



4.2 Análisis de lote de los lotes de siembra maestro y de trabajo de *Clostridium tetani*

Los resultados de liberación obtenidos para el MSL 22.10.91 y para los WSL FA120573, FA121337 y FA123048 se presentan en la tabla 5. Todos los lotes cumplen con las especificaciones.

Tabla 5: Datos de control de calidad para *Clostridium tetani*

Controles	Criterios de aceptación	Resultados (fecha de elaboración)			
		MSL* 22 oct 1991	WSL FA123048 (17 feb 2002)	WSL FA229010 (20 dic 2005)	WSL FA356142 (22 jul 2009)
Prueba de pureza	Ausencia de contaminantes	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Prueba de identificación: Examen morfológico	Bacilos gram positivos	Bacilos gram positivos	Bacilos gram positivos	Bacilos gram positivos	Bacilos gram positivos
Características de crecimiento	Colonias transparentes y planas, con bordes irregulares y extensiones filamentosas	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Características bioquímicas:	Cumple	Cumple:	Cumple:	Cumple:	Cumple:
. Indol	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
. Identificación con el sistema API®	Perfil metabólico característico de <i>C. tetani</i>	Cumple†	Cumple‡	Cumple‡	Cumple‡

\* Se llevó a cabo la prueba de patogenicidad en el lote MSL 22.10.91 y se observó la muerte de cobayos con síntomas tetánicos.


† No se aplica. La prueba de identificación bioquímica se realizó utilizando el sistema VITEK®, que era el método vigente en el momento de la liberación del lote MSL.

‡ Los lotes WSL FA123048, FA229010 y FA356142 se liberaron utilizando el sistema VITEK®.

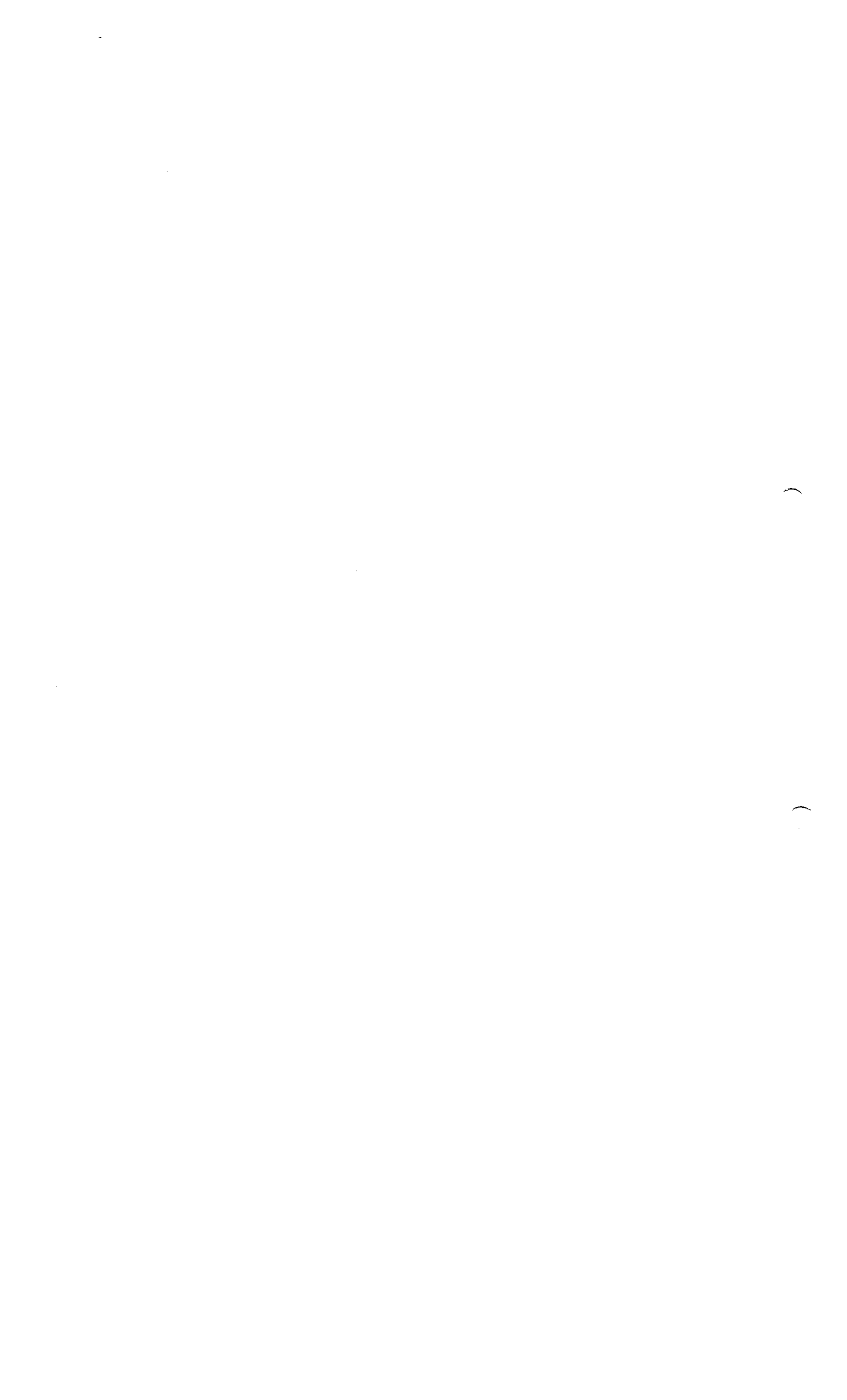


2.3.S.4

**Control del Principio Activo - PRP-T**

  
ROXANA MONTEMILONE  
DIRECTORA TÉCNICA  
SAMOI PASTEUR S.A.

  
CHRISTIAN DOMINGUEZ  
APODERADO  
SAMOI PASTEUR S.A.





## Sección 2.3.S.4 - Control del principio activo

### Índice

Lista de tablas .....	3
<b>1 Especificaciones .....</b>	<b>4</b>
<b>2 Procedimientos analíticos .....</b>	<b>5</b>
2.1 Contenido de fósforo.....	5
2.2 Distribución del tamaño molecular mediante HP-SEC .....	5
2.3 Contenido de polisacárido libre .....	6
2.4 Contenido de proteína tetánica libre .....	6
2.5 Pruebas de límite de EDAC y EDU residuales mediante electroforesis capilar de zona.....	6
2.6 Prueba de límite de fenol residual.....	6
2.7 Contenido de sacarosa por polarimetría.....	7
<b>3 Validación de los procedimientos analíticos .....</b>	<b>7</b>
3.1 Contenido de fósforo.....	7
3.2 Distribución del tamaño molecular mediante HP-SEC .....	7
3.3 Contenido de polisacárido libre .....	7
3.4 Contenido de proteína tetánica libre .....	7
3.5 Pruebas de límite de EDAC y EDU residuales mediante electroforesis capilar de zona.....	8
3.6 Prueba de límite de fenol residual.....	8
3.7 Contenido de sacarosa por polarimetría.....	8
<b>4 Análisis de lote .....</b>	<b>8</b>
4.1 Lotes de uniformidad utilizados en la elaboración del producto medicinal formulado optimizado .....	8
4.2 Lotes de producción actuales .....	9





<b>5</b>	<b>Justificación de las especificaciones</b> .....	<b>11</b>
5.1	Contenido de polisacárido.....	11
5.2	Proporción polisacárido/proteína.....	11
5.3	Distribución del tamaño molecular.....	11
5.4	Contenido de polisacárido libre.....	12
5.5	Contenido de proteína tetánica libre.....	12
5.6	Reactivos residuales.....	12
5.6.1	EDAC y EDU residuales.....	12
5.6.2	Fenol residual.....	12
5.7	Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica.....	13
5.8	Medición de pH.....	13
5.9	Contenido de sacarosa.....	13
5.10	Grupos funcionales que no hayan reaccionado.....	13

  
ROXANA MONTEMILONE  
DIRECTORA TÉCNICA  
SANOFI PASTEUR S.A.

  
CHRISTIAN DOMÍNGUEZ  
APODERADO  
SANOFI PASTEUR S.A.





## Lista de tablas

Tabla 1: Especificación del granel de polisacárido conjugado de <i>Haemophilus</i> tipo b .....	4
Tabla 2: Descripción de los lotes de PRP-T (lotes de uso clínico) .....	8
Tabla 3: Datos de análisis de los lotes de PRP-T (lotes de uso clínico).....	9
Tabla 4: Descripción de los lotes de PRP-T (lotes actuales de producción).....	10
Tabla 5: Datos de análisis de los lotes de PRP-T (lotes actuales de producción) .....	10



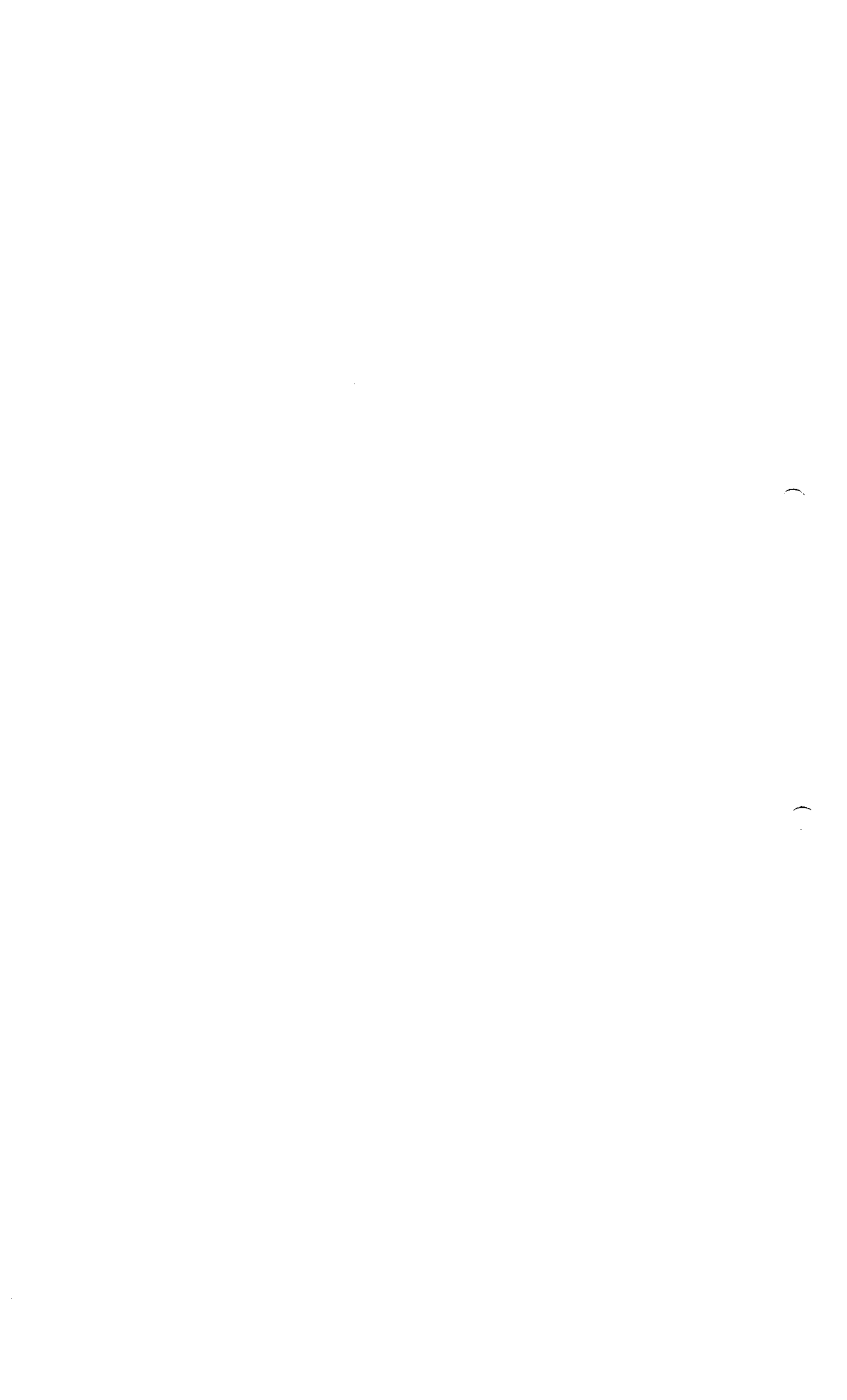
Lista de abreviaturas: consulte 2.3 Resumen global de calidad, Introducción.

## 1 Especificaciones

La lista de especificaciones del principio activo PRP-T se encuentra en la Tabla 1.

**Tabla 1: Especificación del granel de polisacárido conjugado de *Haemophilus* tipo b**

Pruebas	Requeridas por	Métodos	Criterios de aceptación
Contenido de fósforo	Ph. Eur. 1219, edición actual TRS 897	Según la Ph. Eur. 2.5.18, edición actual Medición del contenido de fósforo con el método de Chen en el PRP-T	Para calcular el contenido de polisacárido PRP-T
Contenido de polisacárido	Ph. Eur. 1219, edición actual TRS 897	Cálculo utilizando el contenido de fósforo del PRP-T	Para información El contenido de polisacárido PRP-T se utiliza para la formulación del producto final a granel
Proporción polisacárido/proteína  Contenido proteico (PRP-T dializado)  Contenido de polisacárido (PRP-T dializado)	Ph. Eur. 1219, edición actual TRS 897	Cálculo utilizando el contenido de fósforo y proteína en el PRP-T dializado Ph. Eur. 2.5.16, edición actual. Método de Lowry aplicado en el PRP-T dializado (para evitar interferencias). Cálculo utilizando el contenido de fósforo en el PRP-T dializado. Medición del contenido de fósforo con el método de Chen, basado en Ph. Eur. 2.5.18, edición actual.	0,33 a 0,55
Distribución del tamaño molecular; coeficiente de partición $K_D$ , radio hidrodinámico $R_h$ y peso molecular $M_w$	Ph. Eur. 1219, edición actual TRS 897	Ph. Eur. 2.2.30, edición actual y USP <621> cromatografía de exclusión por tamaño Cromatografía de exclusión por tamaño de alta presión con detección triple (refractómetro, viscosímetro y dispersión de la luz) y detección UV.	$K_D \leq 0,37$ $R_h \geq 30 \text{ nm}$ $M_w \geq 4,2 \cdot 10^6 \text{ Da}$
Contenido de polisacárido libre (PRP despolimerizado)	Ph. Eur. 1219 TRS 897	Ultracentrifugación y cromatografía	< 20%
Contenido de proteína tetánica libre	Ph. Eur. 1219 TRS 897	Ph. Eur. 2.2.31, edición actual Electroforesis (gradiente de gel de poliacrilamida)	< 1%
Prueba de límite de EDAC residual	Ph. Eur. 1219 TRS 897	Ph. Eur. 2.2.47, edición actual Electroforesis capilar de zona	<10 $\mu\text{mol/l}$
Prueba de límite de EDU residual	/		<10 $\mu\text{mol/l}$
Prueba de límite de fenol residual	Ph. Eur. 1219 TRS 897	Según la Ph. Eur. 2.5.15, edición actual, modificada para la prueba de límite Método colorimétrico	<1 $\mu\text{g/mL}$





Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica	Ph. Eur. 1219 TRS 897	Ph. Eur. 2.6.1, edición actual Filtración por membrana	Sin crecimiento microbiano
Medición de pH	/	Ph. Eur. 2.2.3, edición actual Determinación potenciométrica	6,5 a 7,5
Contenido de sacarosa	/	Ph. Eur. 2.2.7, edición actual Polarimetría (rotación óptica)	Para información

## 2 Procedimientos analíticos

Los métodos de las pruebas de contenido proteico (empleado para calcular la proporción polisacárido/proteína), pH y esterilidad se realizan conforme a la Ph. Eur. Para calcular el contenido de polisacárido y la proporción polisacárido/proteína, se determina el contenido de polisacárido utilizando el contenido de fósforo del PRP-T. A continuación se incluye un resumen de los procedimientos analíticos de los métodos que no se detallan/no se describen en la Ph. Eur.

### 2.1 Contenido de fósforo

El contenido de fósforo se mide utilizando el método de Chen (Chen P.S., Microdeterminación del fósforo, Anal. Chem., 1956, 28, 1756-1758) y sobre la base del método de la Ph. Eur. 2.5.18. "Phosphorus in polysaccharide vaccines" para la etapa de mineralización a fin de evitar una reacción de Maillard. Se mineraliza el fósforo en fosfato en presencia de ácido caliente. El fosfato y el molibdato de amonio forman un complejo fosfomolibdico que, cuando se reduce, desarrolla un color azul. Esta coloración luego se mide mediante espectrofotometría a 825 nm.

### 2.2 Distribución del tamaño molecular mediante HP-SEC

La determinación del tamaño molecular del PRP-T se basa en la separación de partículas mediante la cromatografía líquida de exclusión por tamaño de alta resolución (HP-SEC) de acuerdo con su tamaño y también se basa en el análisis por detección triple (refractómetro, viscosímetro, detector de dispersión de luz).

Se eluye una muestra inyectada a través de un gel poroso bajo presión. Las moléculas de mayor tamaño que los poros de gel más grandes no pueden penetrar el gel y permanecen en la fase de circulación móvil. Estas moléculas son las primeras en abandonar la columna. Las moléculas más pequeñas se difunden en los poros del gel con mayor o menor rapidez, según su tamaño y forma, y abandonan la columna en orden descendente del peso molecular.

Las moléculas separadas luego se someten a un análisis triple, con un viscosímetro, un detector de dispersión de luz a bajo ángulo (LALS) y un refractómetro que permite calcular su peso molecular (Mw) y radio hidrodinámico (Rh). La respuesta del refractómetro es proporcional a la concentración, la respuesta del detector de dispersión de luz (LS) es proporcional a la concentración y al peso molecular, y la respuesta del viscosímetro (DP) es proporcional a la viscosidad intrínseca ( $\eta$ ) y a la concentración. El tamaño molecular se determina en base a las respuestas de viscosidad, de dispersión de luz y del refractómetro.





El resultado se expresa como  $K_D$  (coeficiente de distribución), Mw (Dalton) y Rh (nm).

Se utiliza un detector UV equipado con un detector triple para determinar el volumen ( $V_0$ ) del conjunto de columnas mediante análisis de ADN y para obtener información sobre la cantidad de proteínas presentes en la muestra.

### 2.3 Contenido de polisacárido libre

Esta prueba permite determinar el porcentaje de PRP despolimerizado en un preparado de PRP-T. El porcentaje del contenido de polisacárido libre es la proporción del PRP despolimerizado con el PRP total. Para esta prueba, el PRP despolimerizado se separa del PRP conjugado con peso molecular alto por ultracentrifugación y se recupera en el sobrenadante. El PRP contenido en cada una de las dos fracciones luego se hidroliza para formar el disacárido fosfato de ribosil-ribitol con hidróxido de sodio 1,5 M. Se realiza con los hidrolizados una filtración por membrana (corte a 10 kDa) para eliminar las proteínas y luego se analiza mediante cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD).

### 2.4 Contenido de proteína tetánica libre

Esta prueba se basa en la Ph. Eur. 2.2 "Physical and Physicochemical methods", 2.2.31 "Electrophoresis" y en la monografía 1219. Se lleva a cabo una electroforesis en geles de poliacrilamida con gradiente lineal (de 8 a 18%) en la presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS). El porcentaje del contenido de proteína tetánica libre en relación con el contenido de proteína tetánica total se calcula comparando la intensidad de la banda de proteína tetánica libre en la muestra (después de la tinción del gel) con la intensidad de la banda del rango de calibración.

### 2.5 Pruebas de límite de EDAC y EDU residuales mediante electroforesis capilar de zona

Durante el proceso de elaboración, el polisacárido PRP se conjuga con la proteína tetánica mediante el agente de conjugación EDAC [1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida]. Cuando se encuentra en solución, este agente se degrada rápidamente y forma 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) urea (EDU), a temperatura ambiente. Estos compuestos pueden detectarse mediante electroforesis capilar de zona, un método que permite separar las moléculas mediante migración diferencial en un campo eléctrico en función de la proporción carga/masa. Las moléculas se detectan directamente en los capilares mediante espectrofotometría UV a 200 nm. Las áreas de picos detectados son directamente proporcionales a la cantidad de EDAC y EDU.

### 2.6 Prueba de límite de fenol residual

La prueba de límite de fenol residual se lleva a cabo conforme a la Ph. Eur. 2.5.15 "Fenol en sueros inmunológicos y vacunas" con algunas adaptaciones del método. Con 4-aminoantipirina y ferrocianuro de potasio, los fenoles producen un color rojo cuya intensidad, medida con un espectrofotómetro a 546 nm, es proporcional a la concentración.





## 2.7 Contenido de sacarosa por polarimetría

Esta prueba se realiza conforme a la Ph. Eur. 2.2.7 "Rotación óptica" con algunas adaptaciones del método. Se utiliza un polarímetro para medir la rotación óptica de la muestra de prueba. La concentración de sacarosa se calcula en conjunción con la rotación óptica de una solución de sacarosa de referencia.

## 3 Validación de los procedimientos analíticos

Se proporcionan resúmenes de validación para las pruebas que no se describen en la Ph. Eur.

### 3.1 Contenido de fósforo

El contenido de fósforo se validó en cuanto a su especificidad, linealidad, exactitud y precisión. El estudio indicó que el método es válido para el contenido de fósforo de la solución de PRP-T, así como el PRP-T dializado (tal como se aplica al determinar la proporción polisacárido/proteína).

### 3.2 Distribución del tamaño molecular mediante HP-SEC

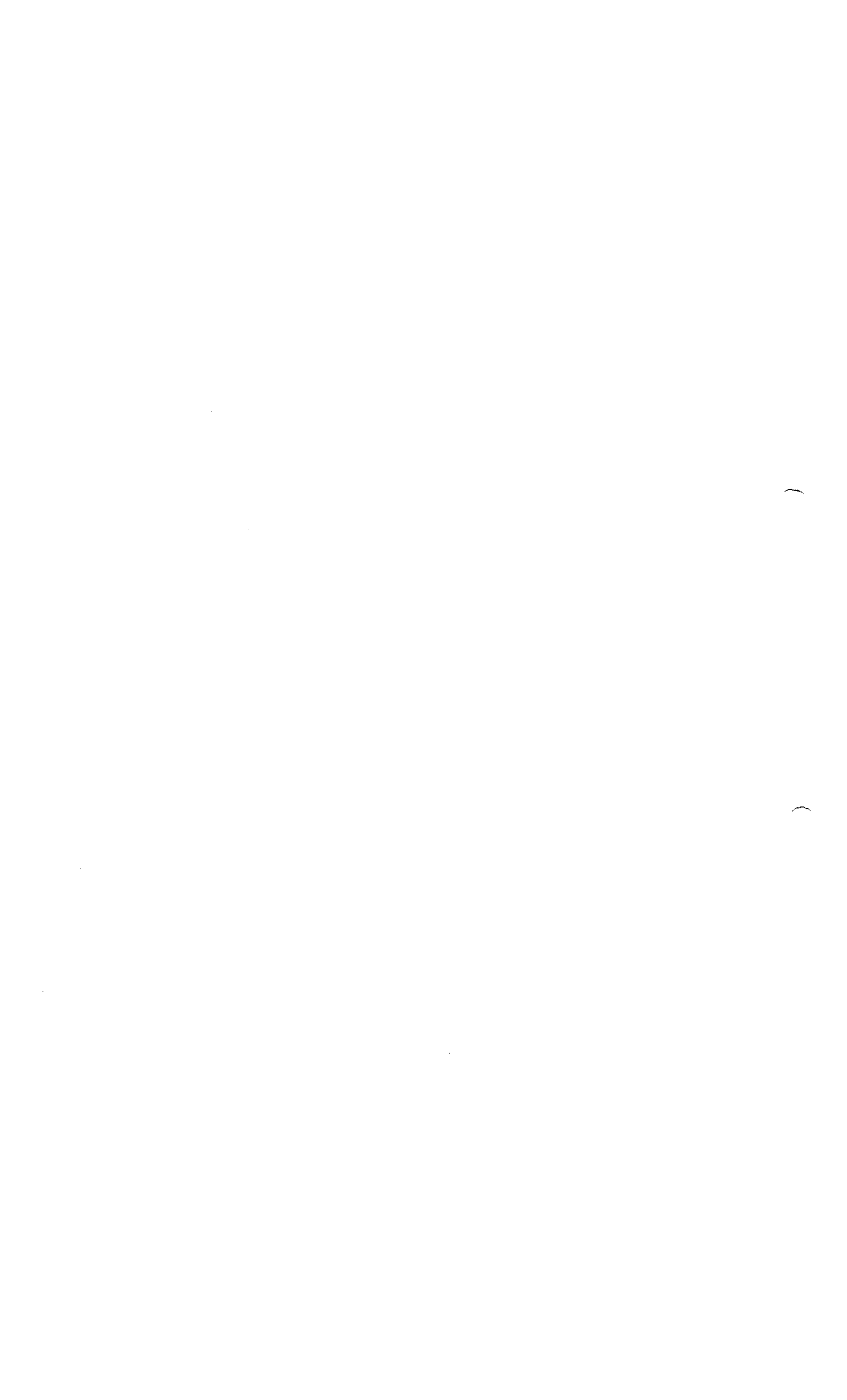
El método HP-SEC para determinar la distribución del tamaño molecular en el PRP-T (coeficiente de partición  $K_D$ , peso molecular  $M_w$  y radio hidrodinámico  $R_h$ ) se validó en cuanto a la precisión (repetibilidad y precisión intermedia), dado que la prueba corresponde a una medición física. El estudio indicó que el método es válido para determinar la distribución del tamaño molecular del PRP-T.

### 3.3 Contenido de polisacárido libre

La determinación del contenido de polisacárido libre (PRP despolimerizado) mediante ultracentrifugación y cuantificación por HPAEC-PAD se validó en cuanto a su especificidad, linealidad, exactitud, precisión y límite de cuantificación (dado que es un ensayo cuantitativo). El estudio mostró que el método es válido para determinar el porcentaje de contenido de PRP no conjugado.

### 3.4 Contenido de proteína tetánica libre

Para las pruebas de rutina se trazan dos curvas estándar de proteína tetánica (una con PRP-T y la otra con el tampón de dilución). Los dos perfiles de electroforesis obtenidos se comparan y deben ser idénticos (el PRP-T no debe modificar la migración de la proteína tetánica). Además, en el uso de rutina, se verifica que la prueba tenga la sensibilidad suficiente para revelar una contaminación del 1%, según lo recomendado en la monografía 1219 de la Ph. Eur. La verificación de estos dos aspectos permite considerar que el método está validado para su uso de rutina.



### 3.5 Pruebas de límite de EDAC y EDU residuales mediante electroforesis capilar de zona

El método de electroforesis capilar para determinar la EDAC y la EDU residuales en el PRP-T se validó en cuanto a su especificidad y al límite inferior de detección (ya que se trata de una prueba de límite). El estudio indicó que el método es válido como prueba de límite de EDAC y EDU residuales.

### 3.6 Prueba de límite de fenol residual

El método de calorimetría para la prueba de límite de fenol residual se validó en cuanto al límite inferior de detección. El contenido de fenol se determina mediante colorimetría después de la reacción con 4-aminoantipirina y ferrocianuro de potasio, y la medición por espectrofotometría a 546 nm. Dado que la absorción en esta longitud de onda no es específica para ese complejo de color, y que no se puede encontrar el PRP-T sin la presencia de fenol, no se puede evaluar la especificidad del ensayo. El estudio indicó que el método es válido como prueba de límite del fenol residual.

### 3.7 Contenido de sacarosa por polarimetría

El método de polarimetría para determinar el contenido de sacarosa se validó en cuanto a su especificidad, linealidad, exactitud y precisión (dado que es un ensayo cuantitativo). El estudio indicó que el método es válido para determinar el contenido de sacarosa del PRP-T.

## 4 Análisis de lote

### 4.1 Lotes de uniformidad utilizados en la elaboración del producto medicinal formulado optimizado

En la Tabla 2 se presenta la descripción de tres lotes de PRP-T y los resultados de los análisis de lote se presentan en la Tabla 3. Estos lotes se utilizaron en la producción de la formulación optimizada del producto medicinal y se eligieron al azar para ser usados en estudios clínicos; son representativos de los lotes destinados a comercialización.

Tabla 2: Descripción de los lotes de PRP-T (lotes de uso clínico)

Número de lote	Tamaño del lote (mL)	Fecha de elaboración	Planta de producción	Uso del lote
FA316432	27 345	13 junio 2008	Marcy l'Étoile	Producción
FA328210	22 517	22 oct 2008	Marcy l'Étoile	Producción
FA328213	30 798	23 oct 2008	Marcy l'Étoile	Producción



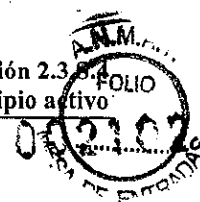


Tabla 3: Datos de análisis de los lotes de PRP-T (lotes de uso clínico)

Pruebas	Criterios de aceptación	FA316432	FA328210	FA328213
Contenido de fósforo	Para calcular el contenido de polisacárido PRP-T (µg/mL)	15,5	16,8	20,1
Contenido de polisacárido	Para información; el contenido de polisacárido PRP-T se utiliza para la formulación del producto final a granel (µg/mL)	184,52	200,00	207,14
Proporción polisacárido/proteína	0,33 – 0,55	0,38	0,44	0,45
Distribución del tamaño molecular*: - LP-SEC: polisacárido eluido antes de K <sub>D</sub> 0,20 (método inicial)	≥ 60%†	62,3	76,7	76,5
Contenido de polisacárido libre (PRP despolimerizado)	<20%	<4	<4	<4,2
Contenido de proteína tetánica libre	<1%	<1	<1	<1
Contenido de EDAC residual mediante colorimetría (método inicial)*	<10 µmol/l	<10	<10	<10
Contenido de fenol residual mediante colorimetría (método inicial)*	<1 µg/mL	<1	<1	<1
Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica	Sin crecimiento microbiano	Conforme	Conforme	Conforme
Medición de pH	6,5-7,5	7,08	7,02	7,09
Contenido de sacarosa	Para información (g/l)	81,39	84,18	86,31

\* Estas pruebas eran los métodos analíticos de liberación usados en el momento de analizarse estos lotes (empleados asimismo dentro del marco de los estudios de estabilidad) y se presentan en la sección 3.2.S.7.3 Datos de estabilidad.

† El criterio de aceptación era el que estaba vigente al momento de realizarse los análisis.

#### 4.2 Lotes de producción actuales

En la Tabla 4 se presenta la descripción de tres lotes industriales actuales de PRP-T y los resultados de los análisis de lote se presentan en la Tabla 5. Estos lotes se eligieron al azar y son representativos de los lotes destinados a la comercialización.

ROXANA MONTEMILONE  
DIRECTORA TÉCNICA  
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINGUEZ  
APODERADO  
SANOFI PASTEUR S.A.



Tabla 4: Descripción de los lotes de PRP-T (lotes actuales de producción)

Número de lote	Tamaño del lote (mL)	Fecha de elaboración	Planta de producción	Uso del lote
FA381843*	36 815	10 mar 2010	Marcy l'Étoile	Producción
FA382491	36 053	19 mar 2010	Marcy l'Étoile	Producción
FA384370	33 721	01 abril 2010	Marcy l'Étoile	Producción

\* Este lote de PRP-T se elaboró a partir del nuevo lote MSL FA340193.

Tabla 5: Datos de análisis de los lotes de PRP-T (lotes actuales de producción)

Pruebas	Criterios de aceptación	FA381843*	FA382491	FA384370
Contenido de fósforo	Para calcular el contenido de polisacárido PRP-T ( $\mu\text{g/mL}$ )	19,0	20,6	22,7
Contenido de polisacárido	Para información; el contenido de polisacárido PRP-T se utiliza para la formulación del producto final a granel ( $\mu\text{g/mL}$ )	226,19	245,24	270,24
Proporción polisacárido/proteína	0,33 – 0,55	0,41	0,41	0,45
Distribución del tamaño molecular; coeficiente de partición $K_D$ , radio hidrodinámico $R_h$ y peso molecular $M_w$	$K_D \leq 0,37$ $R_h \geq 30 \text{ nm}$ $M_w \geq 4,2 \cdot 10^6 \text{ Da}$	0,29 39 $8,5 \cdot 10^6$	0,25 47 $11,4 \cdot 10^6$	0,29 40 $8,0 \cdot 10^6$
Contenido de polisacárido libre (PRP despolimerizado)	<20%	<3,7	<3,2	3,3
Contenido de proteína tetánica libre	<1%	<1	<1	<1
Prueba de límite de EDAC residual	<10 $\mu\text{mol/l}$	<10	<10	<10
Prueba de límite de EDU residual	<10 $\mu\text{mol/l}$	<10	<10	<10
Prueba de límite de fenol residual	<1 $\mu\text{g/mL}$	<1	<1	<1
Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica	Sin crecimiento microbiano	Conforme	Conforme	Conforme
Medición de pH	6,5-7,5	7,06	7,07	7,09
Contenido de sacarosa	Para información (g/l)	82,97	84,27	83,07

\* Este lote de PRP-T se elaboró a partir del nuevo lote MSL FA340193.





## 5 Justificación de las especificaciones

La justificación de las especificaciones (tal como se describe en la Tabla 1) se resume a continuación.

### 5.1 Contenido de polisacárido

Según la monografía 1219 de la Ph. Eur., el contenido de polisacárido se determina utilizando el contenido de fósforo de la solución de PRP-T. El contenido de fósforo se utiliza porque es un elemento constitutivo del polisacárido PRP, de contenido teórico conocido en el PRP (8,4%).

El contenido de polisacárido de la solución de PRP-T se determina mediante un cálculo utilizando tanto el contenido de fósforo teórico como el medido. Se utiliza en la etapa de mezcla del producto medicinal, a fin de obtener un contenido de polisacárido adecuado en el producto terminado.

### 5.2 Proporción polisacárido/proteína

Como se indica en la monografía 1219 de la Ph. Eur., se determina la proporción entre el contenido de polisacárido y el contenido proteico, partiendo del contenido proteico y de fósforo en el PRP-T dializado. La proporción polisacárido/proteína es un marcador de conjugación adecuado que se utiliza para cuantificar el alcance de la reacción covalente del polisacárido con la proteína tetánica.

Los criterios de aceptación para la proporción polisacárido/proteína cumplen con los requisitos de la Ph. Eur. 1219 que utilizan la proteína tetánica para el conjugado PRP-T y son más restrictivos que la monografía 1219 de la Ph. Eur. (0,30 – 0,55). La proporción histórica se calculó expresando la proporción proteína/polisacárido, con los criterios de aceptación 1,8 – 3,0. Para expresar esta proporción conforme a la monografía 1219 de la Ph. Eur. y mantener límites similares a los anteriores, se utilizaron los criterios de aceptación 1,8 – 3,0 inversos (correspondientes a 0,33 – 0,55).

### 5.3 Distribución del tamaño molecular

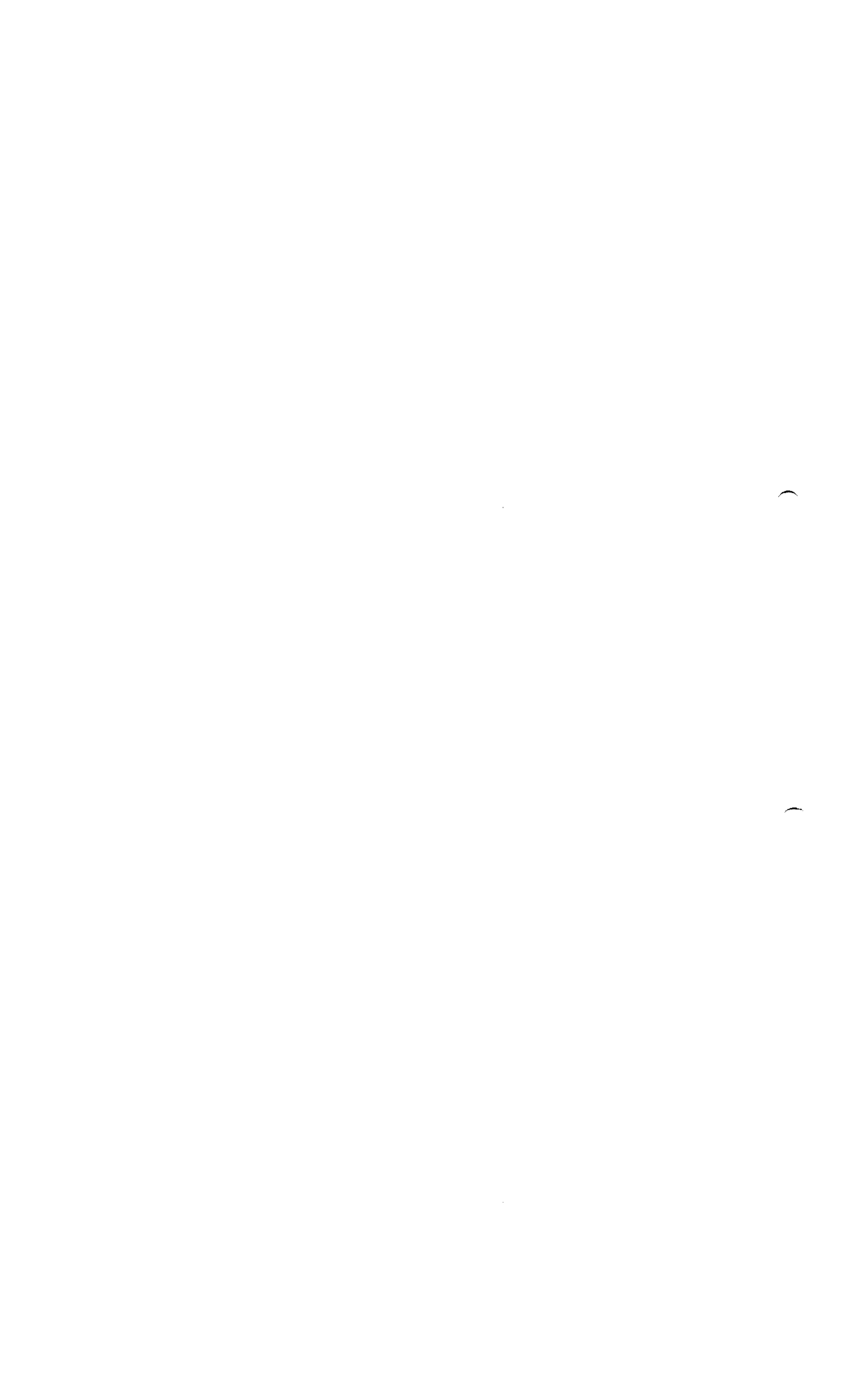
La distribución del tamaño molecular del conjugado polisacárido-proteína es un parámetro importante de calidad para el granel de polisacárido de *Haemophilus* tipo b conjugado. La distribución del tamaño molecular se evalúa midiendo el coeficiente de partición, el peso molecular y el radio hidrodinámico del polisacárido mediante cromatografía de exclusión por tamaño (2.2.30) según lo indica la Ph. Eur. 1219. El método aplicado corresponde a la cromatografía de exclusión por tamaño de alta presión.

Los criterios de aceptación inicial estaban relacionados con el método inicial (porcentaje de polisacárido eluido antes de  $K_D$  0,20 superior o igual al 60%, determinado mediante LP-SEC y el contenido de fósforo), conforme a la Ph. Eur. 1219.

El método actual (que utiliza la técnica HP-SEC) corresponde a una técnica más reciente, recomendada como una alternativa a la cromatografía de baja presión para la prueba de distribución del tamaño molecular en la monografía 1219 de la Ph. Eur. "Vacuna conjugada









Los lotes para estudios clínicos se liberaron utilizando el método colorimétrico cuantitativo. El método actual es una prueba de límite.

### 5.7 Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica

La especificación cumple con los requisitos de la Ph. Eur. 1219.

### 5.8 Medición de pH

Los criterios de aceptación se determinaron para obtener un pH neutro tras la conjugación del PRP-T.

### 5.9 Contenido de sacarosa

Si bien la Ph. Eur. no requiere realizar esta prueba, el contenido de sacarosa se determina a fin de hacer un seguimiento de la uniformidad del proceso de elaboración.

### 5.10 Grupos funcionales que no hayan reaccionado

La prueba de grupos funcionales que no hayan reaccionado no se realiza como prueba de liberación del principio activo PRP-T, dado que no tienen que neutralizarse grupos funcionales en la etapa de conjugación.

El conjugado de *Haemophilus* tipo b se elabora mediante la unión covalente del polisacárido de *Haemophilus* tipo b con la proteína tetánica concentrada (CTP), en las dos etapas siguientes:

- Activación del polisacárido de *Haemophilus* tipo b: el polisacárido se activa con bromuro de cianógeno y reacciona con dihidrazida de ácido adípico. De esta manera, se obtiene el polisacárido-AH de *Haemophilus* activado (PRP-AH). Este polisacárido contiene alrededor de 4 unidades de hidrazida de ácido adípico cada 100 unidades de repetición de polisacárido.
- La CTP se une mediante unión covalente con el PRP-AH a través de una condensación mediada por carbodiimida utilizando 1-etil-3-(dimetilaminopropil) carbodiimida: de este modo, se obtiene el granel de polisacárido conjugado de *Haemophilus* tipo b (PRP-T).

Luego de cada una de estas dos etapas, se eliminan los subproductos de bajo peso molecular; además, la etapa de conjugación incluye un proceso de purificación específico para el conjugado (ultracentrifugación en un gradiente de sacarosa).

Los grupos funcionales introducidos en el polisacárido antes de la reacción de conjugación son los grupos amino de la hidrazida de ácido adípico que se condensarán con los grupos carboxilo de la proteína tetánica. Estos grupos amino, por definición, no son funcionales *per se* y por lo tanto no necesitan ser neutralizados mediante ninguna reacción química complementaria.

En la etapa de conjugación, la 1-etil-3-(dimetilaminopropil) carbodiimida reacciona con los grupos carboxilo de la proteína para formar intermedios reactivos de O-acilisourea, los cuales se combinarán con los grupos amino del polisacárido-AH para formar uniones estables amida. Los intermedios de O-acilisourea son inestables y se hidrolizan para regenerar los grupos carboxilo si

