 25 mM.

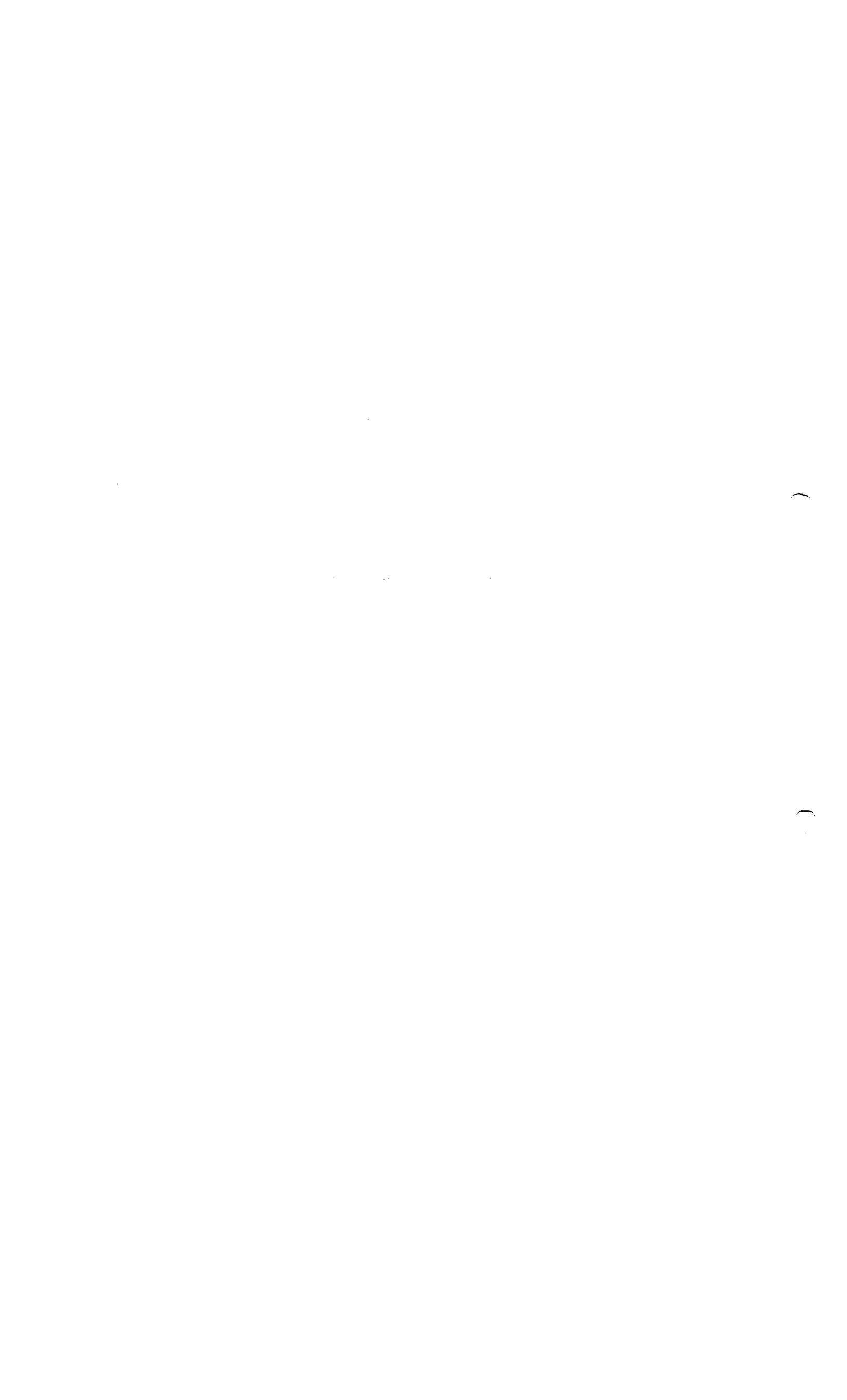
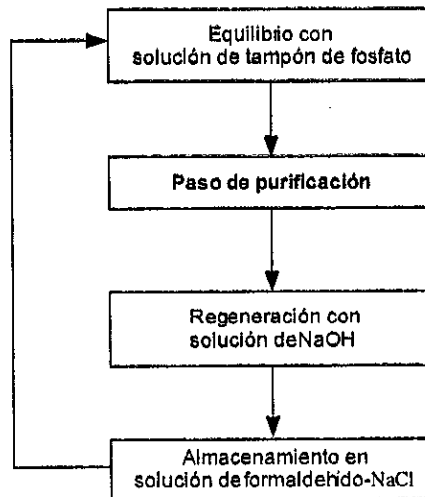




Figura 17: Ciclo de vida de la columna Sepharosecl6b



La validación del proceso de conservación se llevó a cabo en 3 columnas Sepharose rellenas con soporte cromatográfico Sepharose CL6B.

Los parámetros sometidos a seguimiento durante la validación del almacenamiento para comprobar la ausencia de contaminación biológica fueron los siguientes:

- Contenido de carga biológica. El criterio de aceptación es <5 UFC/10 mL.
- Contenido de endotoxinas. El criterio de aceptación es <0,5 UI/10 mL.

4.2.2.1 Resultados de la validación

Los números de lote del soporte de relleno utilizado para estas tres pruebas y el correspondiente período de almacenamiento se presentan en la tabla 53.

Tabla 53: Números de lote de la columna cromatográfica rellena con Sepharose CL6B y período de almacenamiento

	Prueba n.º 1	Prueba n.º 2	Prueba n.º 3
Número de equipo de la columna cromatográfica Sepharose CL6B	18894	18895	18895
Fecha de inicio del almacenamiento	13 jun 2003	27 jun 2003	04 dic 2003
Fecha del fin del almacenamiento	22 ago 2003	29 ago 2003	06 ene 2004
Período de almacenamiento	70 días.	64 días.	32 días.

Los resultados obtenidos para la validación del almacenamiento se presentan en la tabla 54.

Tabla 54: Resultados de la validación del almacenamiento

Pruebas		Criterios de aceptación	Prueba n.º 1 Duración del almacenamiento: 70 días. Inicio del almacenamiento: 13 jun 2003 Fin del almacenamiento: 22 ago 2003	Prueba n.º 2 Duración del almacenamiento: 64 días. Inicio del almacenamiento: 27 jun 2003 Fin del almacenamiento: 29 ago 2003	Prueba n.º 3 Duración del almacenamiento: 32 días. Inicio del almacenamiento: 04 dic 2003 Fin del almacenamiento: 06 ene 2004
Contenido de carga biológica.	Antes del almacenamiento				
Contenido de carga biológica.	Antes del almacenamiento	<5 UFC/10 mL	0	0	0
	Después del almacenamiento		0	0	0
Contenido de endotoxinas	Antes del almacenamiento	<0,5 UI/mL.	<0,5 UI/mL.	<0,5 UI/mL.	<0,5 UI/mL.
	Después del almacenamiento		<0,5 UI/mL.	<0,5 UI/mL.	<0,5 UI/mL.

JOXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DUBOIS
GERENTE
SANOFI PASTEUR S.A.



