



### 2.1.6 Discusión y conclusiones

Todos los valores registrados para los parámetros de producción aplicados durante la fermentación del *Haemophilus influenzae* tipo b y la cosecha de polisacárido de *Haemophilus* tipo b, para 2 series de 3 lotes (vea la Tabla 1), cumplieron con los rangos operativos definidos anteriormente. Esto demuestra que el proceso de elaboración está bajo control, desde el primer precultivo hasta la producción de pellets de cetrimida.

Los resultados de los controles durante el proceso registrados durante el proceso demuestran que la producción de PRP es uniforme (vea la Tabla 2). Además, cuando se continúa con el proceso de elaboración, el polisacárido de *Haemophilus* tipo b obtenido al final del proceso cumple con las especificaciones de liberación (vea la Tabla 3).

En conclusión, el proceso de elaboración propuesto para la producción del polisacárido de *Haemophilus* tipo b queda validado, desde la etapa de precultivo del *Haemophilus influenzae* tipo b hasta la producción de pellets de cetrimida.



## 2.2 Paso de purificación del polisacárido de *Haemophilus* tipo b (PRP)

### 2.2.1 Introducción

Para validar la purificación del polisacárido de *Haemophilus* tipo b, se elaboraron 4 lotes consecutivos (FA199674, FA199675, FA199676 y FA199851) siguiendo el proceso de elaboración descrito en la sección 3.2.S.2.2 Cultivo celular y cosecha y 3.2.S.2.2 Reacciones de purificación y modificación.

### 2.2.2 Parámetros de producción

Todos los parámetros de producción (vea Tabla 4) que se siguieron durante el programa de validación estuvieron dentro de los rangos operativos históricos.

### 2.2.3 Controles durante el proceso

El contenido de ceftriaxona del polisacárido de *Haemophilus* tipo b, medido en un control durante el proceso en el marco de la validación, se presenta en la Tabla 5.

Todos los resultados cumplen con los criterios de aceptación definidos.

### 2.2.4 Pruebas de control de calidad

Los resultados de liberación de los lotes de polisacárido de *Haemophilus* tipo b obtenidos al final del paso de purificación se presentan en la Tabla 6.

Todos los resultados cumplieron con los criterios de aceptación.

### 2.2.5 Pasos críticos

Los parámetros de producción de los cuatro lotes de fermentación (FA206737, FA206738, FA206739 y FA214147, respectivamente) procesados hasta la etapa crítica de extracción con fenol (etapa 1.8a) cumplen con los rangos operativos; vea la Tabla 7.







**Tabla 4: Parámetros de producción registrados durante el programa de validación de la purificación del polisacárido de *Haemophilus* tipo b (PRP)**

Pasos de elaboración	Parámetros de producción	Rangos operativos
Etapa 1.7b: Precipitación con alcohol al 60%	Temperatura del etanol	≤ -10°C
Etapa 1.7d: Desección al vacío	Duración	> 10h00
Etapa 1.8b: Diálisis	Duración de la diálisis	≥ 10h00
Etapa 1.8c: Ultrafiltración	DO <sub>260 nm</sub> del ultrafiltrado	≤ 0,060
Etapa 1.9a: Precipitación con alcohol 60% en presencia de NaCl	Temperatura del etanol	≤ -10°C
Etapa 1.10a: Desección al vacío	Duración de la desecación	> 15 horas

**Tabla 5: Control durante el proceso realizado en el marco de la validación sobre el polisacárido de *Haemophilus* tipo b (PRP) para validar el proceso de purificación**

Pruebas	Criterios de aceptación	FA199674	FA199675	FA199676	FA199851
Contenido de cetrinmida	≤ 2%	< 1	< 1	< 1	< 1



Tabla 6: Resultados de los controles de calidad del polisacárido de *Haemophilus* tipo b (PRP)

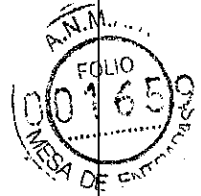
Pruebas	Criterios de aceptación	FA199674	FA199675	FA199676	FA199851
Humedad residual (%)	Para calcular (%)	6,49	6,44	5,48	6,61
Contenido de fósforo	6,80 % a 9,00 % *	7,35	7,16	7,27	7,31
Contenido de ribosa	≥ 32 %*	37,9	36,3	35,8	34,8
Contenido proteico	≤ 1.0%	< 0,11	< 0,12	< 0,12	< 0,11
Contenido de ácidos nucleicos	≤ 1.0%	0,13	0,10	0,15	0,14
Contenido de endotoxinas bacterianas	<25 UI/μg de polisacárido	0,80	1,06	1,68	2,34
Distribución por tamaño molecular: polisacárido eluido antes de K <sub>D</sub> 0,30	> 50 %*	69,4	72,2	72,4	66,7
Prueba de identificación del <i>Haemophilus</i> tipo b	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Prueba de pirógenos	Cumple con la Ph. Eur. (Δ temperatura ≤ 1,15°C para la prueba en 3 conejos)†	0,19	0,50	0,88	0,28

\* 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.

Consulte la monografía 2.6.8 de la Ph. Eur. para ver los criterios de aceptación detallados

SAINA MONTIEL LUNA  
DIRECTORA TÉCNICA  
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DUMINGUEZ  
APODERADO  
SANOFI PASTEUR S.A.





**Tabla 7: Datos de los parámetros de producción registrados durante el paso crítico 1.8a = extracción con fenol**

Pasos de elaboración	Parámetros de producción	Rangos operativos	FA206737		FA206738		FA206739		FA1214147	
Etapa 1.8a: Extracción con fenol	Duración de la agitación*	Aprox. 15 min. (de 14 a 17 min.)	14'42	14'23	14'33	16'23	14'32	14'23	14'35	14'20
			14'45	14'12	14'34	14'27	14'34	14'28	14'29	14'25
			14'29	14'23	14'26	14'24	14'27	14'21	14'38	14'06

\* Los resultados corresponden a 6 extracciones con fenol sucesivas

  
ROXANA MONTEMILONE  
DIRECTORA TÉCNICA  
SANOFI PASTEUR S.A.

  
CHRISTIAN DOMÍNGUEZ  
APROBADO  
SANOFI PASTEUR S.A.







## 2.2.6 Validación del reprocesamiento

### 2.2.6.1 Introducción

El paso final de purificación (etapas 1.8 a 1.10) se puede repetir una vez si es necesario, cuando la prueba de pirógenos y/o de contenido de endotoxinas bacterianas que se realizan en el PRP estén fuera de las especificaciones (vea la sección 3.2.S.2.2 Reacciones de purificación y modificación y 3.2.S.2.4 Controles de los pasos críticos e intermedios: Intermedio PRP).

El propósito de la validación es demostrar que el reprocesamiento no tiene ningún impacto sobre la calidad del PRP.

### 2.2.6.2 Resultados

Se reprocesaron tres lotes de PRP, a saber, FA088346, FA094302 y FA094307 que presentaban un contenido de endotoxinas fuera de las especificaciones (vea la Tabla 8), que produjeron tres nuevos lotes de PRP con los siguientes números: FA097766, FA097767 y FA097768, respectivamente.

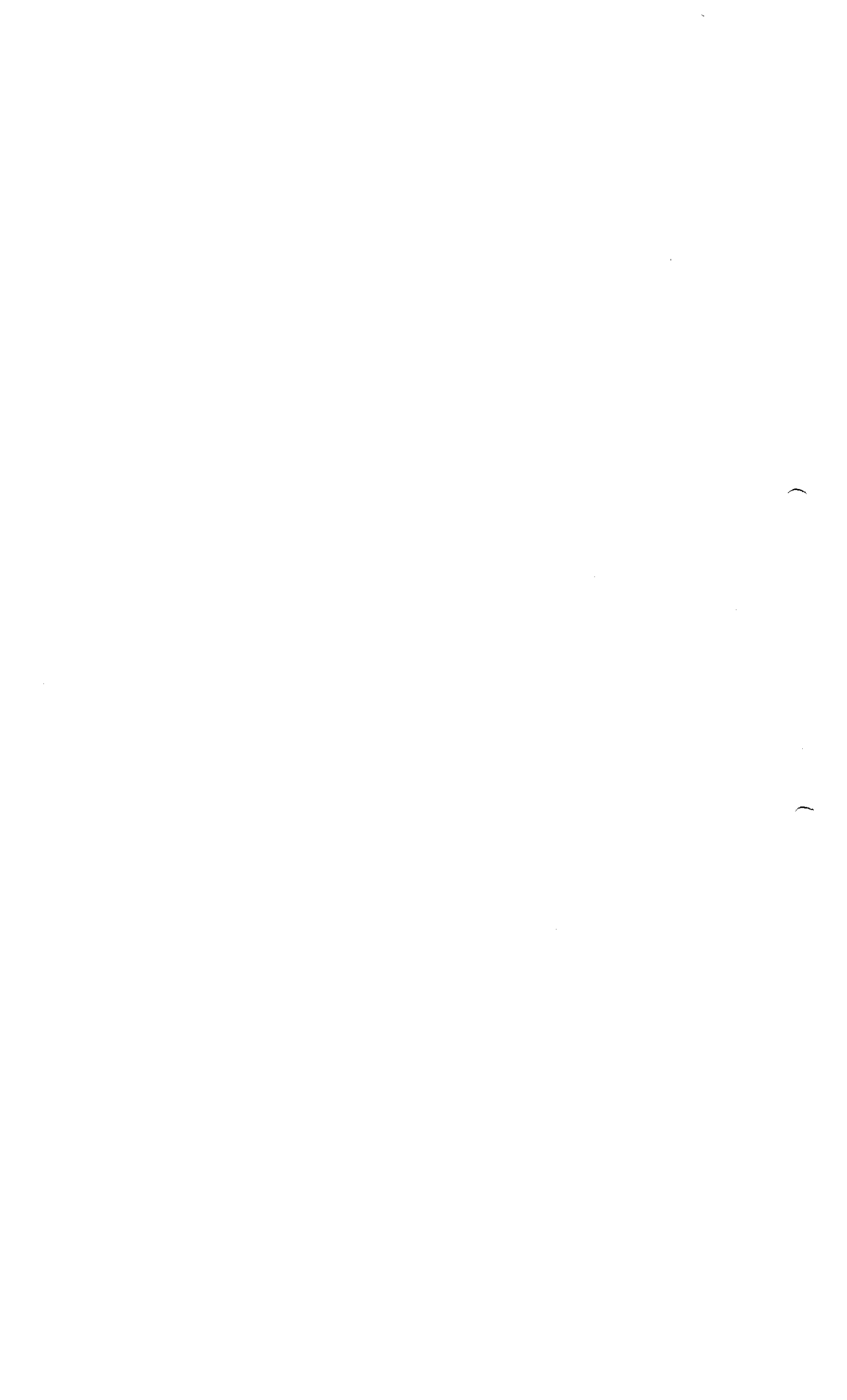
Se reprocesaron otros tres lotes de PRP, a saber, FA225114, FA231925 y FA242663 que presentaban resultados de la prueba de pirógenos que se encontraban fuera de las especificaciones (vea la Tabla 9), que produjeron tres nuevos lotes de PRP con los siguientes números: FA2812197, FA281299 y FA281302, respectivamente.

**Tabla 8: Lotes de validación del reprocesamiento: contenido de endotoxinas**

Número de lote de PRP	FA088346	FA094302	FA094307
Fecha de elaboración	25/10/2001	26/10/2001	31/10/2001
Contenido de endotoxinas (UI/μg)	19,07	14,81	14,32
Número de lote del PRP después del reprocesamiento	FA097766	FA097767	FA097768
Fecha de reprocesamiento	29/11/2001	03/12/2001	05/12/2001
Contenido de endotoxinas (UI/μg)	1,14	1,28	1,88


**Tabla 9: Lotes de validación del reprocesamiento: contenido de pirógenos**

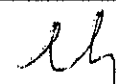
Número de lote de PRP	FA225114	FA231925	FA242663
Fecha de elaboración	23/11/2005	01/02/2006	24/05/2006
Prueba de pirógenos (Δ temperatura)	4,68°C (6 conejos)	6,96°C (12 conejos)	6,49°C (9 conejos)
Número de lote del PRP después del reprocesamiento	FA2812197	FA281299	FA281302
Fecha de reprocesamiento	26/06/2007	05/07/2007	17/07/2007
Prueba de pirógenos (Δ temperatura)	0,28°C (3 conejos)	0,34°C (3 conejos)	0,77°C (3 conejos)



Se evaluó por medio de Resultados de control de calidad la ausencia de impacto del reprocesamiento en los 6 lotes de polisacárido de *Haemophilus* tipo b, que se presentan en la Tabla 10 y en la Tabla 11.



  
ROXANA MONTEMILONE  
DIRECTORA TÉCNICA  
SANOFI PASTEUR S.A.

  
CHRISTIAN DOMINGUEZ  
APODERADO  
SANOFI PASTEUR S.A.



**Tabla 10: Resultados de control de calidad para los lotes de PRP reprocesados FA097766, FA097767 y FA097768.**

Pruebas*	Criterios de aceptación*	FA097766	FA097767	FA097768
Contenido de humedad residual	Para calcular (%)	5,85	6,30	5,65
Contenido de fósforo	6,8 % - 9,0 %	8,23	8,16	8,20
Contenido de ribosa	≥ 32%	33,6	34,4	33,4
Contenido proteico	≤ 1,0%	< 0,06	< 0,06	< 0,06
Contenido de ácidos nucleicos	≤ 1,0%	0,07	0,10	0,11
Contenido de endotoxinas bacterianas	<10 UI/µg de polisacárido	1,14	1,28	1,88
Distribución por tamaño molecular: polisacárido eluido antes de K <sub>D</sub> 0,30)	> 50 %	71,5	67,8	75,1
Prueba de identificación del <i>Haemophilus</i> tipo b	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Prueba de pirógenos	Cumple con la Ph. Eur. (Δ temperatura ≤ 1,15°C para la prueba en 3 conejos)	0,75°C	0,25°C	0,75°C

\* Métodos de prueba y criterios de aceptación vigentes en el momento de los análisis de lotes.

  
ROXANA MONTEMILONE  
DIRECTORA TÉCNICA  
SANOFI PASTEUR S.A.

  
CHRISTIAN DOMÍNGUEZ  
APODERADO  
SANOFI PASTEUR S.A.

CA 0302404

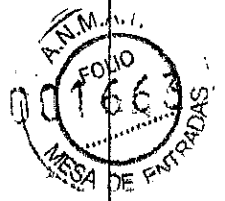




Tabla 11: Resultados de control de calidad para los lotes de PRP reprocesados FA2812197, FA281299 y FA281302

Pruebas*	Criterios de aceptación*	FA2812197	FA281299	FA281302
Humedad residual (%)	Para calcular (%)	22,40	19,70	22,70
Contenido de fósforo	7,5% - 9,4%	8,23	8,16	8,20
Contenido de ribosa	35 % - 45 %	41,3	40,4	41,7
Contenido proteico	≤ 1.0%	< 0,11	< 0,13	< 0,13
Contenido de ácidos nucleicos	≤ 1.0%	0,07	0,46	0,10
Contenido de endotoxinas bacterianas	< 10 UI/µg de polisacárido	1,14	1,06	1,68
Distribución por tamaño molecular: polisacárido eluido antes de K <sub>D</sub> (0,30)	> 50%	59,9	64,4	65,2
Prueba de identificación del <i>Haemophilus</i> tipo B	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Prueba de pirógenos	Cumple con la Ph. Eur. (Δ temperatura ≤ 1,15°C para la prueba en 3 conejos)	0,28°C	0,34°C	0,77°C

Métodos de prueba y criterios de aceptación vigentes en el momento de los análisis de lotes.

LUXANA MONTEMILONE  
DIRECTORA TÉCNICA  
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMÍNGUEZ  
APODERADO  
SANOFI PASTEUR S.A.







## 2.2.7 Discusión y conclusiones

Todos los valores registrados para los parámetros de producción durante el programa de validación de la purificación del polisacárido cumplieron con los rangos operativos definidos anteriormente (vea la Tabla 4).

El contenido de cetrimida, medido como un control durante el proceso sobre el polisacárido de *Haemophilus* tipo b, también cumple con los criterios de aceptación correspondientes a este parámetro (vea la Tabla 5).

Todos los resultados de control de calidad correspondientes a los lotes de polisacárido de *Haemophilus* tipo b medidos al final del paso de purificación cumplen con las especificaciones de liberación descritas en la sección 3.2.S.2.4, Control de los pasos críticos e intermedios: Intermedio PRP (vea la Tabla 6).

Además, los parámetros de producción registrados durante la etapa crítica de extracción con fenol (1.8a) cumplen con los rangos operativos definidos anteriormente (vea la Tabla 7).

Además, el reprocesamiento del paso final de purificación permite obtener resultados de las pruebas de pirógenos y endotoxinas bacterianas que se encuentren dentro de las especificaciones.

En conclusión, el proceso de elaboración propuesto para la producción del polisacárido de *Haemophilus* tipo b queda validado, desde los pellets de cetrimida hasta la producción de polisacárido de *Haemophilus* tipo b (PRP).





### 3 Validación de la producción del polisacárido AH activado de *Haemophilus* tipo b (PRP-AH)

#### 3.1 Introducción

Para validar la producción de polisacárido-AH de *Haemophilus* tipo b activado, se elaboraron 3 lotes consecutivos (FA205195, FA205196 y FA205197) siguiendo el proceso de elaboración descrito en la sección 3.2.S.2.2 Reacciones de purificación y modificación.

#### 3.2 Parámetros de producción

Todos los parámetros de producción (vea la Tabla 12) que se siguieron durante el programa de validación cumplieron con los rangos operativos históricos, excepto por un parámetro de producción (tiempo de homogenización) del lote FA205197. Aunque esto no afecta la calidad del producto final, se incluyó un cuarto lote (FA205198) en el programa de validación como medida de precaución.

#### 3.3 Controles durante el proceso

No se realizan controles durante el proceso en el marco de la validación en esta etapa del proceso de elaboración.

#### 3.4 Pruebas de control de calidad

Las características del polisacárido-AH activado de *Haemophilus* se analizan de acuerdo con las especificaciones (vea la sección 3.2.S.2.4, Control de los pasos críticos e intermedios: Intermedio PRP-AH) para evaluar la calidad de este producto intermedio (vea la Tabla 13).

Todos los resultados fueron conformes a los criterios de aceptación.

#### 3.5 Pasos críticos

Los parámetros de producción que controlan el paso crítico de activación del PRP (paso 1.11b), cumplen con los rangos operativos (vea la Tabla 14).





**Tabla 12: Parámetros de producción registrados durante la activación del polisacárido-AH de *Haemophilus***

Pasos de elaboración	Parámetros de producción	Rangos operativos
Etapa 1.11b: Activación del PRP	Tiempo de disolución en BrCN	De 8 a 18 min.
	Tiempo de reacción	De 35 a 40 min.
	Temperatura de reacción	+22,0 °C a +26,0 °C
Etapa 1.11c: Unión de ADH	Tiempo de reacción	14 min 30 s a 15 min 00 s
Etapa 1.11d: Purificación	Tiempo de agitación	8h10 a 29h30
	Tiempo de homogeneización	De 30 a 114 min.



**Tabla 13: Resultados de los controles de calidad del polisacárido-AH de *Haemophilus* activado**

Pruebas	Criterios de aceptación	FA205195	FA205196	FA205197	FA 205198
Contenido de cianuro residual*	≤ µg/mL	< 0,004	< 0,004	< 0,004	< 0,008
Contenido de polisacárido (contenido de fósforo)	Para calcular el porcentaje de ADH unida a polisacárido (mg/mL)	13,0	12,5	13,1	13,1
Porcentaje de ADH unida a polisacárido	1,8 % a 2,9 %	2,04	2,19	2,12	2,08
Proporción ADH libre/ADH total	< 0,1	0,047	0,034	0,038	0,050
Distribución por tamaño molecular†	≤ 15%	2,99	3,65	1,33	1,20
Polisacárido eluido antes de K <sub>b</sub> 0,20	0,8 a 0,60	0,49	0,48	0,52	0,54
K <sub>b</sub> de polisacárido	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo

\* Método vigente en el momento del estudio. El presente análisis es una prueba de límite (las especificaciones permanecen sin cambios).

† Estas especificaciones son diferentes de las que se expusieron en la sección 3.2.S.2.4 Controles de pasos críticos e intermedios: Intermedio PRP-AH, porque esta prueba se realizó mediante el método LP-SEC (vigente en el momento del análisis) en lugar del método HP-SEC, que es el actual.

JUAN MONTIELONE  
 DIRECTORA TÉCNICA  
 SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINGUEZ  
 APODERADO  
 SANOFI PASTEUR S.A.

RA\_0302404



(

)