



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

4.2.2.2 Conclusión

Todos los resultados presentados permiten concluir que el nivel de contaminación biológica está controlado cuando las columnas Sepharose se almacenan en solución de formaldehído-NaCl.

Por lo tanto, el almacenamiento en solución de formaldehído-NaCl está validado para un período máximo de 1 mes, que ha demostrado ser aceptable para el uso rutinario de las columnas Sepharose rellenas con soporte Sepharose CL6B.

4.2.3 Estudio de la vida útil del soporte Sepharose CL6B

4.2.3.1 Objeto del estudio

El objeto del presente estudio era determinar, durante una validación retrospectiva realizada a escala industrial, el número máximo de ciclos del soporte Sepharose CL6B que se pueden utilizar durante la etapa de purificación sin afectar la calidad del producto.

4.2.3.2 Principio del estudio

La validación de la vida útil del soporte cromatográfico Sepharose CL6B se lanzó a escala industrial en los lotes del concentrado 2.

La validación de la vida útil del soporte cromatográfico Sepharose CL6B se controló mediante los siguientes parámetros:

- Contenido de antígeno D (recuperación de antígeno D del paso).
- Contenido de proteínas (tasa de eliminación de las proteínas).
- Perfil de elución cromatográfica.

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.

4.2.3.3 Resultados

Recuperación de antígeno D

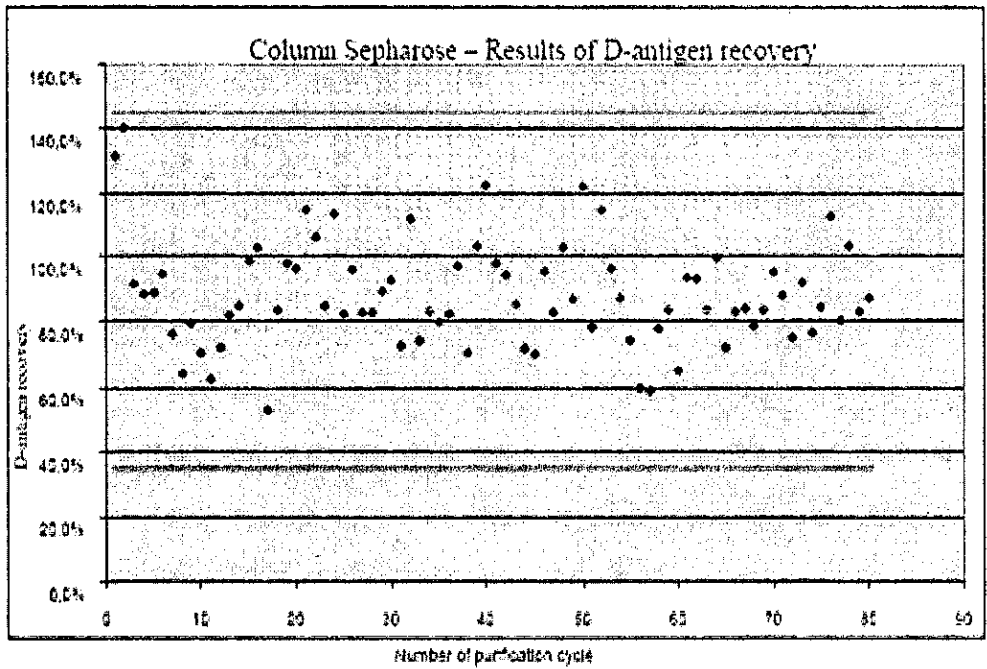
La prueba de recuperación de antígeno D se lleva a cabo en lotes del concentrado 2 y de suspensión purificada Sepharose para calcular la recuperación de antígeno D.

Los resultados obtenidos de la recuperación de antígeno D se presentan en la figura 18. Los límites de acción definidos para la recuperación de antígeno D en la etapa de cromatografía Sepharose CL6B van del 35 % al 145 %.





Figura 18: Resultados de la recuperación de antígeno D



Todos los resultados cumplen con los límites de acción definidos hasta el ciclo de purificación n.º 80.

Contenido de proteínas

Los resultados obtenidos para el contenido de proteínas en lotes de suspensión purificada Sepharose se presentan en la figura 19.

Los límites de acción definidos para el contenido de proteínas en la etapa de cromatografía Sepharose CL6B van de 22 a 385 µg/mL.

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A

CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A



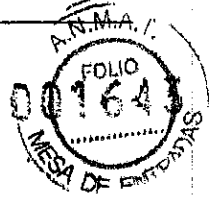
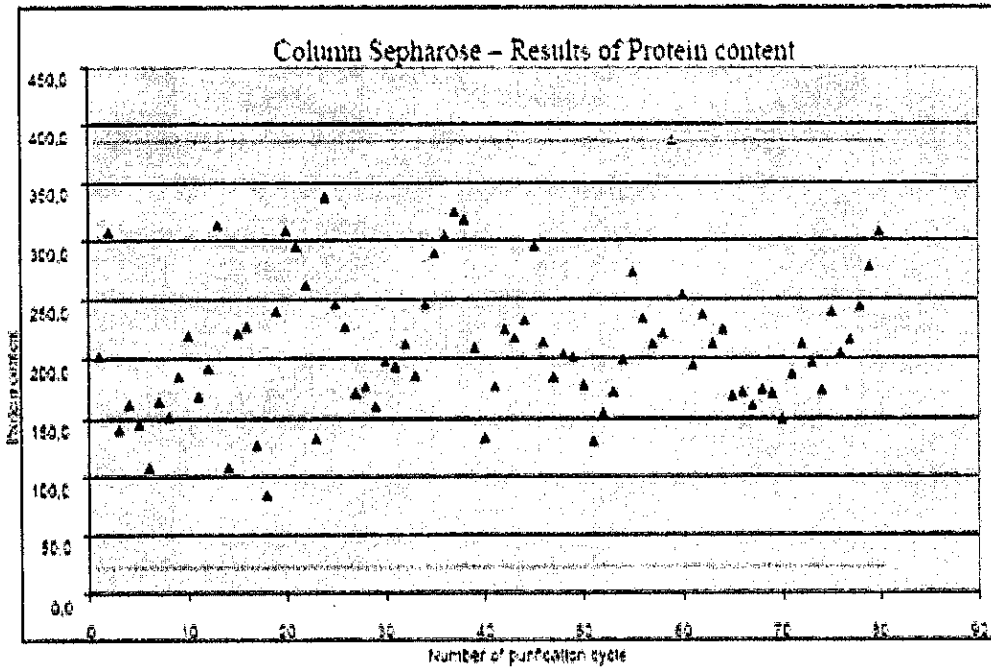


Figura 19: Resultados del contenido de proteínas



Todos los resultados cumplen con los límites de acción definidos hasta el ciclo de purificación n.º 80.

Perfil cromatográfico

El perfil cromatográfico observado normalmente en esta etapa de la purificación cromatográfica se presenta en la figure 20 (ciclo n.º 1) y en la figura 21 (ciclo n.º 80). El perfil cromatográfico está compuesto por tres fracciones denominadas V0, virus y fracción de coleo. El pico de la fracción de virus es la fracción que se recoge para continuar con la siguiente etapa de purificación.



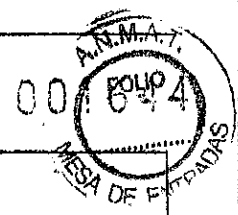


Figure 20: Ejemplo de perfil cromatográfico (ciclo n.º 1)

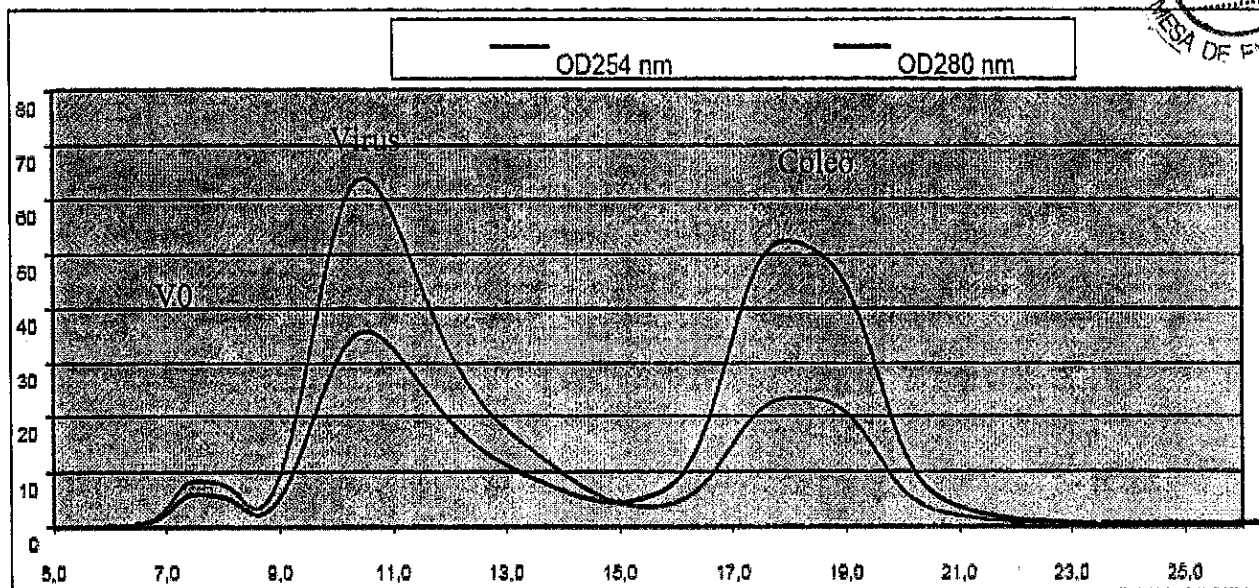
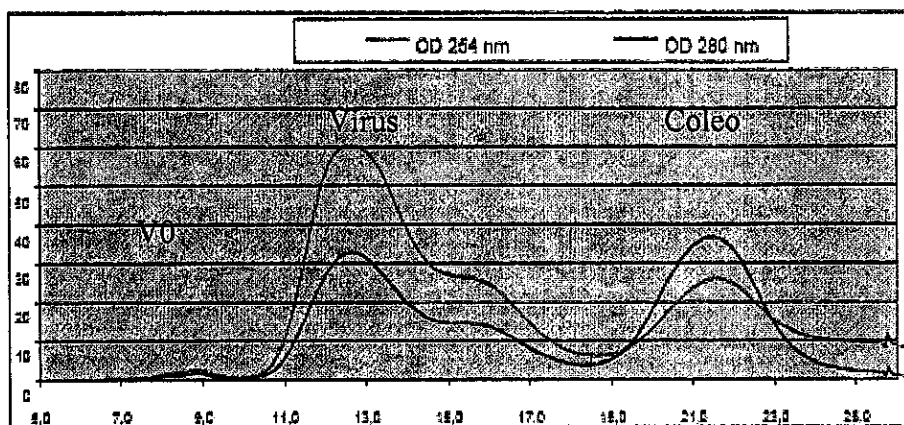


Figura 21: Ejemplo de perfil cromatográfico (ciclo n.º 80)

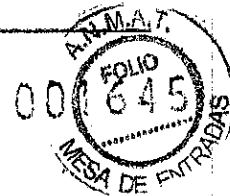


Ambos perfiles cromatográficos cumplen.
Hasta el ciclo de purificación n.º 80, el gel permite separar el producto que se va a purificar, y no hay tendencias en el rendimiento del gel en función del número de ciclos.

4.2.3.4 Conclusión

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, no existen tendencias de los resultados de recuperación de antígeno D ni de contenido de proteínas obtenidos tras los 80 ciclos de purificación. Los perfiles cromatográficos demuestran la capacidad del gel para separar el producto en una columna cromatográfica Sepharose CL6B en el ciclo de purificación n.º 80. Basándose en estos resultados, se valida la vida útil de la columna cromatográfica Sepharose CL6B con un máximo de 80 ciclos de purificación.





5 Conclusión final

La validación del proceso de elaboración del granel de vacuna antipoliomielítica trivalente inactivada en células Vero ha quedado demostrada mediante:

- Una validación completa del proceso de elaboración del monovalente de los tipos 1, 2 y 3 desde el cultivo de células Vero hasta la inactivación de la suspensión viral purificada y concentrada.
- Una validación adicional de la purificación de la cosecha cruda tras el cambio del soporte cromatográfico de intercambio iónico.
- La validación de la agitación y mezcla de los monovalentes del serotipo 1, 2 y 3 para obtener el trivalente concentrado.

Los datos de los parámetros de producción controlados durante la producción del granel de trivalente concentrado (IPV) cumplen con los criterios de aceptación definidos anteriormente.

Todos los resultados de controles durante el proceso registrados durante la producción del principio activo cumplen con los criterios de aceptación.

Todos los resultados obtenidos para las pruebas de caracterización adicionales corresponden a los resultados previstos.

Todos los resultados de control de calidad de productos intermedios (células de control, sobrenadantes de las células de control, cosecha única, suspensión viral purificada y concentrada y monovalente de los tipos 1, 2 y 3) y del principio activo, es decir, el granel de trivalente concentrado, cumplen con las especificaciones de liberación descritas en las secciones 3.2.S.2.4 Control de los pasos críticos e intermedios y 3.2.S.4.1 Especificaciones.

En conclusión, cada etapa del proceso de elaboración del monovalente de los tipos 1, 2 y 3 y del trivalente concentrado está validada y bajo control.



3.2.S.2.5

Validación y/o Evaluación del Proceso - PRP-T


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANGRE PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANGRE PASTEUR S.A.





Sección 3.2.S.2.5 - Validación y/o evaluación del proceso

Índice

Lista de tablas	3
Lista de figuras	5
1 Introducción	6
2 Validación de la producción del polisacárido de <i>Haemophilus</i> tipo b (PRP)	7
2.1 Fermentación del polisacárido de <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b y pasos de la cosecha hasta el producto intermedio pellets de cetrimida	7
2.1.1 Introducción.....	7
2.1.2 Parámetros de producción	7
2.1.3 Controles durante el proceso realizados en el marco de la validación.	7
2.1.4 Pruebas de control de calidad	7
2.1.5 Pasos críticos	7
2.1.6 Discusión y conclusiones	10
2.2 Paso de purificación del polisacárido de <i>Haemophilus</i> tipo b (PRP)	11
2.2.1 Introducción.....	11
2.2.2 Parámetros de producción	11
2.2.3 Controles durante el proceso	11
2.2.4 Pruebas de control de calidad	11
2.2.5 Pasos críticos	11
2.2.6 Validación del reprocesamiento	15
2.2.6.1 Introducción	15
2.2.6.2 Resultados	15
2.2.7 Discusión y conclusiones	19
3 Validación de la producción del polisacárido AH activado de <i>Haemophilus</i> tipo b (PRP-AH)	20
3.1 Introducción	20
3.2 Parámetros de producción.....	20
3.3 Controles durante el proceso.....	20
3.4 Pruebas de control de calidad	20
3.5 Pasos críticos.....	20





3.6	Discusión y conclusiones.....	25
4	Validación de la producción de la proteína tetánica concentrada (CTP)	25
4.1	Validación de la producción de proteína tetánica purificada (PTP)	25
4.1.1	Introducción.....	25
4.1.2	Resultados de validación	26
4.1.2.1	Parámetros de producción	26
4.1.2.2	Controles durante el proceso	27
4.1.2.3	Pruebas de control de calidad.....	27
4.1.2.4	Pasos críticos.....	27
4.1.2.5	Discusión y conclusiones	34
4.1.3	Conclusión sobre la elaboración de la PTP	34
4.2	Validación del paso de concentración de la proteína tetánica purificada para obtener la proteína tetánica concentrada (CTP).....	35
4.2.1	Introducción.....	35
4.2.2	Parámetros de producción	35
4.2.3	Controles durante el proceso	36
4.2.4	Pasos críticos	36
4.2.5	Pruebas de control de calidad	36
5	Validación de la producción del granel de polisacárido de <i>Haemophilus</i> concentrado conjugado (PRP-T).....	38
5.1	Introducción	38
5.2	Parámetros de producción.....	38
5.3	Controles durante el proceso.....	38
5.4	Pasos críticos.....	40
5.5	Pruebas de control de calidad	44
6	Conclusión final.....	45



Lista de tablas

Tabla 1: Parámetros de producción estudiados durante el programa de validación de la fermentación del <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b y la cosecha del polisacárido	8
Tabla 2: Controles durante el proceso realizados durante el programa de validación de la fermentación del <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b y la cosecha del polisacárido	8
Tabla 3: Resultados de los controles de calidad del polisacárido de <i>Haemophilus</i> tipo b	9
Tabla 4: Parámetros de producción registrados durante el programa de validación de la purificación del polisacárido de <i>Haemophilus</i> tipo b (PRP)	12
Tabla 5: Control durante el proceso realizado en el marco de la validación sobre el polisacárido de <i>Haemophilus</i> tipo b (PRP) para validar el proceso de purificación	12
Tabla 6: Resultados de los controles de calidad del polisacárido de <i>Haemophilus</i> tipo b (PRP) ...	13
Tabla 7: Datos de los parámetros de producción registrados durante el paso crítico 1.8a = extracción con fenol	14
Tabla 8: Lotes de validación del reprocesamiento: contenido de endotoxinas	15
Tabla 9: Lotes de validación del reprocesamiento: contenido de pirógenos	15
Tabla 10: Resultados de control de calidad para los lotes de PRP reprocesados FA097766, FA097767 y FA097768	17
Tabla 11: Resultados de control de calidad para los lotes de PRP reprocesados FA2812197, FA281299 y FA281302	18
Tabla 12: Parámetros de producción registrados durante la activación del polisacárido-AH de <i>Haemophilus</i>	21
Tabla 13: Resultados de los controles de calidad del polisacárido-AH de <i>Haemophilus</i> activado.	22
Tabla 14: Datos de parámetros de producción durante el paso crítico 1.11b = activación del PRP para obtener PRP-AH	23
Tabla 15: Parámetros de producción registrados durante la validación de la fermentación de <i>Clostridium tetani</i>	28
Tabla 16: Parámetros de producción registrados durante la validación de la cosecha y detoxificación de la toxina tetánica	29
Tabla 17: Control durante el proceso realizado durante la validación de la fermentación de <i>Clostridium tetani</i>	30
Tabla 18: Control durante el proceso realizado sobre la proteína tetánica purificada para validar la purificación y la detoxificación	31
Tabla 19: Resultados de control de calidad para la proteína tetánica purificada	32





Tabla 20: Datos de los parámetros de producción registrados durante el paso crítico 2.10a = tratamiento con formaldehído.....36

Tabla 21: Parámetros de producción registrados durante la concentración de la proteína tetánica 36

Tabla 22: Resultados de control de calidad para la proteína tetánica concentrada36

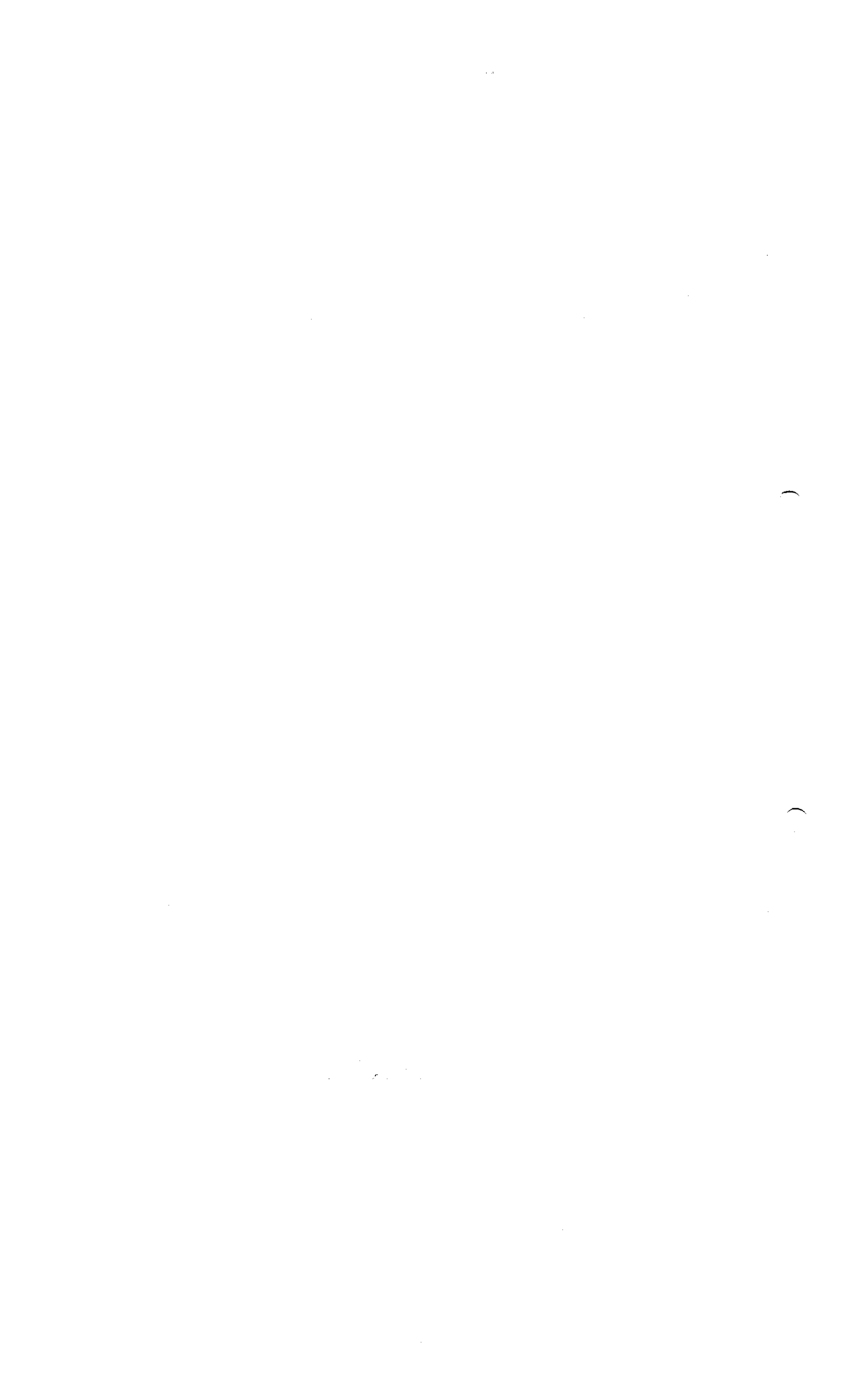
Tabla 23: Parámetros de producción registrados durante la reacción de conjugación.....39

Tabla 24: Datos de los parámetros de producción registrados durante los pasos críticos 3a y 3b = reacción de conjugación, lote FA20227141

Tabla 25: Datos de los parámetros de producción registrados durante las etapas críticas 3a y 3b = reacción de conjugación, lote FA20227242

Tabla 26: Datos de los parámetros de producción registrados durante las etapas críticas 3a y 3b = reacción de conjugación, lote FA20227343

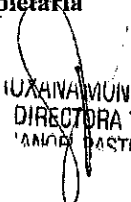
Tabla 27: Resultados del control de calidad del granel concentrado conjugado de polisacárido de *Haemophilus*44





Lista de figuras

Figura 1: Afiliación de los 3 lotes consecutivos de uniformidad de PRP-T obtenidos de la unión entre PRP-AH y CTP.	26
Figura 2: Afiliación de seis lotes de uniformidad consecutivos de PRP-T	35


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DOMINGUEZ
AJUERADO
SANOFI PASTEUR S.A.





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

1 Introducción

La producción del granel de polisacárido conjugado de *Haemophilus*, abreviado PRP-T, y obtenido mediante la unión covalente del polisacárido de *Haemophilus* tipo b activado (PRP-AH) a la proteína tetánica concentrada (CTP) se divide en tres pasos de producción principales:

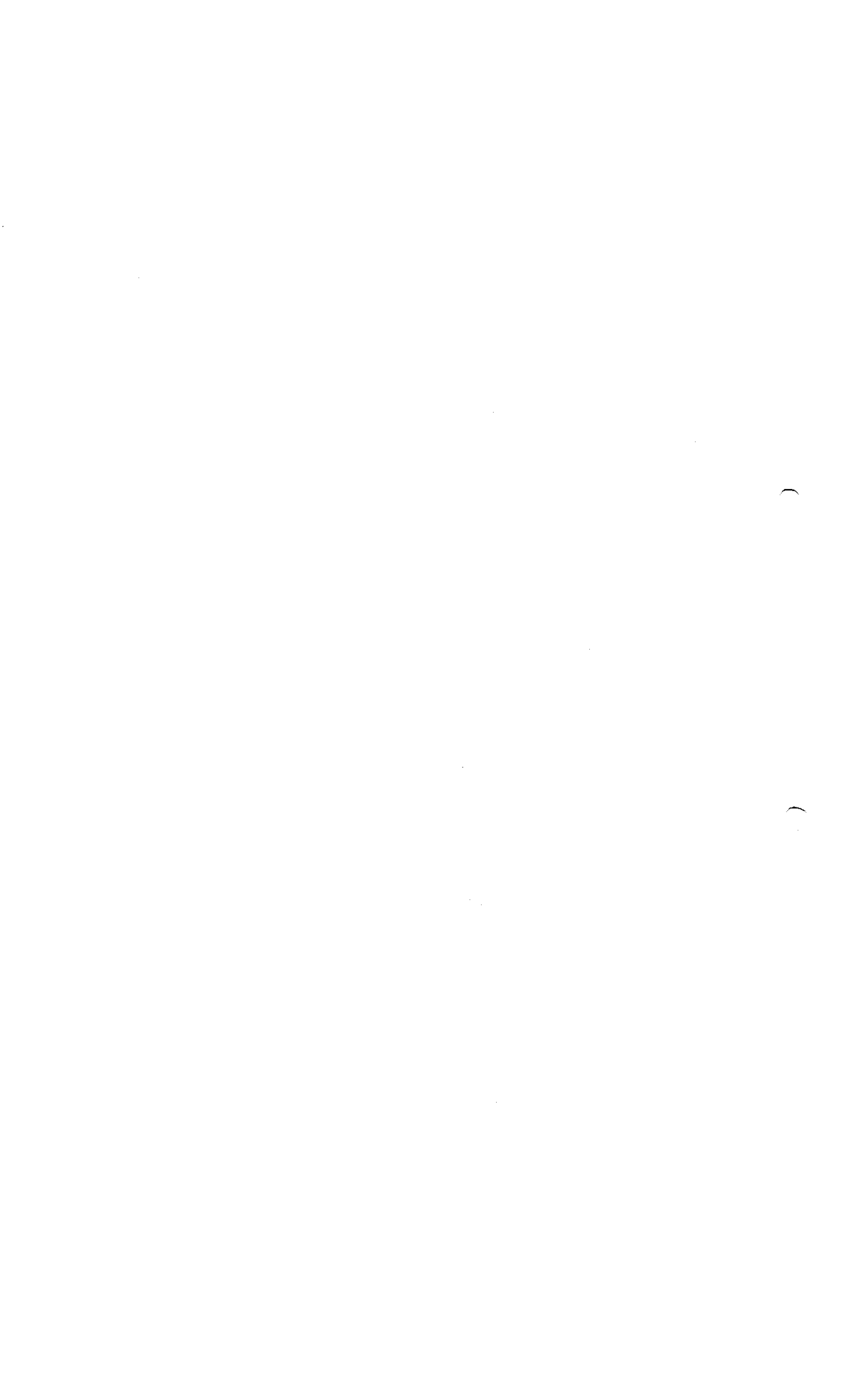
- Producción del polisacárido activado de *Haemophilus* tipo b (PRP-AH);
- Producción de la proteína tetánica concentrada (CTP).
- Conjugación del polisacárido de *Haemophilus* tipo b a la proteína tetánica concentrada para obtener el PRP-T.

Cada parte del proceso de elaboración se ha validado de forma independiente al menos en tres lotes industriales consecutivos, como se describe a continuación:

- **Parámetros de producción:** Los que se definen en la sección 3.2.S.2.2 Cultivo celular y cosecha y 3.2.S.2.2 Reacciones de purificación y modificación y parámetros de producción adicionales que respaldan la validación del proceso.
- **Controles durante el proceso:** Los que se definen en la sección 3.2.S.2.2 Cultivo celular y cosecha y 3.2.S.2.2 Reacciones de purificación y modificación e IPC adicionales y pruebas de caracterización adicionales que respaldan la validación del proceso.
- **Pruebas de control de calidad en los productos intermedios y en el principio activo:** los que se definen en las secciones 3.2.S.2.4 Controles de pasos críticos e intermedios: Intermedio PRP, 3.2.S.2.4 Controles de los pasos críticos e intermedios: Intermedio PRP- AH, 3.2.S.2.4 Controles de los pasos críticos e intermedios: Intermedio PTP, 3.2.S.2.4 Controles de los pasos críticos e intermedios: Intermedio CTP y 3.2.S.4.1 Especificaciones.
- **Pasos críticos:** los definidos y presentados en 3.2.S.2.4 Control de los pasos críticos e intermedios.
- Estudios adicionales de caracterización cuando corresponde.

Cada paso de la producción se validó para demostrar que el proceso de elaboración permite producir el granel de polisacárido conjugado de *Haemophilus* tipo b (PRP-T) de manera uniforme y con la calidad requerida (vea la sección 3.2.S.4.1 Especificaciones).

Esta sección describe los resultados de validación obtenidos para cada paso del proceso de elaboración e incluye una discusión de los resultados y su conclusión.





2 Validación de la producción del polisacárido de *Haemophilus* tipo b (PRP)

2.1 Fermentación del polisacárido de *Haemophilus influenzae* tipo b y pasos de la cosecha hasta el producto intermedio pellets de ceftrixima

2.1.1 Introducción

Para validar la fermentación y cosecha del polisacárido de *Haemophilus influenzae* tipo b, se elaboraron dos conjuntos de 3 lotes consecutivos de polisacárido de *Haemophilus* tipo b (FA206737, FA206738 y FA206739) y (FA214147, FA214149 y FA214160) siguiendo el proceso de elaboración descrito en las secciones 3.2.S.2.2 Cultivo celular y cosecha y 3.2.S.2.2 Reacciones de purificación y modificación.

2.1.2 Parámetros de producción

Los parámetros de producción registrados durante el programa de validación, desde la etapa de fermentación del *Haemophilus influenzae* tipo b (1.1) hasta el pellet de ceftrixima (fin de la etapa 1.6b), se presentan en la Tabla 1. Todos los parámetros de producción (vea Tabla 1) que se siguieron durante el programa de validación estuvieron dentro de los rangos operativos históricos.

2.1.3 Controles durante el proceso realizados en el marco de la validación.

Se realizaron controles durante el proceso en el marco de la validación en distintas etapas a lo largo de todo el proceso de elaboración, desde la fermentación hasta el pellet de ceftrixima, y sobre el polisacárido de *Haemophilus* tipo b (vea la Tabla 2).

Todos los resultados cumplen con los criterios de aceptación definidos.

2.1.4 Pruebas de control de calidad

Los seis lotes descritos en este capítulo se continuaron procesando hasta la etapa del polisacárido de *Haemophilus* tipo b (final de la etapa 1.10b); vea los resultados del control de calidad Tabla 3.

Todos los resultados cumplen con los criterios de aceptación definidos.

2.1.5 Pasos críticos

No existen pasos que se consideren críticos durante las etapas de fermentación y cosecha del polisacárido de *Haemophilus influenzae* tipo b hasta el producto intermedio pellets de ceftrixima.

Tabla 1: Parámetros de producción estudiados durante el programa de validación de la fermentación del *Haemophilus influenzae* tipo b y la cosecha del polisacárido

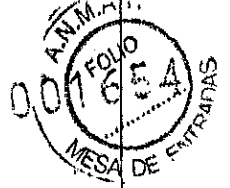
Pasos de elaboración	Parámetros de producción	Rangos operativos
Etapa 1.2: 2° precultivo	Duración del cultivo (horas)	4h00 a 10h00
Etapa 1.3: 3° precultivo	Duración del cultivo (horas)	3h00 a 6h00
Etapa 1.4: Cultivo industrial	Duración del cultivo (horas)	11h00 a 13h00
Etapa 1.5a: Adición del formaldehído	Tiempo de contacto (horas)	2h00 a 24h00
Etapa 1.5c: Concentración mediante ultrafiltración	Duración (horas)	2h50 a 5h55
	Volumen final (L)	330 a 370

Tabla 2: Controles durante el proceso realizados durante el programa de validación de la fermentación del *Haemophilus influenzae* tipo b y la cosecha del polisacárido

Pasos de elaboración	Pruebas	Criterios de aceptación	FA206737 (PRP FA212733)	FA206738 (PRP FA212731)	FA206739 (PRP FA222113)	FA214147 (PRP FA218548)	FA214149 (PRP FA218549)	FA214160 (PRP FA225123)
Etapa 1.4: Cultivo industrial	Contenido antigénico	0,130 - 0,396 (mg/mL)	0,178	0,281	0,279	0,210	0,201	0,243
Etapa 1.6a: Concentración mediante ultrafiltración	Contenido antigénico	0,307 - 0,061 (mg/mL)	0,467	0,705	0,658	0,494	0,474	0,632

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.



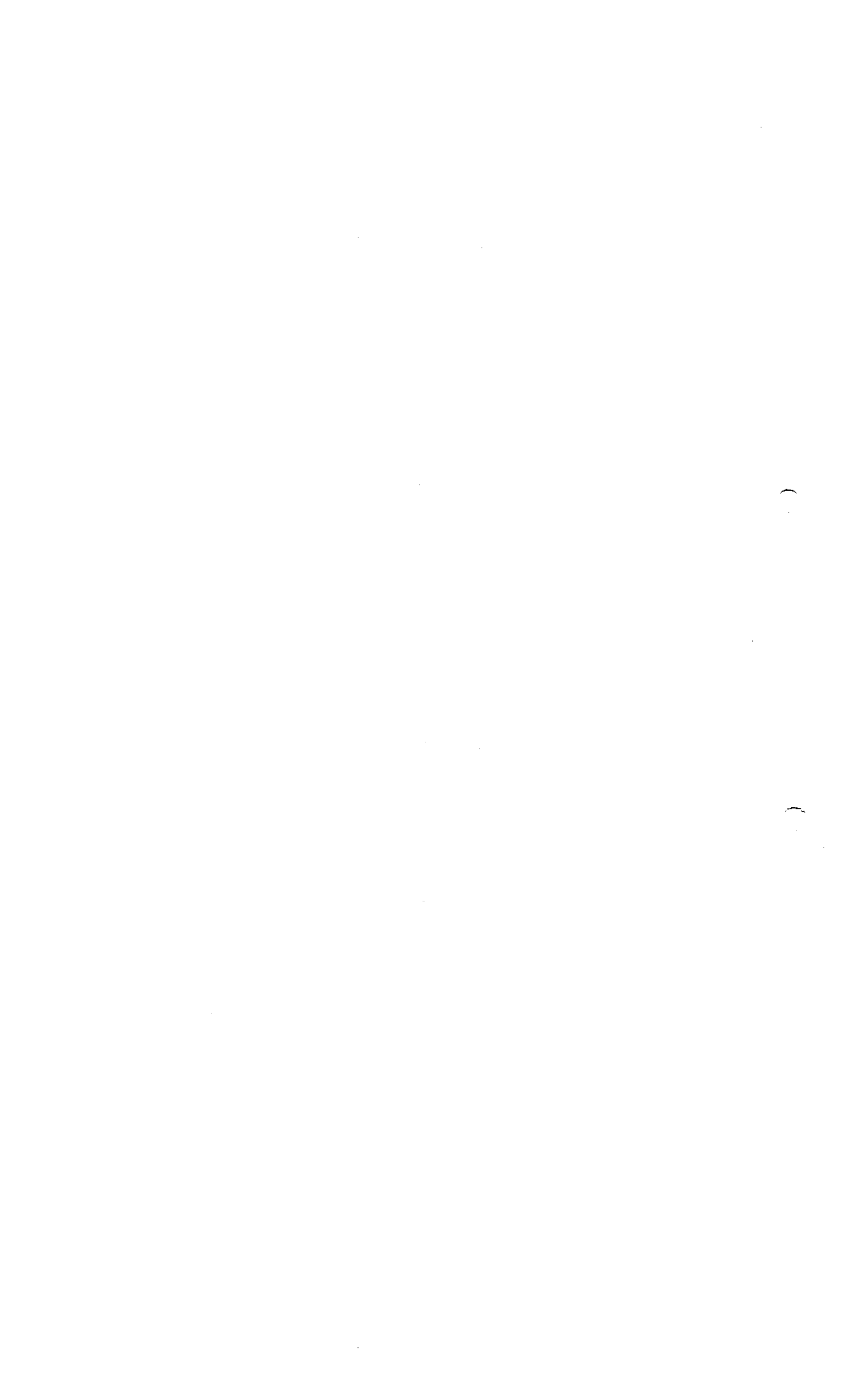


Tabla 3: Resultados de los controles de calidad del polisacárido de *Haemophilus* tipo b

Pruebas	Criterios de aceptación	FA206737 (PRP FA212733)	FA206738 (PRP FA212731)	FA206739 (PRP FA222113)	FA214147 (PRP FA218548)	FA214149 (PRP FA218549)	FA214160 (PRP FA225123)
Contenido de humedad residual	Para calcular el peso seco (%)	6,57	6,54	5,39	8,09	7,07	7,69
Contenido de fósforo	6,80 - 9,00 % *	7,47	7,13	6,94	7,20	6,97	7,20
Contenido de ribosa	≥ 32 %*	33,9	36,7	36,3	36,1	34,8	36,6
Contenido proteico	≤ 1,0%	<0,12	<0,12	<0,11	<0,12	<0,12	<0,11
Contenido de ácidos nucleicos	≤ 1,0%	0,17	0,15	0,10	0,15	0,17	0,16
Contenido de endotoxinas bacterianas	<25 UI/μg de polisacárido	1,55	2,56	1,08	2,85	2,66	4,45
Distribución por tamaño molecular: polisacárido eluido antes de K _D 0,30)	> 50%*	72,9	64,8	70,3	65,0	70,5	65,7
Prueba de identificación del <i>Haemophilus</i> tipo B	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Prueba de pirógenos	Cumple con la Ph. Eur. (Δ temperatura ≤ 1,15 °C para la prueba en 3 conejos)	0,41	0,95	0,43	0,73	0,86	1,43 2,24†

Estos criterios de aceptación difieren de los que se presentan en la sección 3.2.S.2.4: los criterios de aceptación del contenido de fósforo y de ribosa corresponden aquí a los aplicados cuando estaba vigente la determinación de humedad residual por termogravimetría, antes de la variación de contenidos de GC y Karl Fisher, asimismo, los criterios de aceptación de la distribución por tamaño molecular corresponden a los aplicados utilizando el método inicial mediante LPSEC antes de la variación.

Si la primera prueba de pirógenos, realizada en un grupo de 3 conejos, falla, se lleva a cabo una segunda prueba en un grupo de 3 conejos. En este caso, la suma de la Δtemperatura de los 6 animales no debe superar los 2,80 °C.

UXANA MONTMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.

