



### 5.3 Fosfato disódico

Composición cualitativa

- Fosfato disódico,  $12H_2O$
- Agua purificada

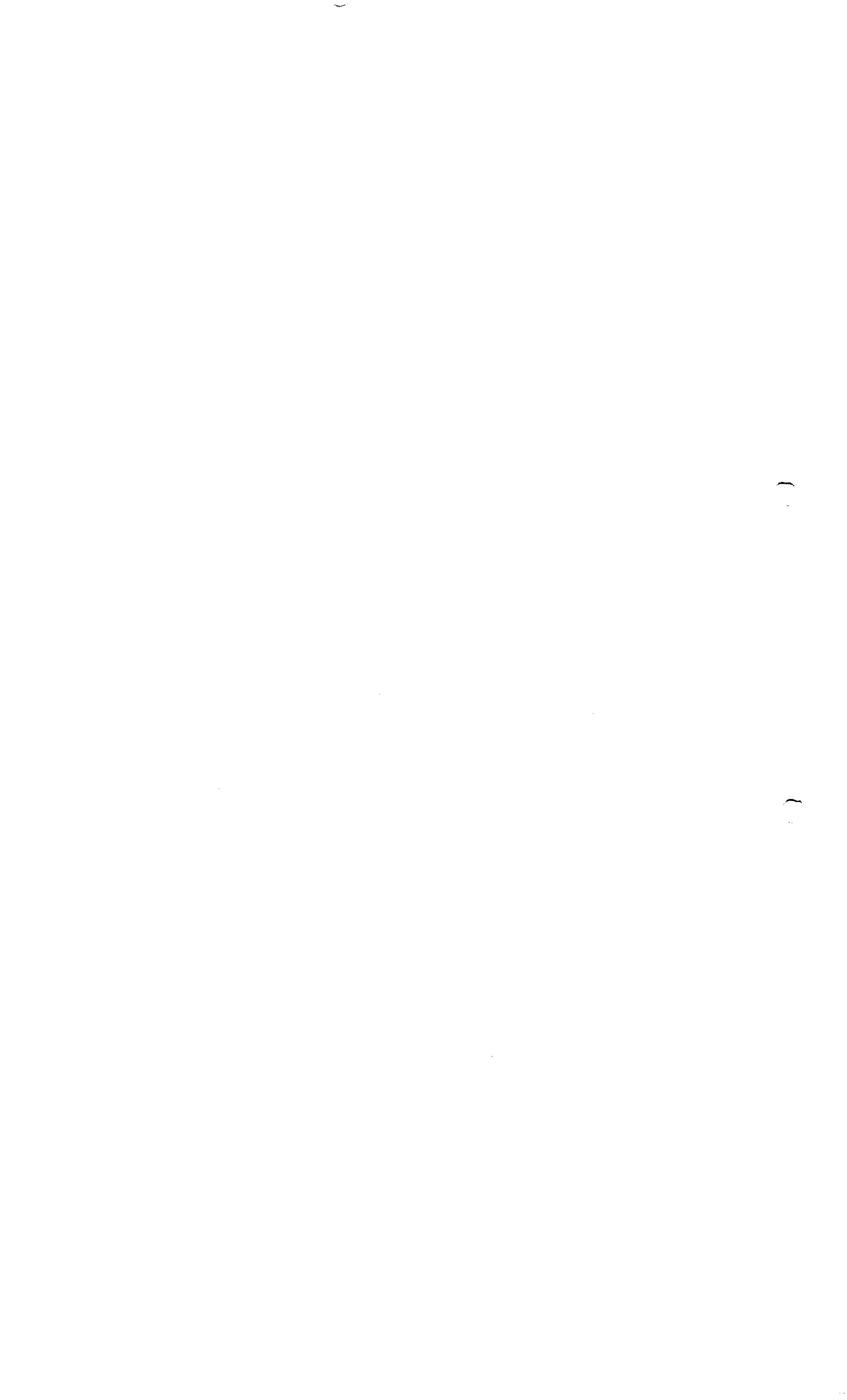
Esta solución se filtra en una membrana de  $0,2 \mu m$ .

### 5.4 Otros

- Agua purificada
- Solución de carbonato ácido de hidrógeno

La fórmula de esta solución depende del volumen y del título de floculación del toxoide tetánico concentrado y dializado obtenido después del paso de diálisis.


- Carbonato ácido de hidrógeno
- Agua purificada
- Formaldehído al 37 % p/v
- Sulfato de amonio






### 3.2.S.2.4

### Control de los Pasos Críticos e Intermedios - Tetánico

  
ROXANA MONTEMILONE  
DIRECTORA TÉCNICA  
SANOPI PASTEUR S.A.

  
CHRISTIAN DOMINGUEZ  
APODERADO  
SANOPI PASTEUR S.A.

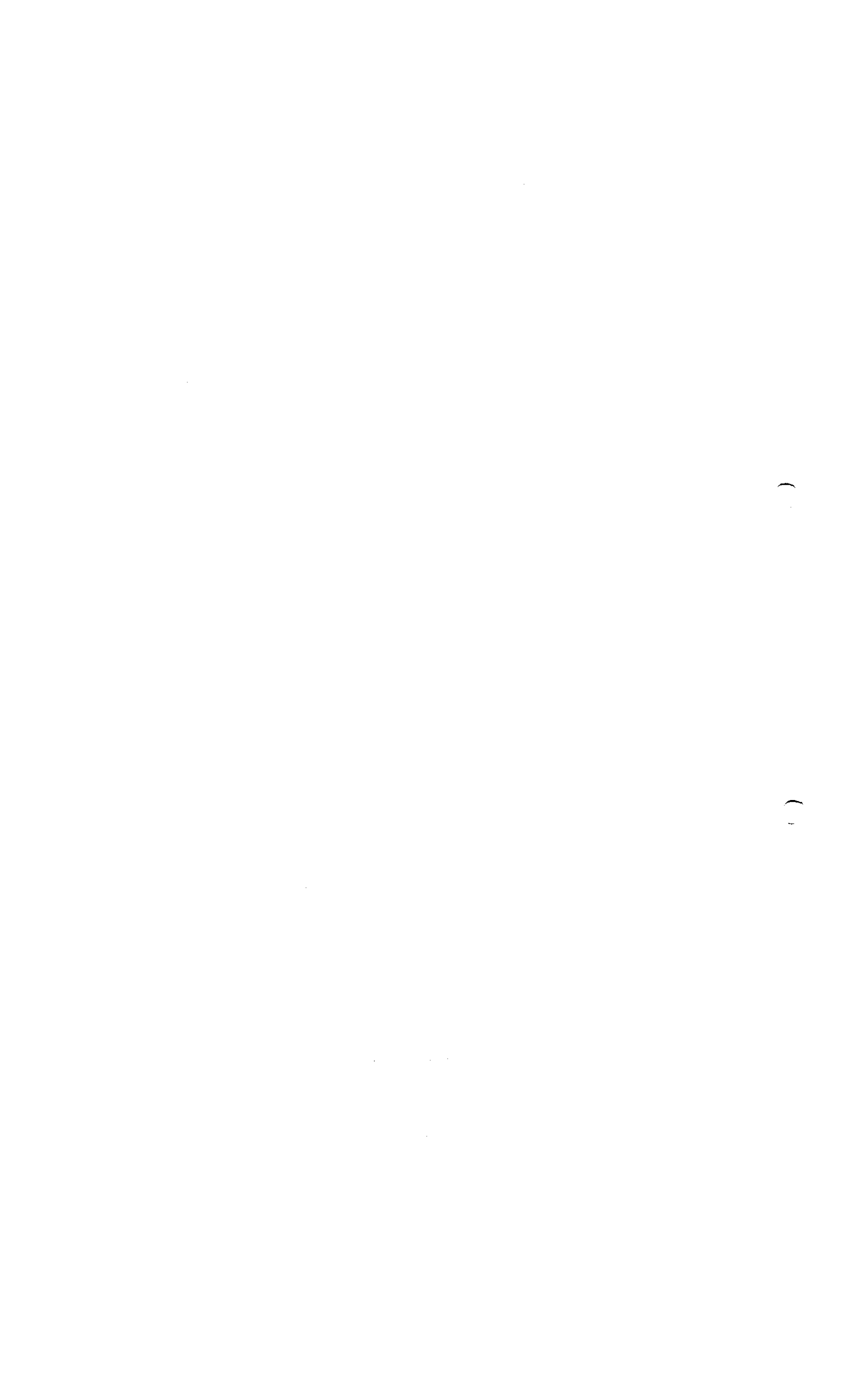




## Sección 3.2.S.2.4 Control de los pasos críticos e intermedios

### Índice

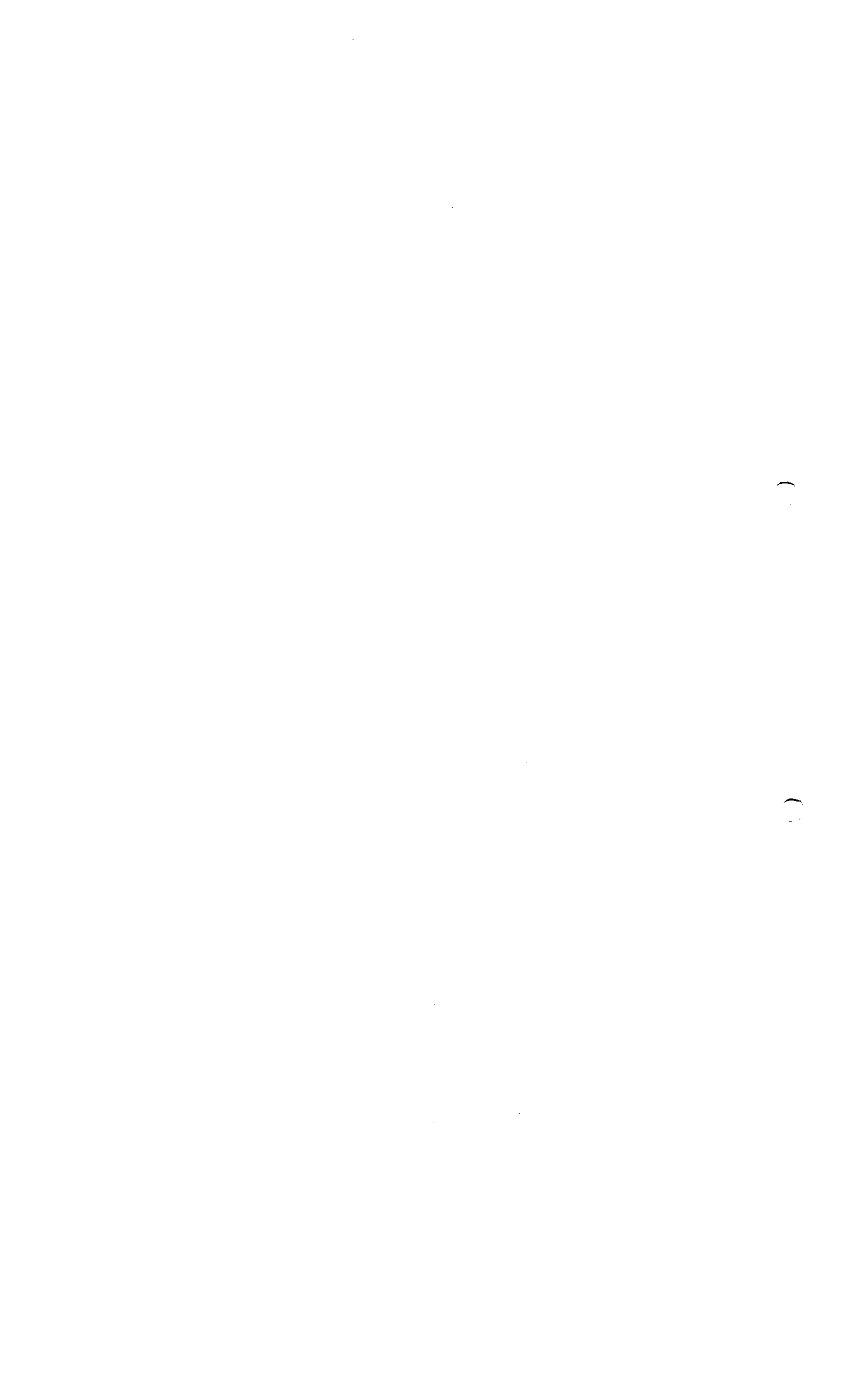
1	Etapas críticas.....	3
2	Productos intermedios .....	5
2.1	Sistema de cierre del envase .....	5
2.2	Estabilidad.....	5
2.2.1	Resumen y conclusiones de estabilidad.....	5
2.2.1.1	Protocolo del estudio.....	5
2.2.1.2	Diseño del estudio.....	6
2.2.1.3	Selección y especificaciones de las pruebas .....	6
2.2.1.4	Discusiones .....	7
2.2.1.5	Conclusión.....	9
2.2.2	Datos de estabilidad.....	9





## Lista de tablas

Tabla 1: Pasos críticos del proceso de elaboración del PTT .....	4
Tabla 2: Panorama general del estudio de estabilidad del CTT .....	5
Tabla 3: Información general del producto de los lotes de CTT .....	6
Tabla 4: Resultados de estabilidad de los lotes de CTT FA137632, FA140067 y FA140070 a + 5 °C ± 3 °C .....	8
Tabla 5: Resultados de estabilidad para el CTT conservado a + 5 °C ± 3 °C: lote FA109141 .....	10
Tabla 6: Resultados de estabilidad para el CTT conservado a + 5 °C ± 3 °C: lote FA109142 .....	11
Tabla 7: Resultados de estabilidad para el CTT conservado a + 5 °C ± 3 °C: lote FA109143 .....	12





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

## 1 Etapas críticas

El principio activo, toxoide tetánico purificado (PTT), es una toxina tetánica detoxificada.

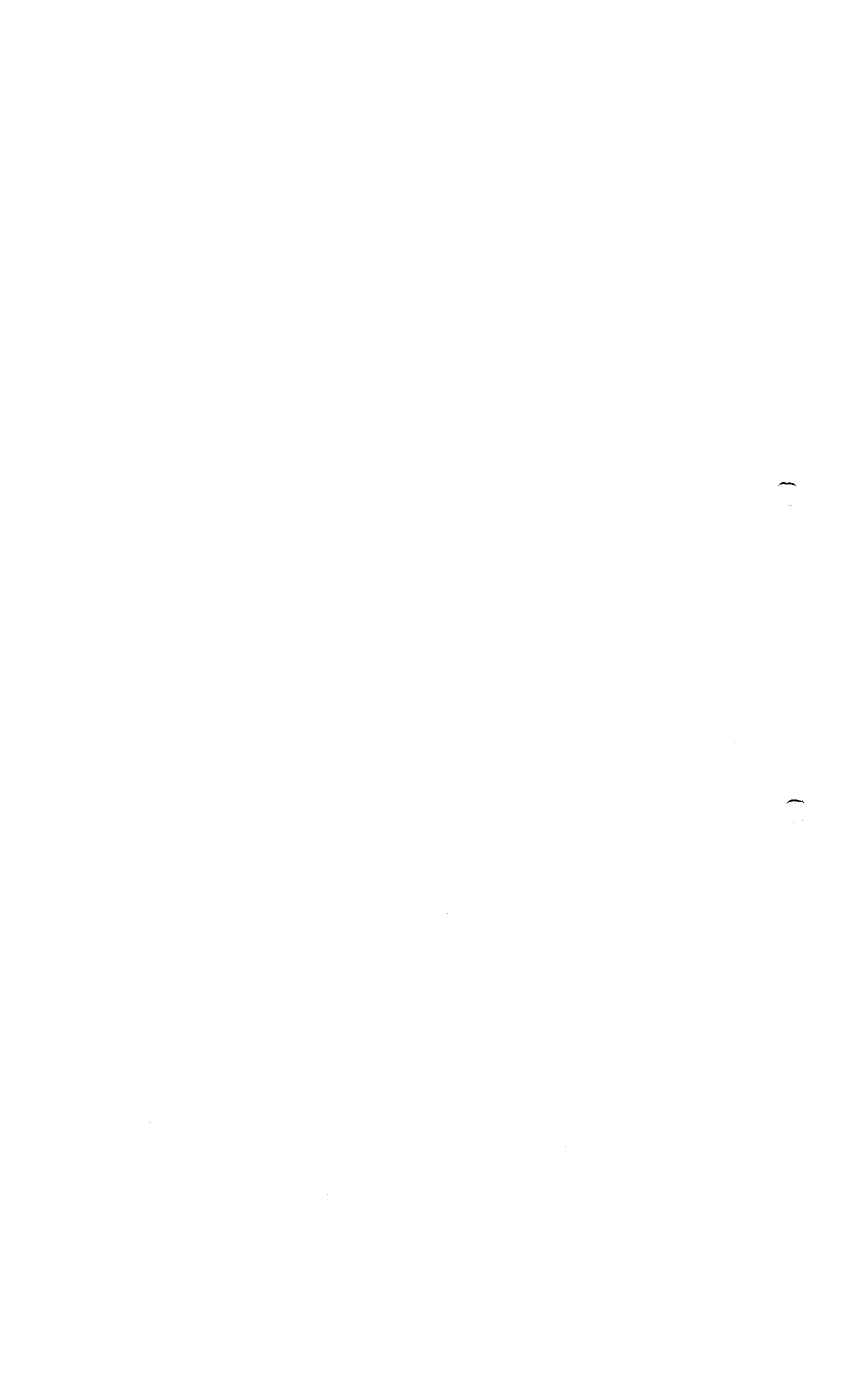
En los siguientes pasos se describe el proceso de elaboración del principio activo (detallado en 3.2.S.2.2 Cultivo y cosecha celular y en 3.2.S.2.2 Reacciones de purificación y modificación):

- Fermentación, incluyendo la preparación del inóculo y subcultivo, precultivo, cultivo industrial y lisis celular, para obtener la toxina tetánica cruda.
- Cosecha de la toxina tetánica por centrifugación y ultrafiltración para obtener la toxina tetánica diafiltrada concentrada.
- Detoxificación de la toxina tetánica para obtener toxoide tetánico crudo (CTT) utilizando formaldehído.
- Purificación del CTT incluyendo una precipitación doble con sulfato de amonio, para obtener el toxoide tetánico purificado PTT.

Estos pasos son impulsados por parámetros de producción y por controles durante el proceso (detallados en 3.2.S.2.2 Cultivo y cosecha celular, 3.2.S.2.2 Reacciones de purificación y modificación y en 3.2.S.2.5 Validación y/o evaluación del proceso).

Las especificaciones y los métodos de análisis para el principio activo (PTT) se describen en 3.2.S.4.1 Especificaciones y en 3.2.S.4.2 Procedimientos analíticos.

Basándose en los resultados de validación que demuestran que el proceso de elaboración es reproducible y está controlado (consultar 3.2.S.2.5 Validación y/o evaluación del proceso), los pasos presentados en la tabla 1 se consideran críticos para el proceso de elaboración del PTT.





**Tabla 1: Pasos críticos del proceso de elaboración del PTT**

Pasos críticos	Control del estado crítico	Objetivo del paso
Adición de formaldehído (paso 9.a)	Este paso de detoxificación se controla mediante: - Monitoreo de los parámetros de producción - Controles durante el proceso - Datos de validación (vea la sección 3.2.S.2.5 Validación y/o evaluación del proceso)	Detoxificar la toxina tetánica cruda concentrada y diafiltrada, para obtener el toxoide tetánico crudo (CTT).

La estabilidad del CTT (final del paso 9.b) durante el almacenamiento se controla por tiempo y temperatura con el fin de evitar su degradación. El estudio de estabilidad se presenta en 2.2.

La estabilidad del PTT (final del paso 17.d) durante el almacenamiento se controla por tiempo y temperatura con el fin de evitar su degradación. El estudio de estabilidad se presenta en 3.2.S.7.1 Resumen y conclusiones de estabilidad.

Los resultados de los programas de validación y los resultados de los estudios de estabilidad proporcionan datos de uniformidad de estos pasos críticos.

Por otra parte, durante las distintas etapas del proceso de elaboración, el control de los parámetros de producción, el control de los controles durante el proceso y los controles de liberación realizados sobre el principio activo permiten mantener bajo control estos pasos críticos.

  
ROXANA MONTEMILONE  
DIRECTOR TÉCNICA  
SANOFI PASTEUR S.A.

  
CHRISTIAN DOMINGUEZ  
APODERADO  
SANOFI PASTEUR S.A.





## 2 Productos intermedios

El único producto intermedio para la elaboración del PTT es el CTT crudo.

Este producto intermedio no se libera, se controla mediante controles durante el proceso (consultar la tabla 1 de la sección 3.2.S.2.2 Reacciones de purificación y modificación).

El CTT puede almacenarse durante 16 semanas a  $+ 5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$  (consulte el capítulo 2.2 para conocer datos de respaldo de la estabilidad).

### 2.1 Sistema de cierre del envase

El CTT se conserva en tanques de acero inoxidable. El sistema de cierre consta de tapas de acero inoxidable equipadas con tubos de silicona para garantizar un llenado y almacenamiento aséptico.

### 2.2 Estabilidad

#### 2.2.1 Resumen y conclusiones de estabilidad

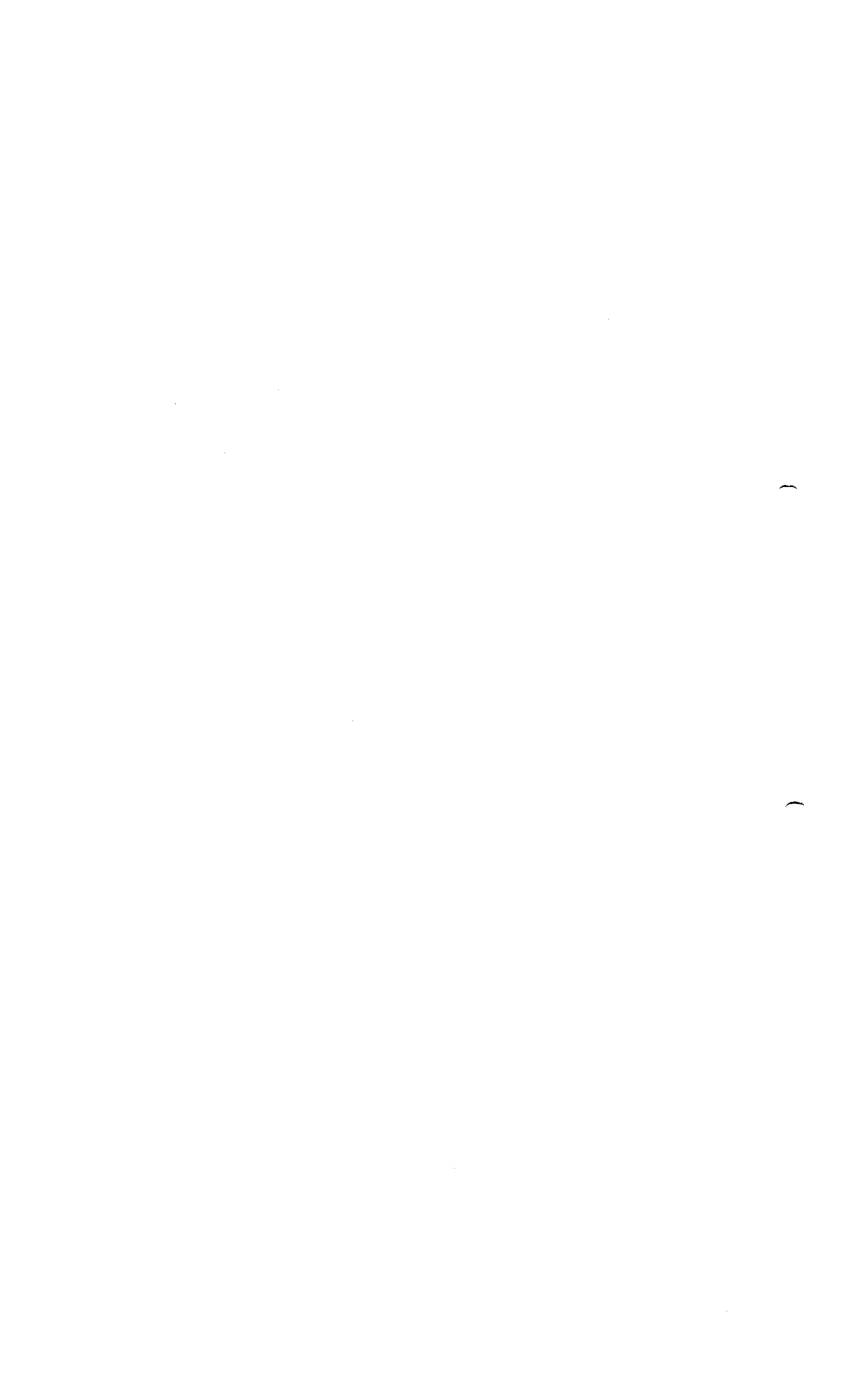
##### 2.2.1.1 Protocolo del estudio

El estudio de estabilidad del intermedio de CTT elaborado se resume en la tabla 2.

Para el CTT se define una vida útil de 16 semanas, ya que se necesita este tiempo de conservación para la producción de los lotes de CTT utilizados para la elaboración de un lote de PTT.

Tabla 2: Panorama general del estudio de estabilidad del CTT

	Toxoinde tetánico crudo
<b>Objetivo</b>	Avalar la vida útil del CTT a $+ 5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$
<b>Pruebas</b>	Contenido de nitrógeno proteico (mg/mL) Contenido de formaldehído libre ( $\mu\text{g/mL}$ ) Medición del pH Título de floculación (Lf/mL) Irreversibilidad del toxoinde tetánico Toxicidad específica (toxina tetánica) Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica
<b>Diseño del estudio</b>	Número de lotes: 3 Estudio a $+ 5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ Calendario (meses): T0, T1, T2, T3, T4 y T6
<b>Estado</b>	Terminado





### 2.2.1.2 Diseño del estudio

Se evaluó la estabilidad de tres lotes de CTT analizando el producto conservado a  $+ 5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$  durante un período de 6 meses. Las características de los lotes se presentan en la tabla 3.

**Tabla 3: Información general del producto de los lotes de CTT**

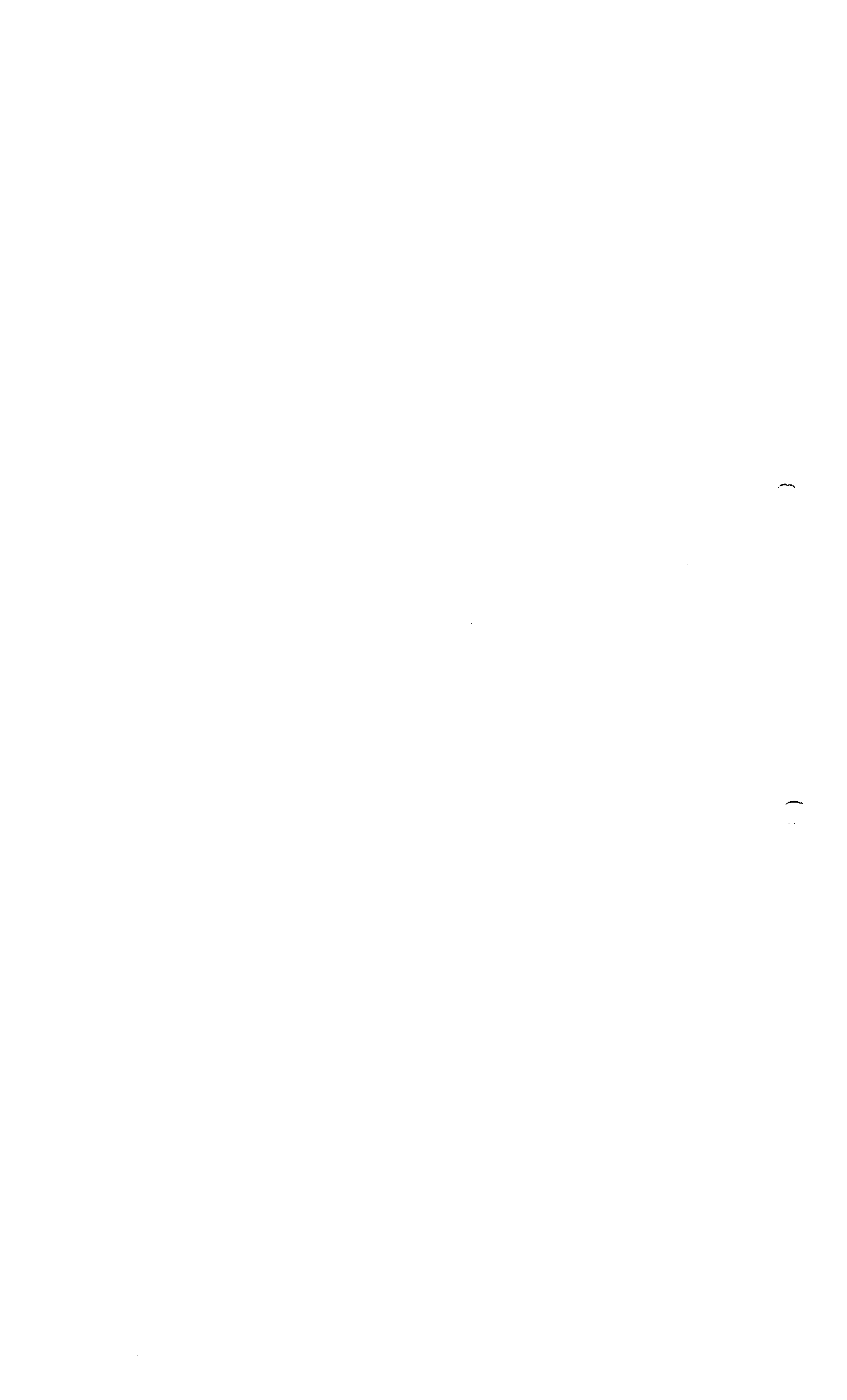
Número de lote	FA109141 07 jun 2002	FA109142 14 jun 2002	FA109143 14 jun 2002
Tipo de lote	Lotes industriales		
Envase	Tanque de acero inoxidable para imitar las condiciones normales de almacenamiento.		
Período de validez	16 semanas (4 meses) a $+ 5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$		

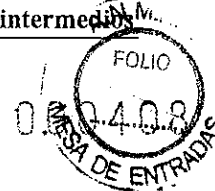
### 2.2.1.3 Selección y especificaciones de las pruebas

Las pruebas aplicadas como controles durante el proceso para verificar la conformidad del CTT a lo largo de su elaboración son el contenido de nitrógeno proteico, contenido de formaldehído libre, medición del pH y título de floculación. Estas pruebas fueron seleccionadas para el estudio de estabilidad. Se añadieron también las siguientes pruebas de seguridad (aplicadas para los controles de liberación del PTT): irreversibilidad del toxoide tetánico y prueba de toxicidad específica (para verificar la ausencia de toxina tetánica), y prueba de esterilidad bacteriana y fúngica (para verificar la conservación de la esterilidad).

El procedimiento de prueba y los criterios de aceptación para el contenido de nitrógeno proteico, el contenido de formaldehído residual, la medición del pH y el título de floculación se corresponden con los aplicados para los controles durante el proceso (consulte 3.2.S.2.2 Reacciones de purificación y modificación).

La ausencia de toxina (toxicidad específica) y la irreversibilidad del toxoide se dividen en dos pruebas: toxicidad específica e irreversibilidad del toxoide, pero se corresponden con las mismas pruebas de 3.2.S.4.1 Especificaciones. Cuando se llevó a cabo el estudio de estabilidad, estas dos pruebas estaban separadas mientras que ambas pruebas se reúnen para el control de liberación del PTT en la actualidad.





#### 2.2.1.4 Discusiones

##### *Características de seguridad:*

Todos los lotes analizados del toxoide tetánico crudo cumplen con la prueba de esterilidad bacteriana y fúngica, de toxicidad específica (ausencia de toxina tetánica) y de irreversibilidad del toxoide tetánico tras 6 meses de almacenamiento a  $+ 5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ .

Estos resultados demuestran que la esterilidad de la solución de CTT se mantiene durante el período de conservación, y el toxoide tetánico es estable sin reversión a toxina tetánica.

##### *Características fisicoquímicas:*

- El contenido de nitrógeno proteico permanece estable cuando el CTT se conserva a  $+ 5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$  durante 6 meses, sin que se observe ninguna tendencia (no se estableció ninguna relación estadísticamente significativa entre este parámetro y la duración del almacenamiento).

Se observa una tendencia a la disminución del contenido de formaldehído residual durante el almacenamiento a  $+ 5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$  (regresión estadísticamente significativa con una pendiente común en los tres lotes).

Los resultados permanecen holgadamente dentro de los criterios de aceptación después de un almacenamiento de 6 meses. En el paso de detoxificación de la toxina tetánica se utiliza formaldehído, ya que forma puentes de metileno entre los grupos amino de la molécula de la toxina tetánica (consulte 3.2.S.1.2 Estructura, para obtener más información). Durante la elaboración, el formaldehído puede ser consumido por otras moléculas que contienen grupos amino, y la disminución observada durante el estudio puede explicarse por la reactividad continua del formaldehído con el transcurso del tiempo.

- El título de floculación mostró algunos resultados ligeramente por encima del límite superior (600 Lf/mL) en los momentos de medición a los 4 y 6 meses. En todos los casos, estos resultados fueron confirmados por repetición de la prueba o por resultados en los siguientes momentos de medición (consulte la tabla 5, la tabla 6 y la tabla 7), salvo en el lote FA109143, para el cual el resultado de 600 Lf/mL en el momento de medición a los 6 meses se confirmó por repetición de la prueba.

Aun así, la prueba de título de floculación corresponde a un método semicuantitativo: la muestra de prueba se añade a tubos que contienen una serie de concentraciones de antitoxina de referencia y el primer tubo donde se observa floculación visible da el título de floculación. Se estableció que la variabilidad del método correspondía a un nivel de lectura de la concentración, que significan unos 60 Lf/mL. En consecuencia, los resultados de 660 Lf/mL en el momento de medición a los 6 meses no se considerarán atípicos cuando se tiene en cuenta la variabilidad del método.

Se observa una tendencia al aumento del título de floculación durante el almacenamiento a  $+ 5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$  (regresión estadísticamente significativa con una pendiente común en los tres lotes).





Este aumento del título de floculación puede deberse al consumo de formaldehído, que modifica la solución de CTT y podría afectar al tiempo de floculación. El aumento estadísticamente significativo del título de floculación sería entonces aparente y no representativo de un aumento de la concentración de toxoide tetánico en la solución de CTT.

No obstante, la pendiente común (con un intervalo de confianza del 95 %) y la ordenada en el origen del título de floculación obtenidas por cálculo estadístico son las siguientes:

$$Y = X * 0,0143 [0,0046; 0,0241] + 2,71$$

Donde:

Y = Log (Lf/título) ya que la distribución de los datos es logarítmica normal para esta prueba.

X = duración en meses.

2,71 = ordenada en el origen.

0,0143 [0,0046; 0,0241] = pendiente con un intervalo de confianza del 95 %.

Basándose en el valor objetivo de 500 Lf/mL después del paso de elaboración de ajuste del volumen (antes de la detoxificación, consulte 3.2.S.2.2 Reacciones de purificación y modificación), el título de floculación extrapolado tras 4 meses de almacenamiento a + 5 °C ± 3 °C cumpliría y se situaría en 575 Lf/mL, por debajo, por tanto, del límite superior de 600 Lf/mL.

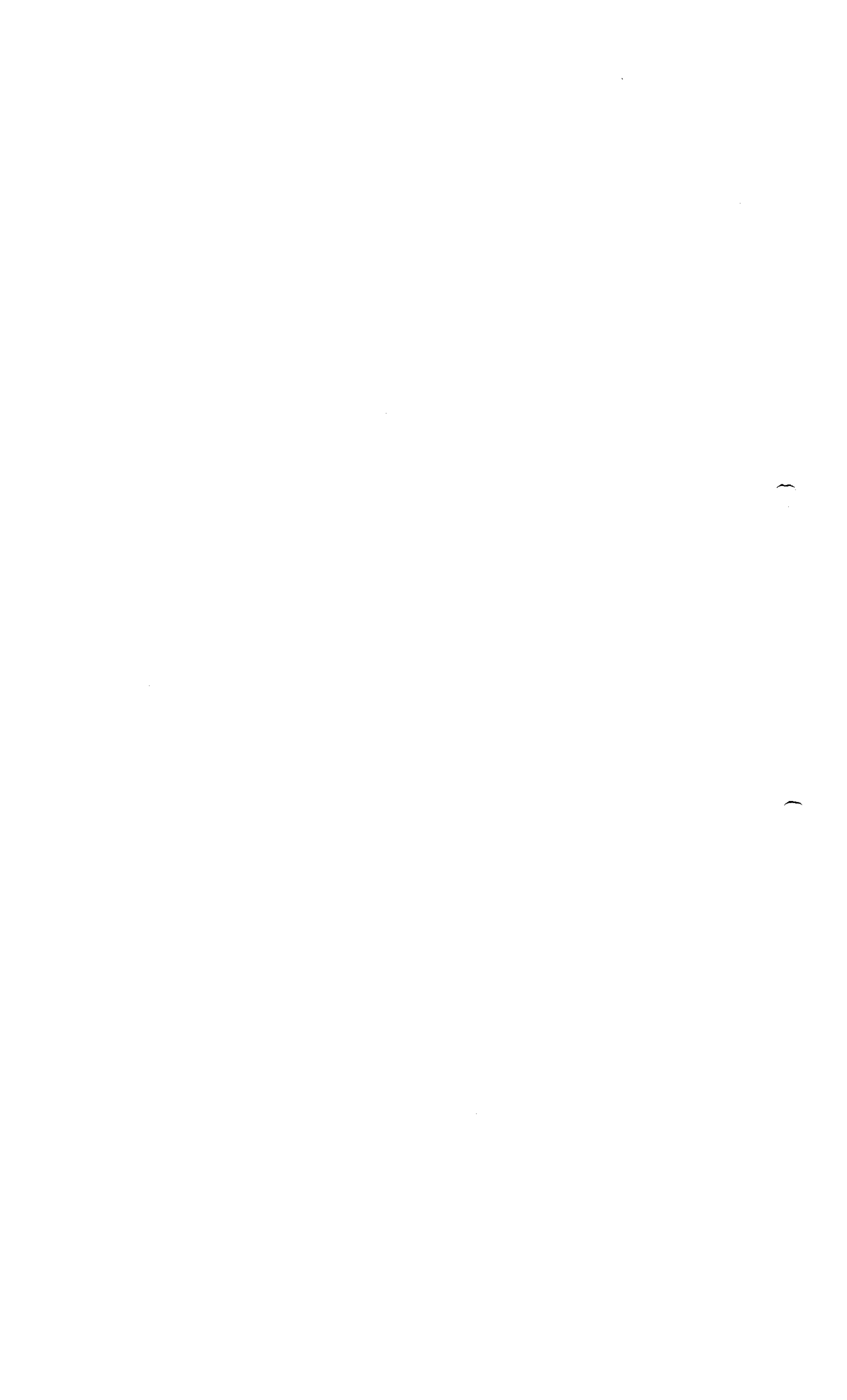
- Los resultados de pH para los tres lotes superan el límite superior (8,3), excepto en el momento de medición inicial.

La explicación identificada para esta circunstancia es el sistema de tubos de silicona de los minitanques de acero inoxidable que podrían permitir un intercambio de gases con la solución de CTT. Estos intercambios de gases se ven ampliados en los minitanques de acero inoxidable con respecto a los tanques de acero inoxidable de escala industrial, ya que el tamaño de los tubos de silicona es equivalente en ambos casos (no es posible reducir este tamaño en los minitanques de acero inoxidable). Se ha llevado a cabo un estudio complementario en minitanques de acero inoxidable con un sistema de cierre más próximo a las condiciones reales en cuanto a la proporción del tamaño de los tubos de silicona con respecto al volumen del tanque.

Se evaluó la estabilidad de tres lotes de CTT (FA137632, FA140067 y FA140070) almacenados en minitanques de acero inoxidable con y sin tubos de silicona por medición del pH en condiciones reales de almacenamiento (3 meses a + 5 °C ± 3 °C). Los resultados se presentan en la siguiente tabla 4.

**Tabla 4: Resultados de estabilidad de los lotes de CTT FA137632, FA140067 y FA140070 a + 5 °C ± 3 °C**

Número de lote	FA137632		FA140067		FA140070	
	Con	Sin	Con	Sin	Con	Sin
T0	8,06	8,06	7,85	7,85	8,21	8,21
T1 mes	8,48	8,10	8,16	7,66	8,80	8,23
T3 meses	9,00	8,14	8,83	8,15	8,97	8,36



El pH aumenta rápidamente en los minitanques de acero inoxidable con tubos de silicona, mientras que es estable sin tubos de silicona a lo largo de 3 meses a  $+ 5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ .

Basándose en estos datos, se ha acordado realizar los estudios de estabilidad utilizando minitanques de acero inoxidable sin tubos de silicona (que es más próximo a las condiciones reales de almacenamiento de los tanques de acero inoxidable de escala industrial).

Este estudio demostró que no se observaba impacto alguno sobre el pH en tales condiciones. Además, la evolución del pH no tenía impacto alguno sobre la estabilidad del CTT ya que:

- el toxoide tetánico es estable sin reversión (ausencia de toxina tetánica e irreversibilidad del toxoide cumplen durante todo el estudio de estabilidad),
- el contenido de toxoide tetánico es estable ya que el contenido de nitrógeno proteico y los títulos de floculación (utilizados para estimar la pureza antigénica) no muestran disminución alguna.

Durante los siguientes pasos de elaboración aplicados para obtener toxoide tetánico purificado a partir del CTT (consulte 3.2.S.2.2 Reacciones de purificación y modificación), el pH se ajusta también nuevamente a los valores objetivo, que dependen de los pasos realizados.

### 2.2.1.5 Conclusión

Los resultados del CTT presentados permiten respaldar una vida útil de 4 meses (16 semanas) cuando se conserva a  $+ 5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ .

### 2.2.2 Datos de estabilidad

Los resultados obtenidos para los 3 lotes se presentan en la tabla 5, en la tabla 6 y en la tabla 7.





Tabla 5: Resultados de estabilidad para el CTT conservado a + 5 °C ± 3 °C: lote FA109141

Pruebas	Criterios de aceptación	T0	1 mes	2 meses	3 meses	4 meses	6 meses
Contenido de nitrógeno proteico	0,3 – 1,3 mg/mL	0,80	0,79	0,81	Prueba no realizada *	0,91	0,85
Contenido de formaldehído libre	≥ 290 µg/mL	1431	1270	1361	Prueba no realizada	1298	1025
Medición del pH	6,8 - 8,3	7,64	R1: 8,81 R2: 8,56†	9,03	Prueba no realizada	8,82	8,93
Título de floculación	400 – 600 Lf/mL	500	Prueba no realizada	575	Prueba no realizada	600‡	R1: 660 R2: 577,5 R3: 577,5§
Irreversibilidad del toxoide tetánico	Ausencia de síntomas tetánicos y un mínimo de 80 % de supervivencia	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Toxicidad específica (toxina tetánica)	Negativa	Cumple	Prueba no programada	Prueba no programada	Prueba no programada	Cumple	Cumple
Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica	Ausencia de crecimiento microbiano	Cumple	Prueba no programada	Prueba no programada	Prueba no programada	Cumple	Cumple

\* Prueba no realizada. El tamaño de la muestra no permitió realizar todas las pruebas programadas.

† La primera prueba (R1) fue confirmada por repetición (R2). No se realizaron repeticiones de la prueba para este parámetro a lo largo del estudio.

‡ Prueba realizada a T5 meses.

§ La primera prueba (R1) fue confirmada por repeticiones (R2 y R3). El valor conservado fue de 577,5 Lf/mL.

ROXANA MONTEMILONE  
DIRECTORA GENERAL  
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINGUEZ  
APODERADO  
SANOFI PASTEUR S.A.

RA\_0302115

Información confidencial/propietaria

Página 10 de 12



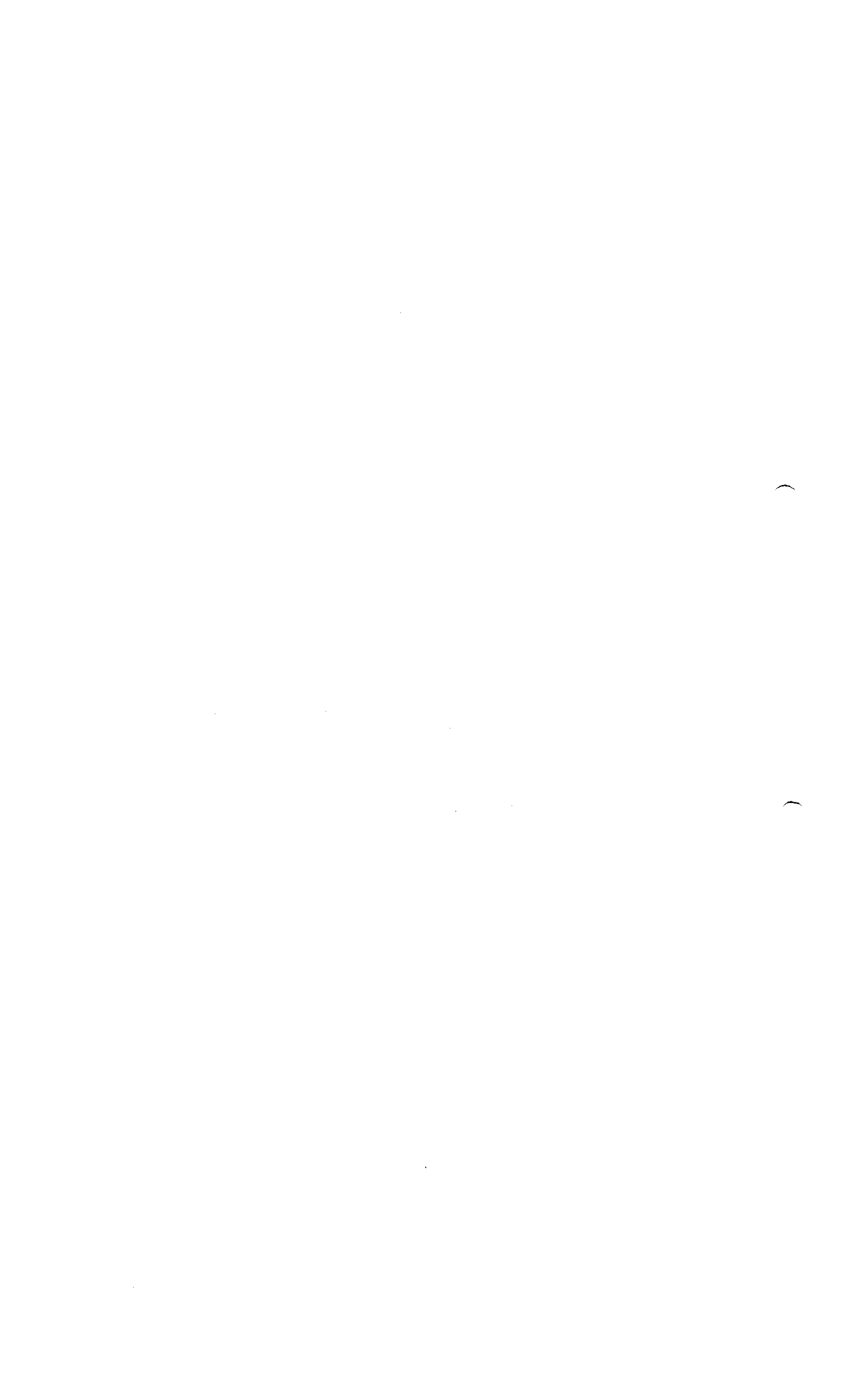


Tabla 6: Resultados de estabilidad para el CTT conservado a  $+ 5 \text{ }^\circ\text{C} \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ : lote FA109142

Pruebas	Criterios de aceptación	T0	1 mes	2 meses	3 meses	4 meses	6 meses
Contenido de nitrógeno proteico	0,3 – 1,3 mg/mL	0,91	0,84	0,85	0,88	0,93	0,88
Contenido de formaldehído libre	$\geq 290 \text{ } \mu\text{g/mL}$	1504	1482	1405	1390	1382	1343
Medición del pH	6,8 - 8,3	8,02	R1: 8,43 R2: 8,55*	8,54	8,92	8,91	8,76
Título de floculación	400 – 600 Lf/mL	500	Prueba no realizada	518	600	633 †	600
Irreversibilidad del toxoide tetánico	Ausencia de síntomas tetánicos y un mínimo de 80 % de supervivencia	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Toxicidad específica (toxina tetánica)	Negativa	Cumple	Prueba no programada	Prueba no programada	Prueba no programada	Cumple	Cumple
Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica	Ausencia de crecimiento microbiano	Cumple	Prueba no programada	Prueba no programada	Prueba no programada	Cumple	Cumple

\* La primera prueba (R1) fue confirmada por repetición (R2). No se llevaron a cabo repeticiones de la prueba para este parámetro a lo largo del estudio.  
† El resultado a T4 meses fue confirmado por el resultado obtenido a T6 meses.

ROXANA MONTEMILONE  
DIRECTORA TÉCNICA  
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMÍNGUEZ  
APODERADO  
SANOFI PASTEUR S.A.





Tabla 7: Resultados de estabilidad para el CTT conservado a + 5 °C ± 3 °C: lote FA109143

Pruebas	Criterios de aceptación	T0	1 mes	2 meses	3 meses	4 meses	6 meses
Contenido de nitrógeno proteico	0,3 – 1,3 mg/mL	0,98	0,90	0,92	0,95	0,98	0,94
Contenido de formaldehído libre	≥ 290 µg/mL	1115	984	971	872	895	838
Medición del pH	6,8 - 8,3	7,41	8,17	8,16	8,46*	8,60	8,86
Título de floculación	400 – 600 Lf/mL	500	Prueba no realizada	575	518	550	R1: 660 R2: 660
Irreversibilidad del toxoide tetánico	Ausencia de síntomas tetánicos y un mínimo de 80 % de supervivencia	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Toxicidad específica (toxina tetánica)	Negativa	Cumple	Prueba no programada	Prueba no programada	Prueba no programada	Cumple	Cumple
Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica	Ausencia de crecimiento microbiano	Cumple	Prueba no programada	Prueba no programada	Prueba no programada	Cumple	Cumple

\* En cuanto a los resultados obtenidos en otros lotes en momentos de medición anteriores, no se llevaron a cabo repeticiones de la prueba para este parámetro a lo largo del estudio.

ROXANA MONTEMILONE  
DIRECTORA TÉCNICA  
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINGUEZ  
APODERADO  
SANOFI PASTEUR S.A.



