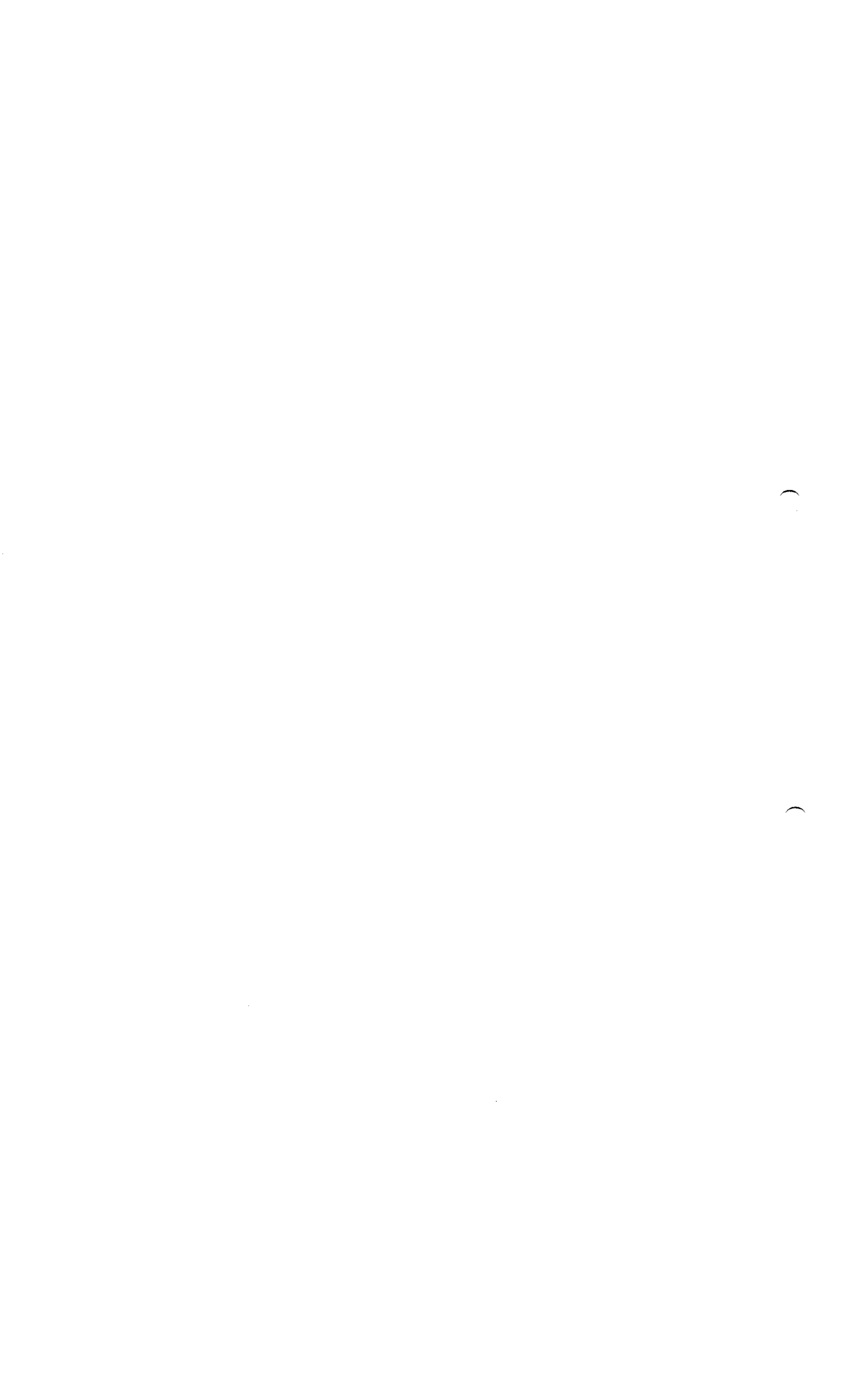


## Sección 3.2.S.2.2 Descripción del proceso de elaboración controles del proceso

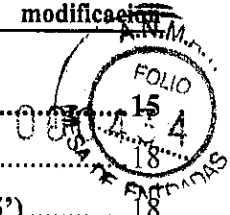
### Condiciones de purificación, detoxificación, llenado y almacenamiento

#### Índice

Lista de tablas .....	3
Lista de figuras .....	4
1 Purificación de la toxina pertúsica (PT).....	5
1.1 Ajuste de pH (etapa 7) .....	7
1.2 Adsorción de la FHA en hidroxapatita (HXP) (etapa 8).....	7
1.3 Recuperación de la PT del HXP, ajuste de pH y adsorción de la PT en asialofetuina sefarosa (ASF 4B) (etapas 9 a 12) .....	7
1.4 Lavado y elución de contaminantes, elución de fracciones de PT y agrupación (etapas 13 a 14).....	8
1.5 Precipitación de la PT (etapa 15).....	8
2 Purificación de FHA.....	9
2.1 Lavado y elución de contaminantes (etapa 9') .....	11
2.2 Elución de la FHA (etapa 10').....	11
2.3 Agrupación de eluatos (fase 11').....	11
2.4 Precipitación de la FHA (etapa 12') .....	11
3 Detoxificación de la toxina pertúsica purificada .....	12
3.1 Solubilización de la toxina pertúsica (etapa 16).....	14
3.2 Ajuste del contenido proteico (fase 17) .....	14
3.3 Detoxificación con glutaraldehído (GTA) (etapa 18).....	14
3.4 Diafiltración, sonicación y filtración previo (etapas 19 a 21).....	14
3.5 Filtración estéril (etapa 22) .....	15



4	Adsorción de los antígenos en hidróxido de aluminio.....	15
4.1	Solubilización de la FHA (etapa 13').....	15
4.2	Filtración previa y filtración estéril (0,22 µm) de la FHA (fases 14' y 15') .....	18
4.3	Adsorción de antígenos.....	18
4.4	Decantación (etapa 17' para la FHA y etapa 24 para el PTxd) .....	18
5	Condiciones de llenado y almacenamiento.....	19
6	Controles durante el proceso.....	20
6.1	Panorama de los controles durante el proceso aplicados a la purificación de la PT .....	20
6.2	Panorama de los controles durante el proceso aplicados a la purificación de la FHA.....	21
6.3	Panorama de los controles durante el proceso aplicados durante la detoxificación de PT.....	22
6.4	Panorama de los controles durante el proceso aplicados a la adsorción de los antígenos en hidróxido de aluminio .....	23
7	Composición de los tampones y de otros aditivos utilizados durante la purificación .....	24
7.1	Composición de los tampones y de las soluciones utilizadas durante el proceso .....	24
7.1.1	Tampón de fosfato .....	24
7.1.2	Tampón de fosfato, NaCl .....	24
7.1.3	Tampón de carbonato-Tween (CTW) .....	24
7.1.4	Tampón de carbonato .....	24
7.1.5	L-lisina .....	25
7.1.6	Solución salina tamponada con fosfato ácido (PBS/HCl) (Solución tamponada con fosfato).....	25
7.2	Preparación de la asialofetuina-sefarosa CL-4B (ASF-4B) .....	25



  
ROXANA MONTEMILONE  
DIRECTORA TÉCNICA  
SANOFI PASTEUR S.A.

  
CHRISTIAN DOMINGUEZ  
APODERADO  
SANOFI PASTEUR S.A.



## Lista de tablas



Tabla 1: Controles durante el proceso de purificación de la PT.....	20
Tabla 2: Controles durante el proceso de purificación de FHA .....	21
Tabla 3: In-Process Controls during Detoxification of PT.....	22
Tabla 4: Controles durante el proceso de adsorción de antígenos.....	23
Tabla 5: Pruebas realizadas en la asialofetuina .....	26
Tabla 6: Pruebas realizadas en la asialofetuina sefarosa CL-4B .....	26



## Lista de figuras

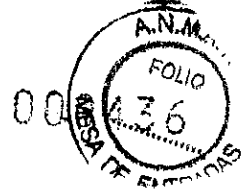
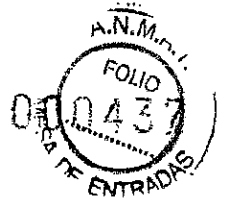


Figura 1: Diagrama de flujo de la purificación de la PT .....	6
Figura 2: Diagrama de flujo de la purificación de la FHA.....	10
Figura 3: Diagrama de flujo de la detoxificación.....	13
Figura 4: Diagrama de flujo de la adsorción de la FHA en hidróxido de aluminio .....	16
Figura 5: Diagrama de flujo de la adsorción de la PT en hidróxido de aluminio.....	17
Figura 6: Preparación de la asialofetuina sefarosa CL-4B (ASF-4B).....	27





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



## 1 Purificación de la toxina pertúsica (PT)

El esquema del proceso para la purificación de la toxina pertúsica nativa se proporciona en la figura 1.

  
ROXANA MONTEMILONE  
DIRECTORA GENERAL  
SANOFI PASTEUR S.A.

  
CHRISTIAN DOMINGUEZ  
APODERADO  
SANOFI PASTEUR S.A.



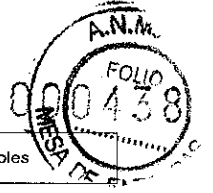
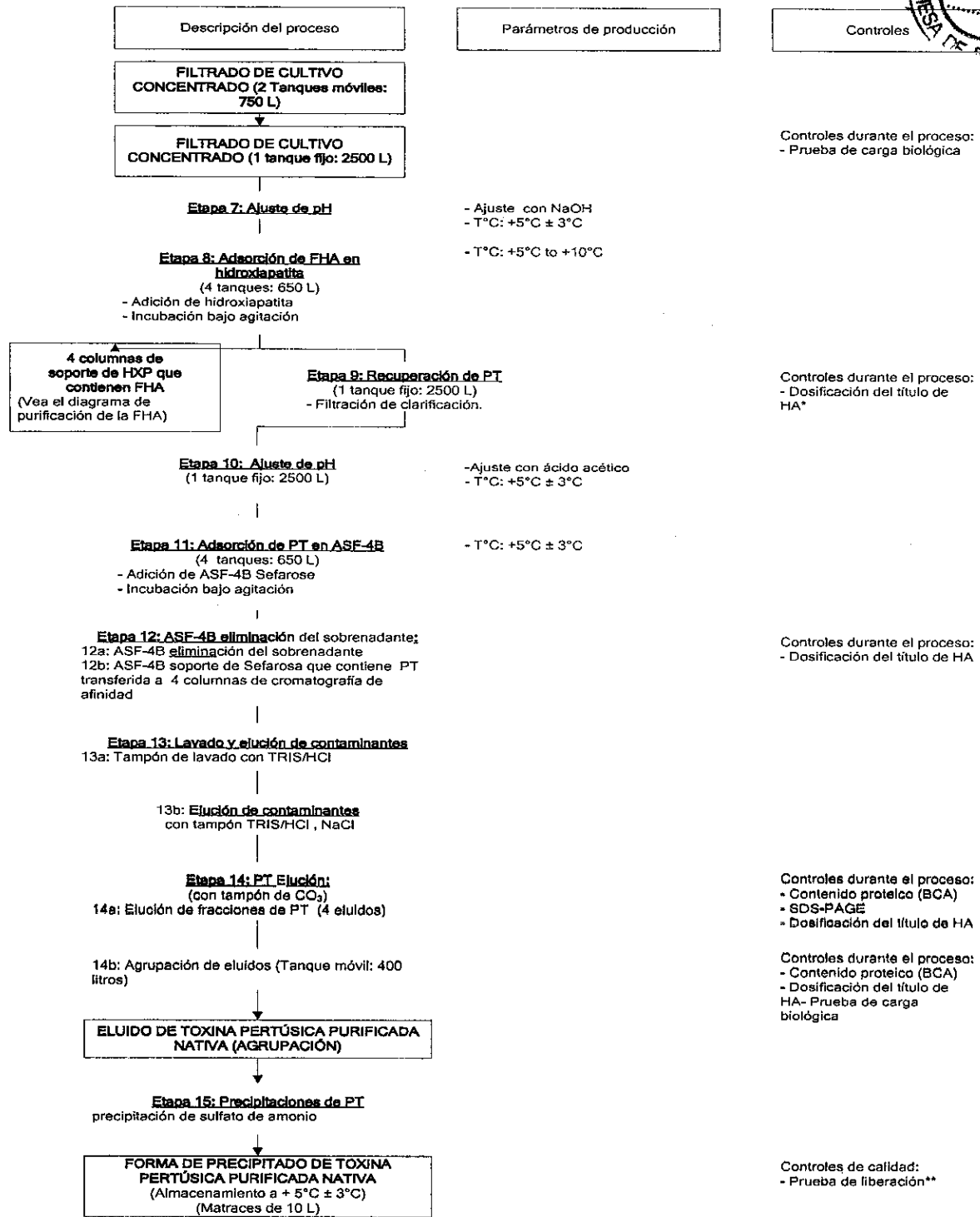


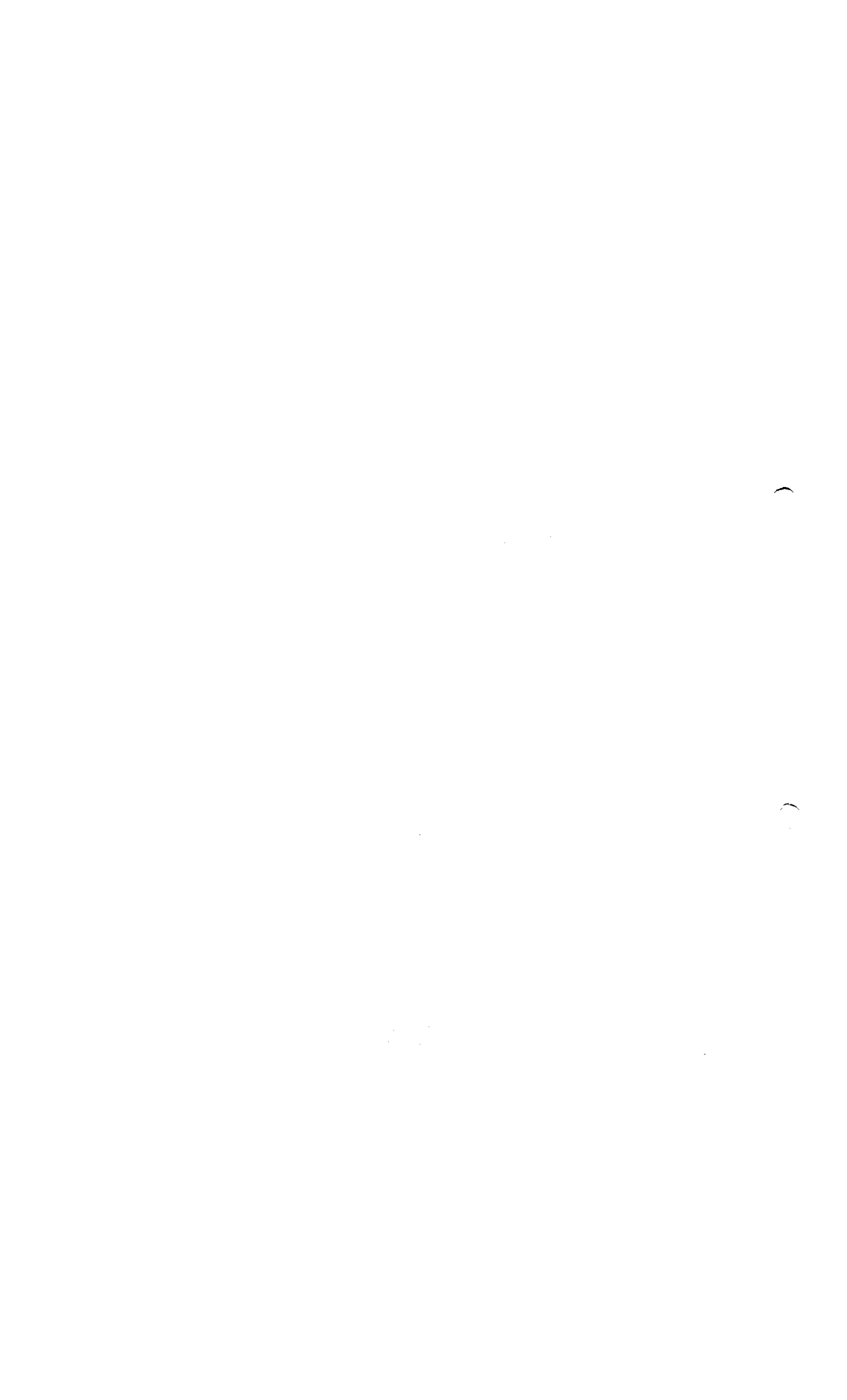
Figura 1: Diagrama de flujo de la purificación de la PT



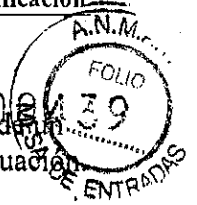
\*HA: Prueba de hemaglutinación  
 \*\*Las pruebas de liberación se describen en la sección 3.2.S.2.4 Control de los pasos críticos e intermedios.

ROXANA MONTEMILONE  
 DIRECTORA TÉCNICA  
 SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINGUEZ  
 APODERADO  
 SANOFI PASTEUR S.A.



El filtrado de cultivos concentrado se somete a prueba para determinar los niveles de carga biológica (vea Controles durante el proceso en la Tabla 1) antes de transferirlo a un tanque de un único producto y someterlo a las diferentes etapas de purificación que se describen a continuación.



### 1.1 Ajuste de pH (etapa 7)

Después del ajuste de temperatura ( $+5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ ), se ajusta el pH con NaOH.

### 1.2 Adsorción de la FHA en hidroxiapatita (HXP) (etapa 8)

El filtrado de cultivo concentrado se distribuye en cuatro tanques cónicos de adsorción/decantación y se agrega soporte de HXP en cada tanque. La adsorción de la FHA en HXP se realiza a  $+5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ , bajo agitación, seguida de decantación. Luego, cada soporte de HXP que contiene FHA se distribuye en una columna de cromatografía para su purificación posterior.

### 1.3 Recuperación de la PT del HXP, ajuste de pH y adsorción de la PT en asialofetuina sefarosa (ASF 4B) (etapas 9 a 12)

Para aislar la PT, es necesario recuperar esta proteína de la fase líquida cromatográfica (sobrenadante) (etapa 9). Primero, el sobrenadante se somete a una filtración de clarificación de  $1\text{ }\mu\text{m}$  y el filtrado se recolecta en un tanque de un único producto.

Al final de esta etapa, se toman muestras para realizar los controles durante el proceso (vea la Tabla 1).

El pH se ajusta con ácido acético a  $+5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$  (etapa 10).

Posteriormente, el filtrado se vuelve a distribuir en cuatro tanques de adsorción/decantación y se agrega sefarosa ASF4B. La adsorción de la PT en ASF-4B se realiza a  $+5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ , sometida a agitación, seguida de decantación (etapa 11).

Luego, el soporte de sefarosa ASF4B que contiene la PT se transfiere a columnas de cromatografía de afinidad mientras que el sobrenadante se elimina (etapa 12).

Al final de esta fase, se toman muestras para realizar los controles durante el proceso (vea la Tabla 1).





#### 1.4 Lavado y elución de contaminantes, elución de fracciones de PT y agrupación (etapas 13 a 14)

Posteriormente, cada columna cromatográfica se conecta a la plataforma cromatográfica móvil y la PT se eluye del soporte de sefarosa ASF4B, como se describe a continuación:

- Etapa 13a: Las columnas se lavan con solución tampón TRIS.
- Etapa 13b: Los contaminantes se eluyen con solución tampón TRIS que contiene NaCl.
- Etapa 14a: La PT purificada se eluye con solución tampón de carbonato.  
Al final de esta etapa, se toman muestras para realizar los controles durante el proceso (vea la Tabla 1).
- Etapa 14b: Las fracciones seleccionadas se agrupan en tanques móviles. Se obtiene el material eluido de la toxina pertúsica purificada nativa (agrupación).  
Al final de esta fase, se toman muestras para realizar los controles durante el proceso (vea la Tabla 1).

#### 1.5 Precipitación de la PT (etapa 15)

La PT se precipita con sulfato de amonio (AS) (aproximadamente 471 g/litro) y se concentra por decantación. Aproximadamente 20 litros de precipitado de toxina pertúsica purificada nativa se distribuyen en matraces de 10 litros y se pueden almacenar durante un máximo de 48 meses a  $+5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Vea 3.2.S.2.4 Control de los pasos críticos e intermedios).

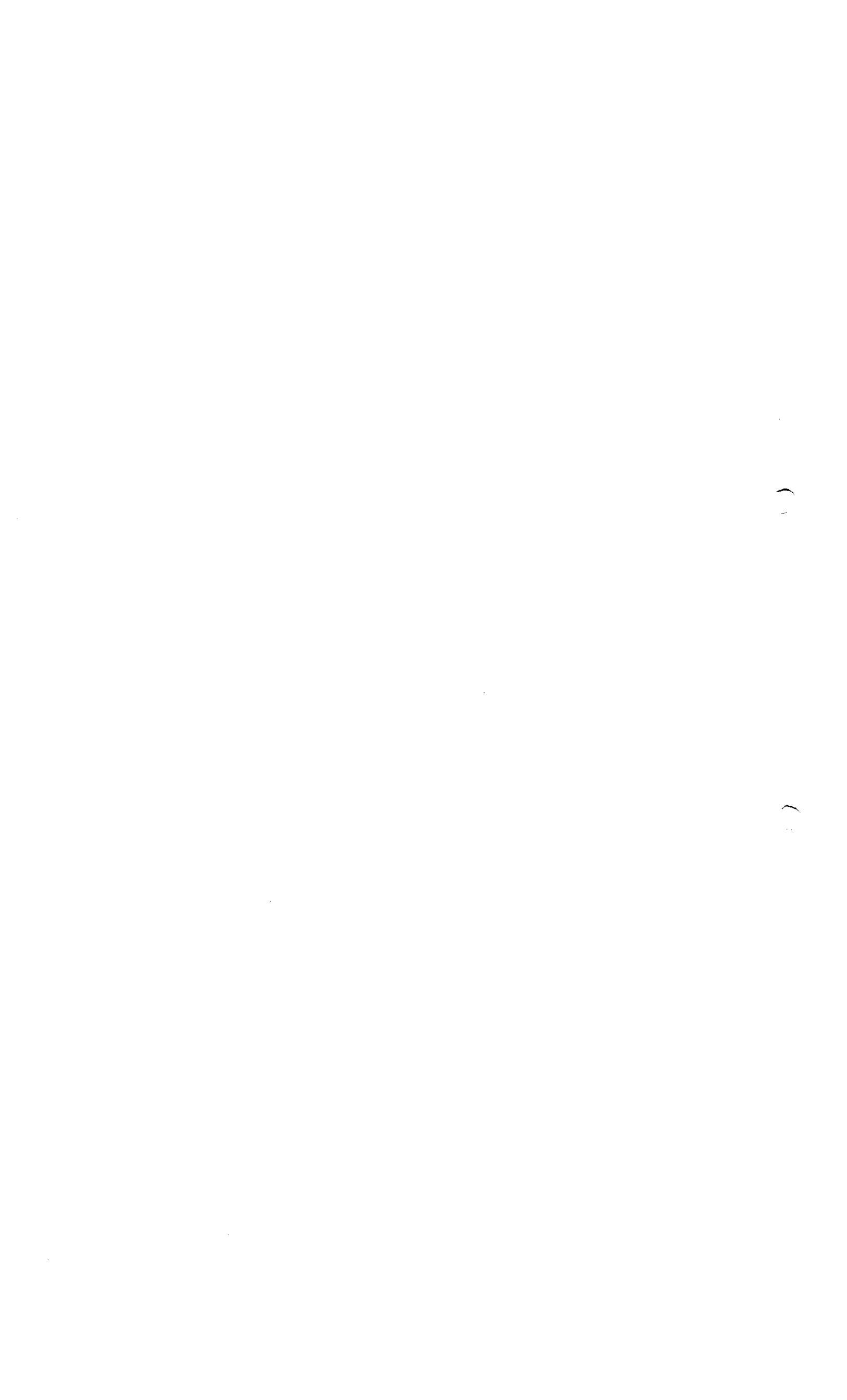
El precipitado de toxina pertúsica purificada nativa se somete a pruebas de liberación de control de calidad. Las muestras que se toman para los controles de calidad primero se centrifugan y se diafiltran para eliminar el sulfato de amonio.

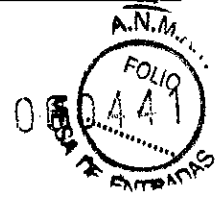
- **Condiciones de uso y reutilización de la columna**

Después de su uso, el soporte de ASF-4B sefarosa se lava y se vuelve a equilibrar de acuerdo con los siguientes pasos:

- Lavado con la solución tampón de Tris HCl.
- Lavado con etanol + solución de ácido acético. Este paso se realiza a temperatura ambiente.
- Reequilibrio con solución tampón de TRIS HCl con agente antimicrobiano (es decir, timerosal). Esta última etapa se realiza a temperatura ambiente.

El soporte de ASF4B se almacena en solución tampón de TRIS HCl con agente timerosal en matraces de 10 litros. Se almacena a  $+5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta que se utilice para la próxima purificación.





## 2 Purificación de FHA

Este paso corresponde a la elaboración de FHA purificada nativa, según se describe en la figura 2.

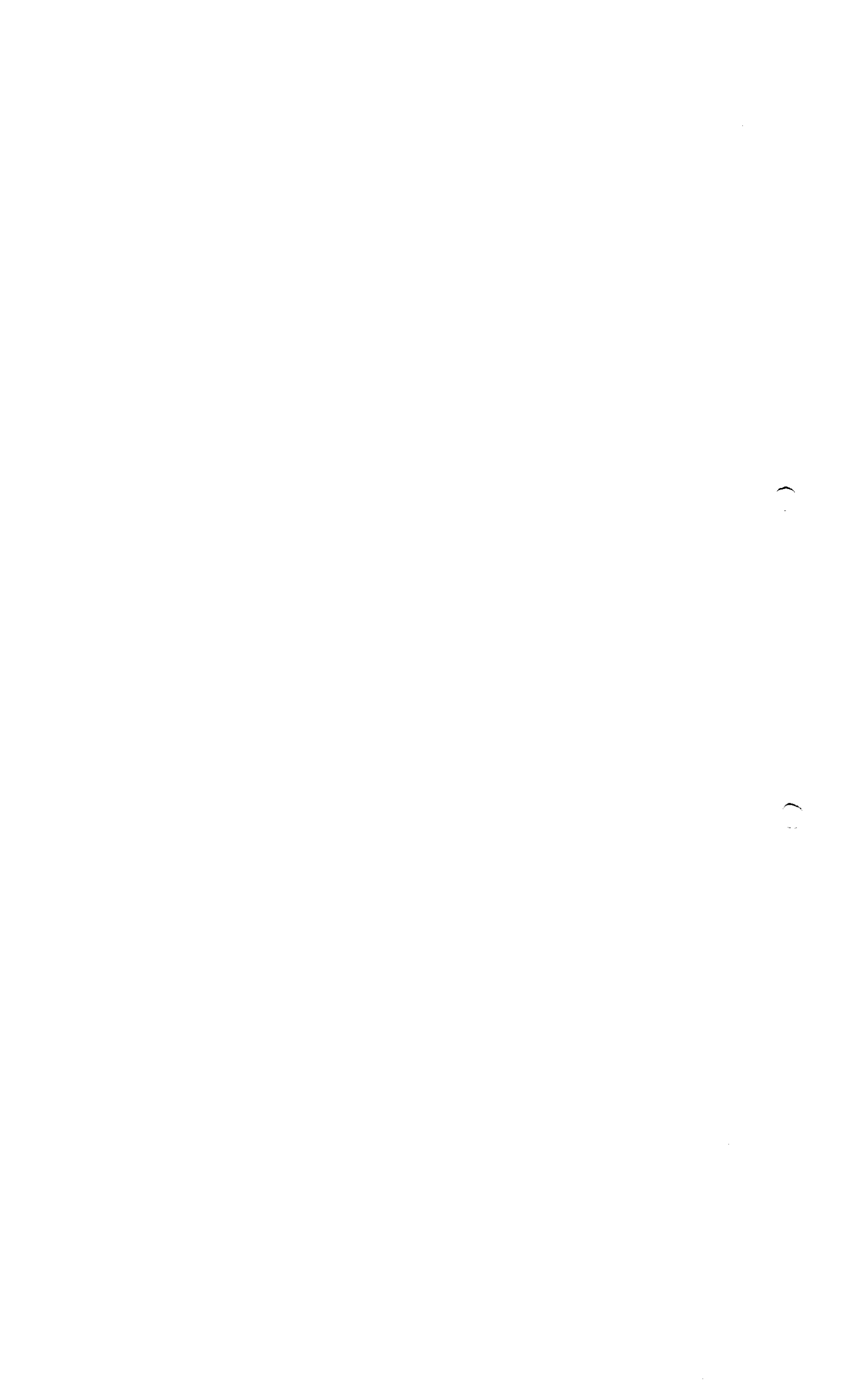
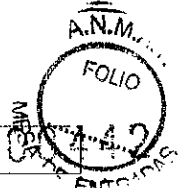
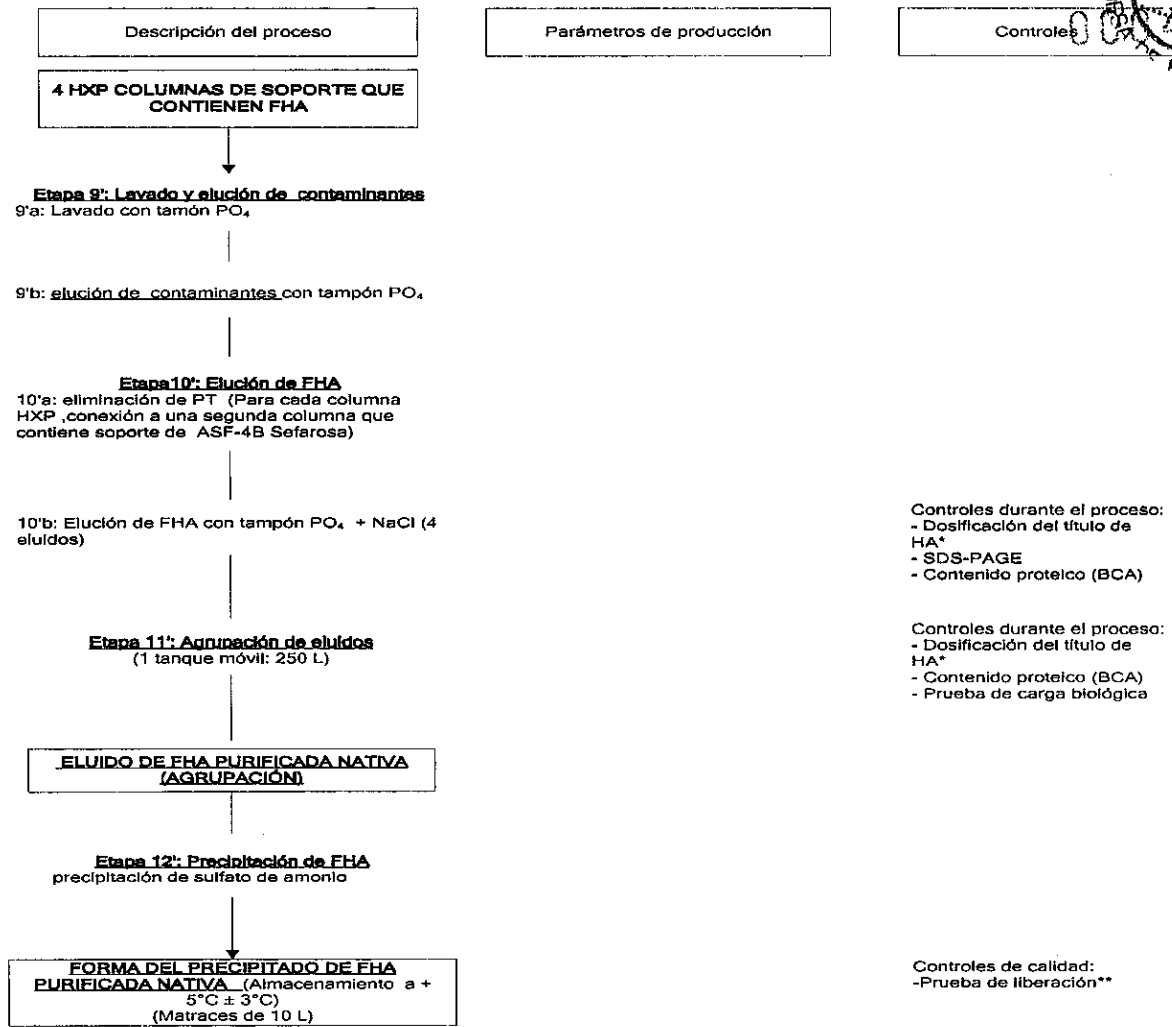




Figura 2: Diagrama de flujo de la purificación de la FHA



\*HA: Prueba de hemaglutinación  
 \*\*Las pruebas de liberación se detallan en la sección 3.2.S.2.4 -Controles de los pasos críticos e intermedios

  
 ROXANA MONTEMILONE  
 DIRECTORA TÉCNICA  
 SANOFI PASTEUR S.A.

  
 CHRISTIAN DOMINGUEZ  
 APODERADO  
 SANOFI PASTEUR S.A.

