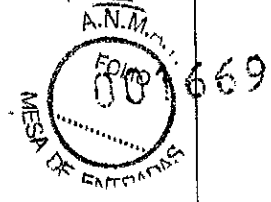


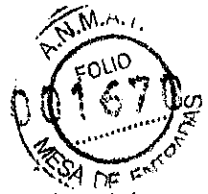
Tabla 14: Datos de parámetros de producción durante el paso crítico 1.11b = activación del PRP para obtener PRP-AH

Pasos de elaboración	Parámetros de producción	Rangos operativos	FA205195	FA205196	FA205197	FA 205198
Etapa 1.11b: Activación del PRP	Tiempo de disolución en BrCN	de 8 a 18 min.	10 min 52 s	9 min 31 s	11 min 30 s	12 min 33 s
	Tiempo de reacción	de 35 a 40 min.	35	35	36	40
	Temperatura de reacción	+22°C a +26°C	23,9 a 24,2	23,9 a 24,2	23,8 a 24,3	24,0 a 24,1

[Signature]
UXANA MUNTEMLONE
 DIRECTORA TÉCNICA
 SANOFI PASTEUR S.A.

[Signature]
CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
 APODERADO
 SANOFI PASTEUR S.A.





3.6 Discusión y conclusiones

Los valores registrados para los parámetros de producción durante la reacción de activación del polisacárido de *Haemophilus* tipo b (vea la Tabla 12), para 3 lotes consecutivos, cumplen con los límites de los rangos operativos definidos anteriormente, salvo el lote FA205197. De hecho, el tiempo de homogenización de la etapa 1.11d para este lote estuvo por encima del límite superior, es decir, 136 min en lugar de 114 min. Aunque este resultado no mostró tener ningún impacto en la calidad del producto, se utilizó el cuarto lote, el siguiente, FA205198, para completar el estudio de validación.

Todos los resultados de control de calidad referidos a los lotes de polisacárido-AH activado de *Haemophilus* medidos al final de la etapa de concentración cumplen con los criterios de aceptación (vea la Tabla 13).

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

En conclusión, el proceso de elaboración propuesto para activar el polisacárido de *Haemophilus* tipo b (PRP-AH) se considera validado.



4 Validación de la producción de la proteína tetánica concentrada (CTP)

La validación de la CTP se dividió en dos pasos:

- Validación de la producción de proteína tetánica purificada (PTP): vea el capítulo 4.1.
- Validación del paso de concentración de la proteína tetánica purificada para obtener la proteína tetánica concentrada (CTP): vea el capítulo 4.2.

4.1 Validación de la producción de proteína tetánica purificada (PTP)

4.1.1 Introducción

La validación de la producción de la proteína tetánica purificada (PTP) se dividió en dos etapas:

- El proceso de fermentación del *Clostridium tetani*, desde la preparación del inóculo hasta la lisis celular para obtener la toxina tetánica concentrada;
- Las etapas de cosecha, purificación y detoxificación de la toxina tetánica concentrada para obtener la PTP.

Se produjeron nueve lotes consecutivos de toxina tetánica concentrada según se describe en las secciones 3.2.S.2.2 Cultivo celular y cosecha y 3.2.S.2.2 Reacciones de purificación y modificación.

Cuatro de esos nueve lotes se emplearon para elaborar lotes de PTP (FA246980, FA253589, FA254260 y FA254931), cuyos resultados de análisis se presentan en las tablas siguientes.

Nota: los otros cinco lotes de toxina tetánica concentrada se utilizaron para completar la validación del proceso de elaboración de otro antígeno (el toxoide tetánico purificado). Los resultados correspondientes no se presentan en esta sección.

La Figura 1 que aparece a continuación presenta la afiliación de los lotes utilizados para el programa de validación. Esta figura no presenta el lote de PTP FA254260 porque no se utilizó para ningún otro procesamiento.



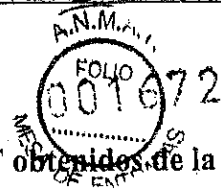
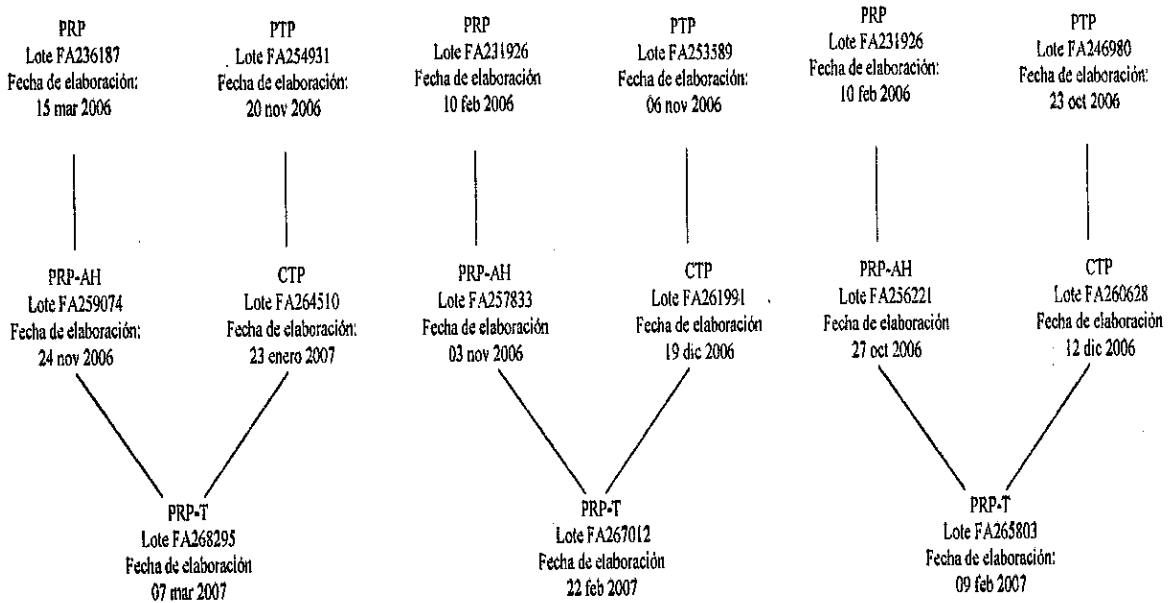


Figura 1: Afiliación de los 3 lotes consecutivos de uniformidad de PRP-T obtenidos de la unión entre PRP-AH y CTP.



También se registraron los controles durante el proceso en el curso de los programas de validación y se los comparó con los criterios de aceptación.

Las características de la proteína tetánica purificada (etapa 2.9d) obtenida al final de la etapa de purificación se analizaron de acuerdo con las especificaciones de liberación para la PTP.

4.1.2 Resultados de validación

A continuación se presentan los resultados obtenidos para los parámetros de producción, los controles durante el proceso, las pruebas de control de calidad y los pasos críticos que se registraron.

4.1.2.1 Parámetros de producción

Todos los resultados registrados para los parámetros de producción durante el proceso cumplieron con los rangos operativos, en especial para los parámetros de producción de control de los pasos críticos que se describe en 3.2.S.2.4 Control de los pasos críticos e intermedios: Intermedio PTP.

Los parámetros de producción estudiados durante la fermentación del *Clostridium tetani*, desde la preparación del inóculo (etapa 2.1) hasta la lisis celular (etapa 2.6), se presentan en la Tabla 15.

Nota: en la Tabla 20 se presentan los resultados de sólo cuatro lotes de toxina tetánica concentrada, pero los resultados de los nueve lotes de toxina tetánica concentrada cumplen con los criterios de aceptación.

Los parámetros de producción de la cosecha, purificación y detoxificación de la toxina tetánica, desde la toxina cruda (etapa 2.6) hasta la detoxificación (etapa 2.10), para obtener la PTP se presentan en la Tabla 16.





Todos los resultados cumplen con los rangos operativos definidos.

4.1.2.2 Controles durante el proceso

Se presentan los resultados de los controles durante el proceso:

- En la Tabla 17 sobre la fermentación del *Clostridium tetani*,
- En la Tabla 18 sobre la purificación y detoxificación del *Clostridium tetani*.

Todos los resultados cumplen con los criterios de aceptación definidos.

4.1.2.3 Pruebas de control de calidad

Al final del proceso de elaboración, las características de la proteína tetánica purificada se analizan de acuerdo con los criterios de aceptación (vea la sección 3.2.S.2.4, Control de los pasos críticos e intermedios: Intermedio PTP) para evaluar la calidad del producto, vea la Tabla 19.

Todos los resultados cumplen con los criterios de aceptación definidos.

4.1.2.4 Pasos críticos

Los datos registrados sobre los parámetros de producción que controlan el tratamiento con formaldehído (etapa 2.10a) se presentan en la Tabla 20. Estos datos cumplen con los criterios de aceptación.

Nota: en la Tabla 20 se presentan los resultados de sólo cuatro lotes de toxina tetánica concentrada, pero los resultados de los nueve lotes de toxina tetánica concentrada cumplen con los criterios de aceptación.





Tabla 15: Parámetros de producción registrados durante la validación de la fermentación de *Clostridium tetani*

Paso de elaboración	Parámetros de producción	Rangos operativos
Etapa 2.1: Preparación del inóculo	Temperatura	+ 34 °C a + 36 °C
	Duración	24 a 72 h
Etapa 2.2: 1 ^{er} precultivo	Temperatura	+ 34 °C a + 36 °C
	Duración	6 a 10 h
Etapa 2.3: 2 ^o precultivo	Temperatura	+ 34 °C a + 36 °C
	Duración	12 a 20 h
Etapa 2.4: 3 ^{er} precultivo	Temperatura	+34°C a +36°C
	Duración	6 a 10 h
	Agitación:	≤ 63 rpm
Etapa 2.5: Cultivo industrial	Temperatura	+34°C a +36°C
	Duración	138 a 146 h
Etapa 2.6b: Lisis (adición de NaCl y citrato de Na)	Temperatura del producto durante la lisis	≤ +10°C
	Duración del contacto con las sales	12 a 20 h





Tabla 16: Parámetros de producción registrados durante la validación de la cosecha y detoxificación de la toxina tetánica

Paso de elaboración		Parámetros de producción	Rangos operativos
Etapa 2.7: Cosecha	Cosecha	Temperatura (°C)	Valor objetivo = 13
		Duración de la cosecha (h)	3h45 a 7h25
Etapa 2.9a: 1.ª precipitación		Duración de la decantación (h)	≥ 15h
		Temperatura durante la decantación (°C)	Valor objetivo = 5
Etapa 2.9b: 2.ª precipitación		Duración de la decantación (h)	≥ 64h
Etapa 2.9b: 2.ª precipitación y Etapa 2.9 c: Diafiltración	Precipitación	Temperatura durante la decantación (°C)	Valor objetivo = 5
	Disolución de pellets y diálisis	Temperatura durante la disolución y la diálisis (°C)	Valor objetivo = 5
Etapa 2.10a: Comienzo de la detoxificación	Ajuste de volumen a 300L/mL y filtración de 0,2 µm	Temperatura durante la filtración de 0,2 µm (°C)	Valor objetivo = 5
		Duración de la adición de formaldehído (min.)	Duración para un flujo correspondiente de 100 mL/min.
	Adición de formaldehído	Volumen de formaldehído agregado (L)	V _{formaldehído teórico} ± 10 mL
		Agitación durante la adición de formaldehído (rpm)	Valor objetivo = 400
Etapa 2,10a: detoxificación	1.ª etapa de detoxificación:	Temperatura (°C)	16 a 20
		Temperatura 2 (°C)	36 a 38
	2.ª etapa de detoxificación:	Temperatura 3 (°C)	5 a 9
		Temperatura 4 (°C)	36 a 38





Tabla 17: Control durante el proceso realizado durante la validación de la fermentación de *Clostridium tetani*

Paso de elaboración	IPC	Especificación	FA246980	FA253589	FA254260	FA254931
Etapa 2.1: Preparación del inóculo	Tinción de Gram	Bacilo Gram+	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
	Aspecto del medio*	Turbio	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Etapa 2.2: 1. ^{er} precultivo	Tinción de Gram*	Bacilo Gram+	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
	Aspecto del medio*	Turbio	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
	DO 694 nm	Mín. 0,061 – Max. 0,351	0,17	0,19	0,15	0,15
Etapa 2.3: 2. ^o precultivo	Tinción de Gram*	Bacilo Gram+	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
	Aspecto del medio*	Turbio	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
	DO 694 nm*	≥ 0,29	0,43	0,36	0,38	0,53
Etapa 2.4: 3. ^{er} precultivo	Pureza	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
	Tinción de Gram	Bacilo Gram+	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
	DO 694 nm*	≥ 0,26	0,28	0,30	0,33	0,36
	Medición del pH*	6,0 a 7,3	6,88	6,84	6,98	6,83
Etapa 2.5: Cultivo industrial	Pureza	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
	Tinción de Gram	Bacilo Gram+	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
	DO 694 nm*	≤ 1,74	0,61	0,58	0,93	0,80
	Medición del pH*	6,6 a 7,3	6,88	6,90	6,79	6,85
	Título de floculación (Lf/mL)	≥ 40	55	50	40	50
Etapa 2.6b: Lisis (adición de NaCl y citrato de na.)	Título de floculación (Lf/mL)	> 36	55	60	45	55

* Estos controles durante el proceso se llevaron a cabo sólo para el programa de validación y no se realizarán de forma rutinaria.



Tabla 18: Control durante el proceso realizado sobre la proteína tetánica purificada para validar la purificación y la detoxificación

Etapa	Concentración	Prueba	Criterios de aceptación	FA246980	FA253589	FA254260	FA254931
Etapa 2.7: Cosecha	Concentración Diafiltración	Título de Lf luego de la Diafiltración y el ajuste del volumen (Lf/ml)	Para información *	650	700	600	800
Etapa 2.7c: Diafiltración	Ultrafiltrado	Título de Lf (Lf/ml)	≤ 5	NR†	≤ 5	≤ 5	≤ 5
Etapa 2.8a: Ajuste del volumen	Ajuste del volumen a 500 Lf/ml y filtración de 0,2 µm	Título de Lf (Lf/ml)	Para verificar el ajuste a cerca de 500 Lf/ml	500	450	500	500
Etapa 2.9c: Diafiltración	Diálisis	Título de Lf luego de la Diafiltración y el ajuste del volumen (Lf/ml)	Para información ‡	NA	300	400	250
Etapa 2.9c: Diafiltración	Ajuste a 300Lf/ml	Rendimiento global, título de Lf %	≥ 22	35	40	24	34
		Etapa a 300Lf/ml / Etapa al final de la lisis					
Etapa 2.10a: Tratamiento con formaldehído	Tras la detoxificación y antes de la filtración de 0,22µm	Título de Lf (Lf/ml)	Para verificar el ajuste a cerca de 300 Lf/ml	250	300	200	300
		Contenido de amonio (mg/l)	$\leq 3,1$	$\leq 0,43$	$\leq 0,43$	$\leq 0,43$	$\leq 0,43$
Etapa 2.10a: Tratamiento con formaldehído	Después de la detoxificación	Carga biológica (UFC/ml)	≤ 20	0	1	0	0
		Formaldehído residual (µg/ml)	≥ 158	201	210	203	200

ROXANA MONTEMLONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
GERENTE
SANOFI PASTEUR S.A.

* Para calcular el volumen para obtener la dilución a 500 Lf/ml

NR: No realizada

Para calcular el volumen para obtener la dilución a 300 Lf/ml

Estas pruebas adicionales se llevaron a cabo sólo para el programa de validación y no se realizan de forma rutinaria.

RA_0302404





sanofi pasteur

Granel de polisacárido conjugado de *Haemophilus* tipo b

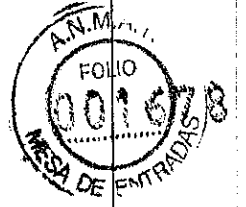
Sección 3.2.S.2.5
Validación y/o evaluación del proceso

Tabla 19: Resultados de control de calidad para la proteína tetánica purificada

Pruebas	Criterios de aceptación	FA246980	FA253589	FA254260	FA254931
Proporción nitrógeno proteico / nitrógeno total	$\geq 0,8$	0,83	0,90	0,95	0,94
Índice DO280/DO260	$\geq 1,3$	1,94	1,90	1,76	1,92
Pureza antigénica	> 1500 L/mg de nitrógeno proteico	3000	2547	2198	2459
Distribución por tamaño molecular (HPLC)	> 50 % de monómeros	71	69	67	66
Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica	Sin crecimiento microbiano	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
AUTORIZADO
SANOFI PASTEUR S.A.



Información confidencial/proprietaria
Página 32 de 45

RA_0502404

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

Etapa 2.10a: Comienzo de la detoxificación		Parámetros		Rangos operativos		FA246980	FA253589	FA254260	FA254931				
Adición de formaldehído	Duración de la adición de formaldehído (min.)	Duración para un flujo correspondiente de 100 ml/min.		16	17	16	17	12	13				
	Temperatura 1 (°C)	Min.	16 a 20							17,5	17,1	17,0	17,0
	Promedio	18,0	18,0							18,0	18,0	18,0	18,0
Temperatura 2 (°C)	Máx.	18,7	19,1	18,1	18,1	18,1	18,1	18,8					
Etapa 2.10a: Detoxificación	Min.	36 a 38		36,1	36,2	36,0	36,9	36,8	36,7				
	Promedio	37,3	37,1	37,0	36,9	37,0	37,0	37,0	37,0				
	Máx.	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,8	6,8	6,8				
Temperatura 3 (°C)	Min.	5 a 9		7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0				
	Promedio	8,8	8,9	8,8	8,9	8,5	8,9	8,5	9,0				
	Máx.	36,2	36,1	36,2	36,1	36,0	36,1	36,0	36,1				
Temperatura 4 (°C)	Min.	36 a 38		37,0	36,9	37,0	36,9	39,9	36,7				
	Promedio	37,2	37,1	37,2	37,1	37,1	37,1	37,1	37,0				
	Máx.												



[Signature]
 LUXANA MUNTEMLONE
 DIRECTORA TÉCNICA
 SANOFI PASTEUR S.A.
 CHRISTIAN DUMAS
 APODERADO
 SANOFI PASTEUR S.A.





4.1.2.5 Discusión y conclusiones

Los valores registrados para los parámetros de producción durante la elaboración de PTP (vea la Tabla 15 y la Tabla 16), para 4 lotes consecutivos, cumplen con los límites de los rangos operativos definidos anteriormente.

Los controles durante el proceso medidos cumplen también con los criterios de aceptación (vea la Tabla 17 y la Tabla 18).

Todos los resultados de control de calidad correspondientes a los lotes de PTP medidos al final de la etapa de detoxificación cumplen con los criterios de aceptación (vea la Tabla 19).

Además, los parámetros de producción que controlan la etapa crítica de detoxificación de la PTP por tratamiento con formaldehído (etapa 2.10a) se encuentran dentro de los rangos operativos (vea la Tabla 20).

En conclusión, el proceso de elaboración se considera validado.

4.1.3 Conclusión sobre la elaboración de la PTP

Todos los valores registrados para los parámetros de producción durante la fermentación del *Clostridium tetani*, desde la preparación del inóculo hasta la lisis celular y durante las etapas de purificación y detoxificación de la toxina tetánica, desde la toxina cruda hasta la proteína tetánica purificada, cumplieron con los rangos operativos definidos anteriormente.

Todos los controles de calidad de la proteína tetánica purificada medidos al final de la etapa 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 PTP. Además, el control durante el proceso realizado en la elaboración de la proteína tetánica también cumple con los criterios de aceptación.

En conclusión, el proceso de elaboración para producir la proteína tetánica purificada está validado, desde la preparación del inóculo hasta la etapa de detoxificación.





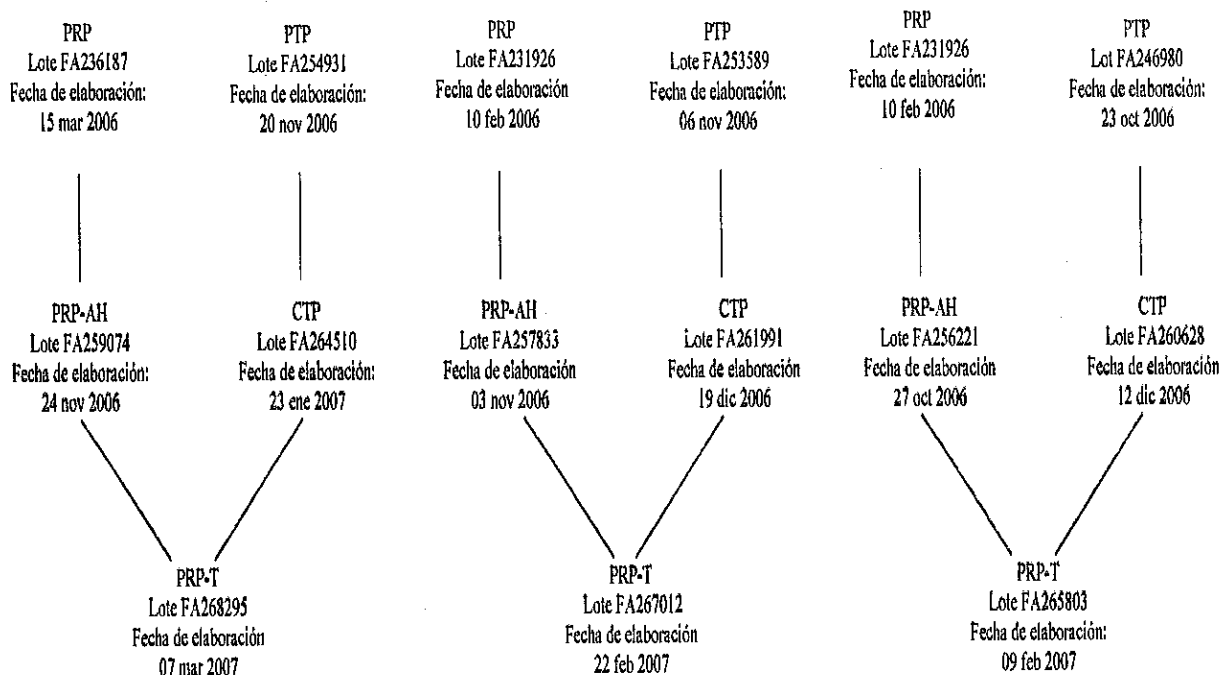
4.2 Validación del paso de concentración de la proteína tetánica purificada para obtener la proteína tetánica concentrada (CTP)

4.2.1 Introducción

Para validar la concentración de la proteína tetánica purificada (etapa 2.11), se produjeron 3 lotes consecutivos de proteína tetánica concentrada (FA260628, FA261991 y FA264510) según el proceso de elaboración descrito en 3.2.S.2.2 Reacciones de purificación y modificación.

La afiliación de estos lotes se presenta en la Figura 2.

Figura 2: Afiliación de seis lotes de uniformidad consecutivos de PRP-T

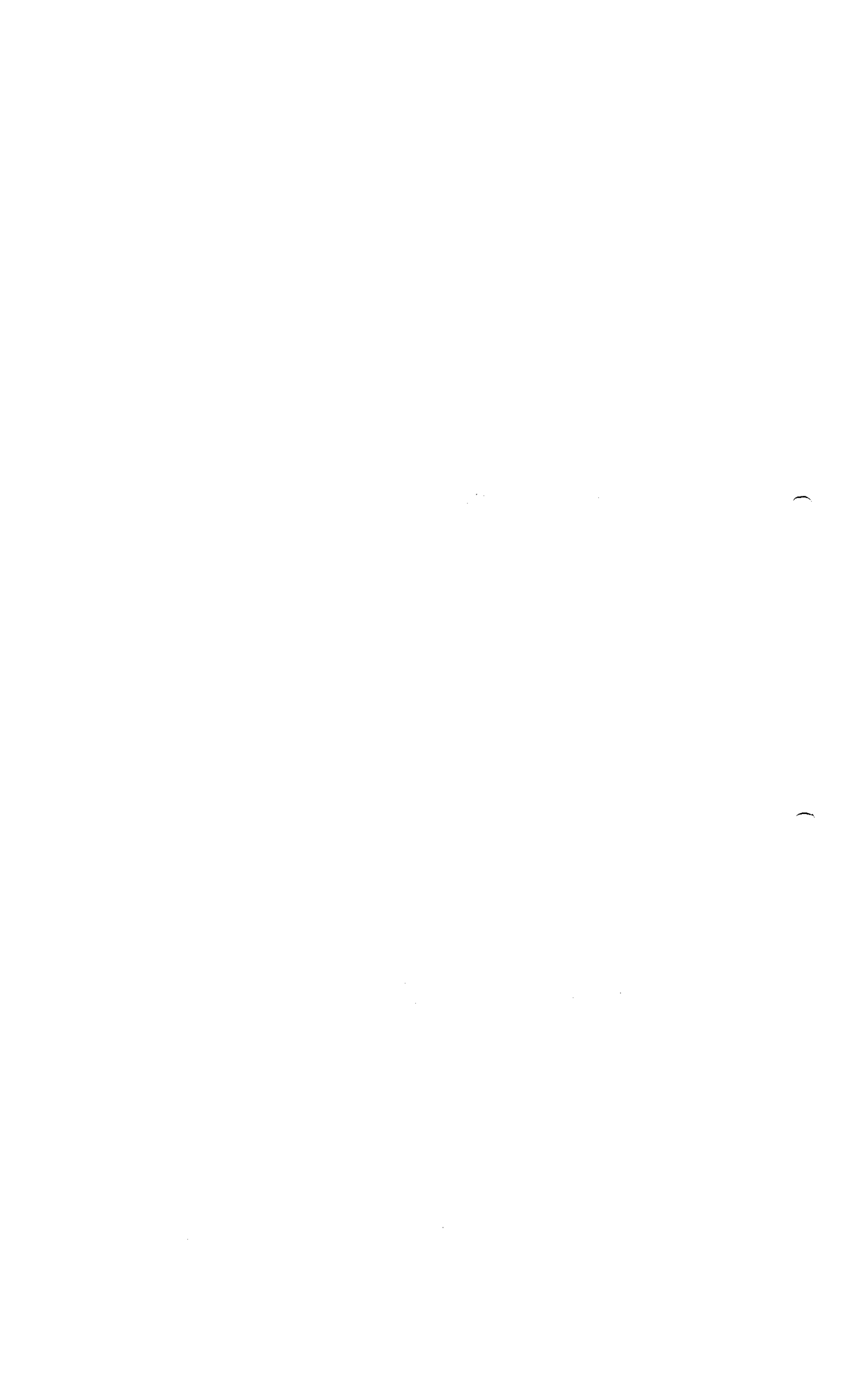


Los lotes de proteína tetánica concentrada (fin de la etapa 2.11) se analizaron de acuerdo con las especificaciones de liberación (vea la sección 3.2.S.2.4, Control de los pasos críticos e intermedios: Intermedio CTP).

4.2.2 Parámetros de producción

Los parámetros de producción registrados durante las etapas de concentración de la proteína tetánica (final de la etapa 2.10) se presentan en la Tabla 21.

Las características de la proteína tetánica concentrada se analizaron de acuerdo con las especificaciones de liberación (vea la sección 3.2.S.2.4, Control de los pasos críticos e





intermedios: Intermedio CTP) para evaluar la calidad de este producto intermedio. Todos los resultados cumplen con los criterios de aceptación.

4.2.3 Controles durante el proceso

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

4.2.4 Pasos críticos

No existen pasos críticos en esta etapa del proceso de elaboración.

4.2.5 Pruebas de control de calidad

Las características de la proteína tetánica concentrada se analizaron de acuerdo con las especificaciones de liberación (vea la sección 3.2.S.2.4, Control de los pasos críticos e intermedios: Intermedio CTP) para evaluar la calidad del producto intermedio. Todos los resultados cumplen con los criterios de aceptación.

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

Pasos de elaboración	Parámetros de producción	Rangos operativos
Etapa 2.11c: Filtración	Tiempo de homogeneización	1h00 a 4h05

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

Pruebas	Especificación	CTP FA260628 (PTP FA246980)	CTP FA261991 (PTP FA253598)	CTP FA264510 (PTP FA254931)
Nitrógeno proteico (mg/mL)	Para información	4,80	4,74	4,79
Índice DO ₂₈₀ /DO ₂₆₀	≥ 1,3	1,99	1,99	1,90
Contenido de fósforo (µg/mg de proteína)	< 1,5 µg/mg de proteína	< 0,04	< 0,04	< 0,04
Contenido de formaldehído libre residual (µg/mg de proteína)	< 10 µg/mg de proteína	0,58	0,8	0,71
Título de floculación (Lf/mL)	Para calcular la pureza antigénica	12 000	12 000	11 000
Pureza antigénica (Lf/mg)	> 1500 Lf/mg de nitrógeno proteico	2500	2532	2296
Distribución por tamaño molecular (HPLC),	> 50 % de monómeros	71,40	67,40	63,80

ROXANA MONTEMILONE
 DIRECTORA TÉCNICA
 SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINGUEZ
 APODERADO
 SANOFI PASTEUR S.A.



ANEXO
 FOLIO
 001683
 CTP FA 264510
 (PTP FA 264931)

Pruebas	Especificación	CTP FA260628 (PTP FA246980)	CTP FA261991 (PTP FA253598)	CTP FA 264510 (PTP FA 264931)
porcentaje de monómeros (%)				
Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica	Sin crecimiento microbiano	Cumple	Cumple	Cumple
Ausencia de toxina (toxicidad específica)	Ausencia de síntomas tetánicos y un mínimo del 80 % de supervivencia.	Cumple	Cumple	Cumple
Irreversibilidad del toxoide	Ausencia de síntomas tetánicos y un mínimo del 80 % de supervivencia.	Cumple	Cumple	Cumple
Prueba de pirógenos	Cumple con la Ph. Eur. (Δ temperatura $\leq 1,15^{\circ}\text{C}$ para la prueba en 3 conejos)	Conforme ($0,61^{\circ}\text{C}$)	Conforme ($0,08^{\circ}\text{C}$)	Conforme ($0,53^{\circ}\text{C}$)





5 Validación de la producción del granel de polisacárido de *Haemophilus* concentrado conjugado (PRP-T)

5.1 Introducción

Para validar la producción de polisacárido-AH de *Haemophilus* activado tipo b, 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.

Las características del polisacárido de *Haemophilus* conjugado-concentrado (fin de la etapa 3b) se analizaron de acuerdo con las especificaciones de liberación (vea la sección 3.2.S.4.1 Especificación). Además, la identificación del tétanos y el *Haemophilus* tipo b, al igual que el ensayo de irreversibilidad de la proteína tetánica, se efectuaron como parámetros de prueba adicionales sobre el principio activo final.

5.2 Parámetros de producción

Los parámetros de producción registrados durante la reacción de conjugación del polisacárido-AH de *Haemophilus* activado a la proteína tetánica concentrada se presentan en la Tabla 23. Todos los resultados cumplen con los rangos operativos. Los resultados se presentan en la Tabla 24.

5.3 Controles durante el proceso

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

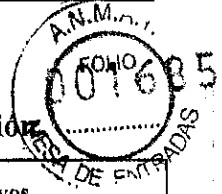


Tabla 23: Parámetros de producción registrados durante la reacción de conjugación

Pasos de elaboración	Parámetros de producción	Rangos operativos
Etapa 3a: Reacción de unión	Tiempo de homogeneización	De 1 a 80 min.
	Masa de EDAC	Masa objetivo $\pm 1,0$ mg
	Agua purificada para la dilución de EDAC	Volumen objetivo $\pm 0,7$ mL
	Volumen de EDAC	Volumen objetivo $\pm 0,7$ mL
	Temperatura de reacción	$+3,0^{\circ}\text{C}$ a $+5,0^{\circ}\text{C}$
	pH de reacción	5,6 a 5,8
	Tiempo de reacción	De 59,9 min. a 61,4 min.
Etapa 3b: Purificación	pH final de la reacción	6,9 a 7,0
	Tiempo del 1.º baño de NaCl	De 120 min. a 300 min.
	Tiempo del 2.º baño de NaCl	De 120 min. a 305 min.
	Tiempo del 3.º baño de NaCl	De 600 min. a 1130 min.





5.4 Pasos críticos


Además, los datos registrados sobre los parámetros de producción de la reacción de unión (etapa 3a) y purificación con gradiente de sacarosa (etapa 3b) se presentan en la Tabla 24, la Tabla 25 y la Tabla 26 que aparecen a continuación. Estos datos cumplen con los rangos operativos y confirman que estos pasos críticos están bajo control.

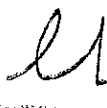
Los lotes se pueden dividir en varios sublotes para el proceso de conjugación. El nombre de estos sublotes consta del número de PRP-T y una letra, por ejemplo FA166625A, FA166625B, FA166625C, etc. Luego, los sublotes se agrupan para formar un lote de principio activo, por ejemplo FA166625.



Tabla 24: Datos de los parámetros de producción registrados durante los pasos críticos 3a y 3b = reacción de conjugación, lote FA202271

Pasos de elaboración	Parámetros de producción	Rangos operativos	FA202271 A	FA202271 B	FA202271 C	FA202271 D	FA202271 E
Etapa 3a: Reacción de unión	Tiempo de homogeneización	De 1 a 80 min.	16	11	9	4	16
	Tiempo de reacción	De 59,9 a 61,4 min.	60,0	60,2	60,3	60,5	60,0
	pH final de la reacción	6,9 a 7,0	6,95	6,95	6,95	6,95	6,95
Etapa 3b: Purificación	Tiempo del 1.º baño de NaCl	De 120 min a 300 min.	182	190	138	140	182
	Tiempo del 2.º baño de NaCl	De 120 min a 305 min.	200	200	155	145	200
	Tiempo del 3.º baño de NaCl	De 600 min a 1130 min.	820	825	770	765	820


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A


CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A


RA_0302404



Tabla 25: Datos de los parámetros de producción registrados durante las etapas críticas 3a y 3b = reacción de conjugación, lote FA202272

Pasos de elaboración	Parámetros de producción	Rangos operativos	FA202272 A	FA202272 B	FA202272 C	FA202272 D	FA202272 E
Etapa 3a: Reacción de unión	Tiempo de homogeneización	De a 80 min.	24	8	8	5	11
	Tiempo de reacción	De 59,9 a 61,4 min.	60,0	60,0	60,4	60,0	60,4
	pH final de la reacción	6,9 a 7,0	6,95	6,95	6,95	6,95	6,95
Etapa 3b: Purificación	Tiempo del 1.º baño de NaCl	De 120 min a 300 min.	140	160	135	120	120
	Tiempo del 2.º baño de NaCl	De 120 min a 305 min.	150	170	130	130	120
	Tiempo del 3.º baño de NaCl	De 600 min a 1130 min.	900	830	835	825	820


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.

RA_0302404

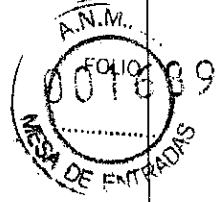


Tabla 26: Datos de los parámetros de producción registrados durante las etapas críticas 3a y 3b = reacción de conjugación, lote FA202273

Pasos de elaboración	Parámetros de producción	Rangos operativos	FA202273 A	FA202273 B	FA202273 C	FA202273 D	FA202273 E
Etapa 3a: Reacción de unión	Tiempo de homogeneización	De a 80 min.	17	13	8	8	5
	Tiempo de reacción	De 59,9 min a 61,4 min.	60,4	59,9	60,2	60,0	60,2
	pH final de la reacción	6,9 a 7,0	6,95	6,95	6,95	6,95	6,95
	Tiempo del 1.º baño de NaCl	De 120 min a 300 min.	158	150	135	120	130
Etapa 3b: Purificación	Tiempo del 2.º baño de NaCl	De 120 min a 305 min.	130	150	120	120	120
	Tiempo del 3.º baño de NaCl	De 600 min a 1130 min.	775	905	605	615	630


ROXANA MONTEMILOME
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A


CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
SECRETARIO
SANOFI PASTEUR S.A







5.5 Pruebas de control de calidad

Los resultados de control de calidad de PRP-T se presentan en la Tabla 27.

Todos los resultados cumplen con los criterios de aceptación.

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

Pruebas	Criterios de aceptación	PRP-T FA265803	PRP-T FA267012	PRP-T FA268295
Medición del pH	6,50-7,50	7,33	7,09	6,97
Contenido de fósforo	Para calcular el contenido de polisacárido (µg/ml)	16,5	17,0	17,4
Contenido de polisacárido	Para calcular la proporción proteína/polisacárido (µg/ml)	196,43	202,38	207,14
Contenido de sacarosa	Para calcular el excipiente en vacunas liofilizadas (g/L)	81,22	80,07	79,91
Proporción proteína/polisacárido	1,8 – 3,0	2,4	2,4	2,3
Contenido de EDAC residual*	< 10 µmol/L	< 10	< 10	< 10
Contenido de fenol residual*	< 1 µg/mL	< 1,00	< 1,00	< 1,00
Contenido de polisacárido libre	< 20%	< 4,1	< 4,1	< 3,8
Distribución por tamaño molecular; polisacárido eluido antes de K_D 0,20	$\geq 60\%^\dagger$	70	75	77
Distribución por tamaño molecular; coeficiente de partición K_D , radio hidrodinámico R_h y peso molecular M_w	$K_D \leq 0,37$ $R_h \geq 30$ nm $M_w \geq 4,2 \cdot 10^6$ Da	0,32 42 $9,2 \cdot 10^6$	0,26 43 $9,0 \cdot 10^6$	0,26 45 $9,3 \cdot 10^6$
Identificación del tétanos	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Identificación del <i>Haemophilus</i> tipo b	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Contenido de proteína tetánica libre	< 1%	< 1	< 1	< 1
Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica	Sin crecimiento microbiano	Cumple	Cumple	Cumple
Irreversibilidad del toxoide tetánico (diluido a 20 µg)	Ausencia de síntomas tetánicos y un mínimo del 80 % de supervivencia.	Cumple	Cumple	Cumple

* Método analítico válido en el momento de los análisis de lotes.

† Los criterios de aceptación para la distribución por tamaño molecular corresponden a los aplicados utilizando el método inicial mediante LPSEC antes de la variación.



6 Conclusión final

Los valores registrados para los parámetros de producción durante la producción del granel de polisacárido de *Haemophilus* conjugado concentrado (PRP-T) 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 de control de calidad correspondientes a por lo menos 3 lotes consecutivos de productos intermedios (polisacárido de *Haemophilus* tipo b, proteína tetánica purificada, proteína tetánica concentrada y polisacárido-AH de *Haemophilus* activado) y principio activo cumplen con las especificaciones de liberación en el momento del estudio de validación.

En conclusión, cada paso del proceso de elaboración del granel de polisacárido conjugado concentrado de *Haemophilus* está validado y bajo control.

