

Después de una decantación de 10 horas o más, las columnas de cromatografía que contienen FHA adsorbida en soporte HXP, preparado durante la purificación de la PT se conectan a una plataforma cromatográfica móvil, y la FHA se eluye de acuerdo con el siguiente procedimiento



2.1 Lavado y elución de contaminantes (etapa 9')

- Etapa 9'a: Lavado con solución tamponada con fosfato.
- Etapa 9'b: Elución de contaminantes con solución tamponada con fosfato. La solución tamponada fluye por el soporte de HXP.

2.2 Elución de la FHA (etapa 10')

La elución de la FHA purificada se realiza con solución tamponada con fosfato que contiene NaCl.

- Etapa 10'a: Cada columna de HXP se conecta a otra columna que contiene soporte de ASF-4B sefarosa, para eliminar los rastros de PT que pudieran estar presentes. Esta conexión se realiza no bien aparece el pico de FHA.
- Etapa 10'b: Para cada columna, durante la elución, se fracciona la FHA purificada. Se realizan los controles durante el proceso en cada fracción (vea la Tabla 2).

2.3 Agrupación de eluatos (fase 11')

Luego, se agrupan las fracciones para formar los eluatos.

Se toman los cuatro eluatos para realizar controles durante el proceso (vea la Tabla 2).

2.4 Precipitación de la FHA (etapa 12')

Los cuatro eluatos se agrupan y luego la agrupación de FHA se precipita con sulfato de amonio (aproximadamente 471 g/litro). Después de la decantación, el precipitado de FHA purificada nativa se distribuye en matraces de 10 litros y se puede 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 FHA purificada nativa se somete a pruebas de liberación. Una alícuota de este antígeno se envía al Departamento de Control de Calidad. Las pruebas se realizan después del tratamiento de la muestra para eliminar el sulfato de amonio por medio de diafiltración y centrifugación.

- Condiciones de uso y reutilización de la columna de HXP

Después de cada elución de la FHA, el soporte de HXP se regenera y se vuelve a equilibrar de acuerdo con los siguientes pasos:

- Lavado con solución de NaOH + etanol al 20 %.
- Lavado con la solución tamponada de PO_4 .
- Reequilibrio con solución tamponada con fosfato.

ROXANA MONTEMLONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.



El soporte de HXP se almacena en NaOH hasta la próxima purificación. El soporte de HXP se almacena a $+5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ en las columnas.

Antes de su uso, se realiza un reequilibrio con una solución tamponada de PO_4 .



3 Detoxificación de la toxina pertúsica purificada

Los pasos para detoxificar la toxina pertúsica purificada se encuentran en la figura 3.


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.



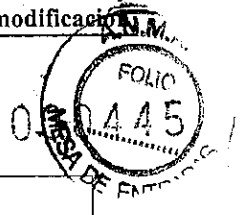
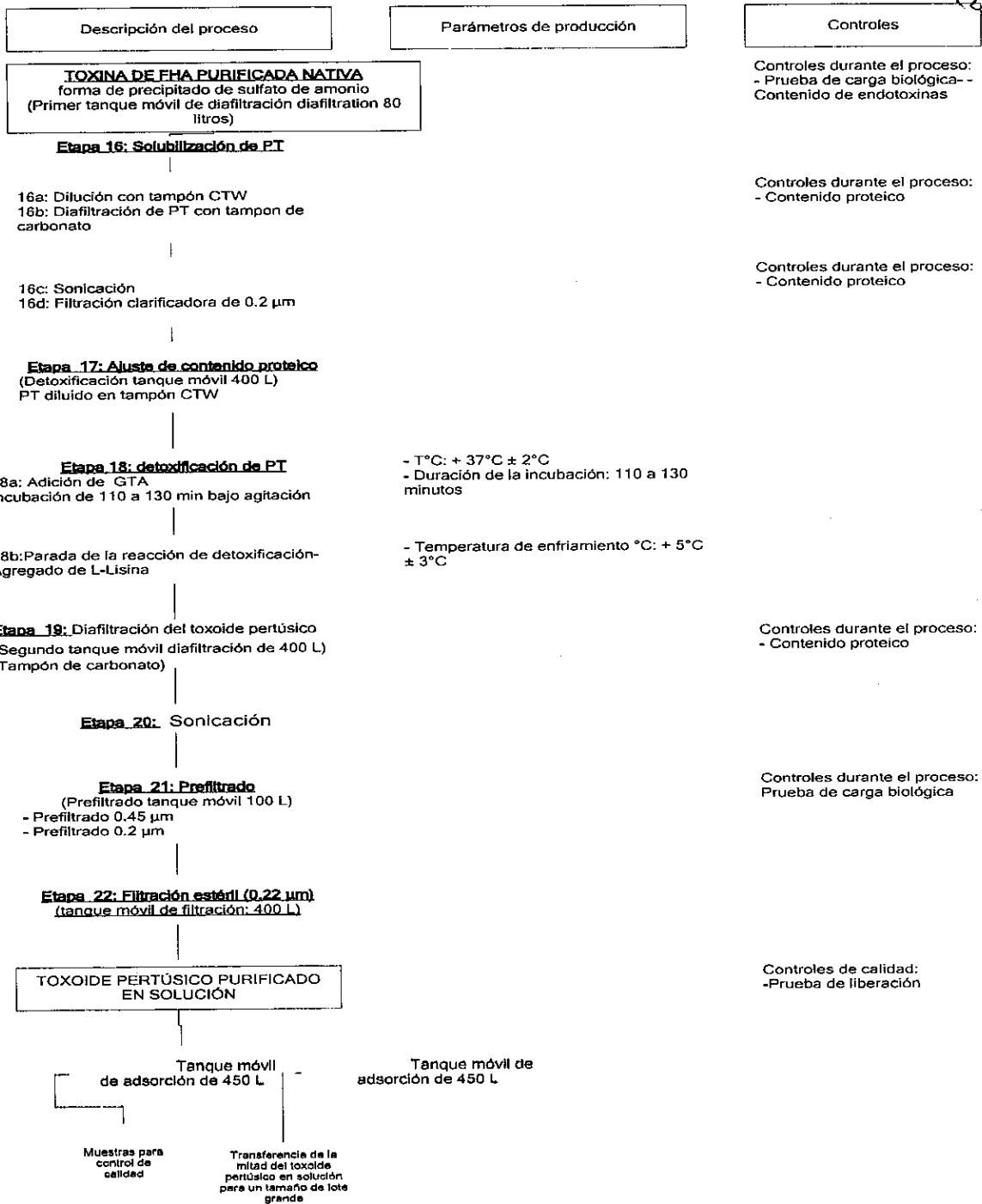




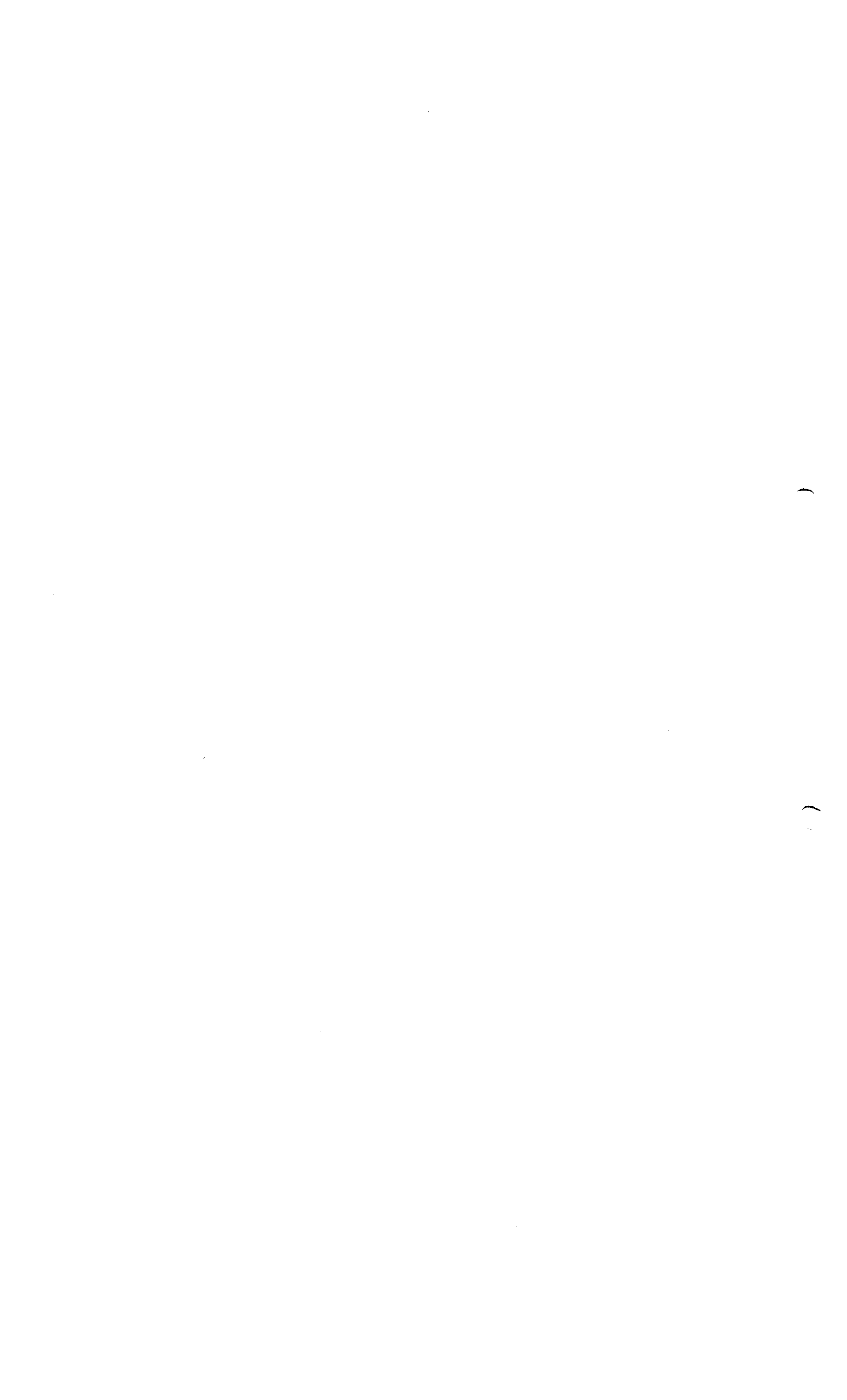
Figura 3: Diagrama de flujo de la detoxificación



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.



Antes de la solubilización, la toxina pertúsica se somete a prueba para determinar la carga biológica y el contenido de endotoxinas (vea la Tabla 3).



3.1 Solubilización de la toxina pertúsica (etapa 16)

El proceso permite la producción de lotes de PT de pequeña y gran escala.

- **Etapa 16a:** dilución con solución tampón de CTW (solución tampón de carbonato Tween). El precipitado se introduce en un 1^{er} tanque de diafiltración y se disuelve en solución tampón de CTW.
- **Etapa 16b:** diafiltración de la toxina pertúsica. Luego, el $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ se extrae mediante diafiltración con solución tampón de carbonato para obtener una solución de PT en solución tampón de carbonato.

Al final de esta etapa, se toman muestras para realizar los controles durante el proceso (vea la Tabla 3).

- **Etapa 16c:** sonicación. Los posibles agregados restantes se desestabilizan por sonicación.
- **Etapa 16d:** filtración de clarificación. La solución con antígenos se clarifica por medio de filtración (0.2 μm) y se transfiere a un tanque de detoxificación.

Al final de esta etapa, se toman muestras para realizar los controles durante el proceso (vea la Tabla 3).

3.2 Ajuste del contenido proteico (fase 17)

La concentración de toxina pertúsica se ajusta con un tampón de CTW.

3.3 Detoxificación con glutaraldehído (GTA) (etapa 18)

- **Etapa 18a:** Adición de GTA. Después de un período de incubación previa a $+37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, se realiza la detoxificación de la toxina pertúsica purificada nativa, en presencia de GTA durante 110 a 130 minutos, a $+37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ y se somete a agitación. Luego, el producto se transfiere a un 2^o tanque de diafiltración.
- **Etapa 18b:** Detención de la reacción de detoxificación. La reacción se detiene al agregar una solución de L-lisina. Para conservar el producto a $+5 \text{ }^\circ\text{C} \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$, el tanque se enfría mediante incubación en agua fría ($+5 \text{ }^\circ\text{C} \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$) y la solución se agita. El producto obtenido en esta etapa ahora se llama toxoide pertúsico (PTxd).

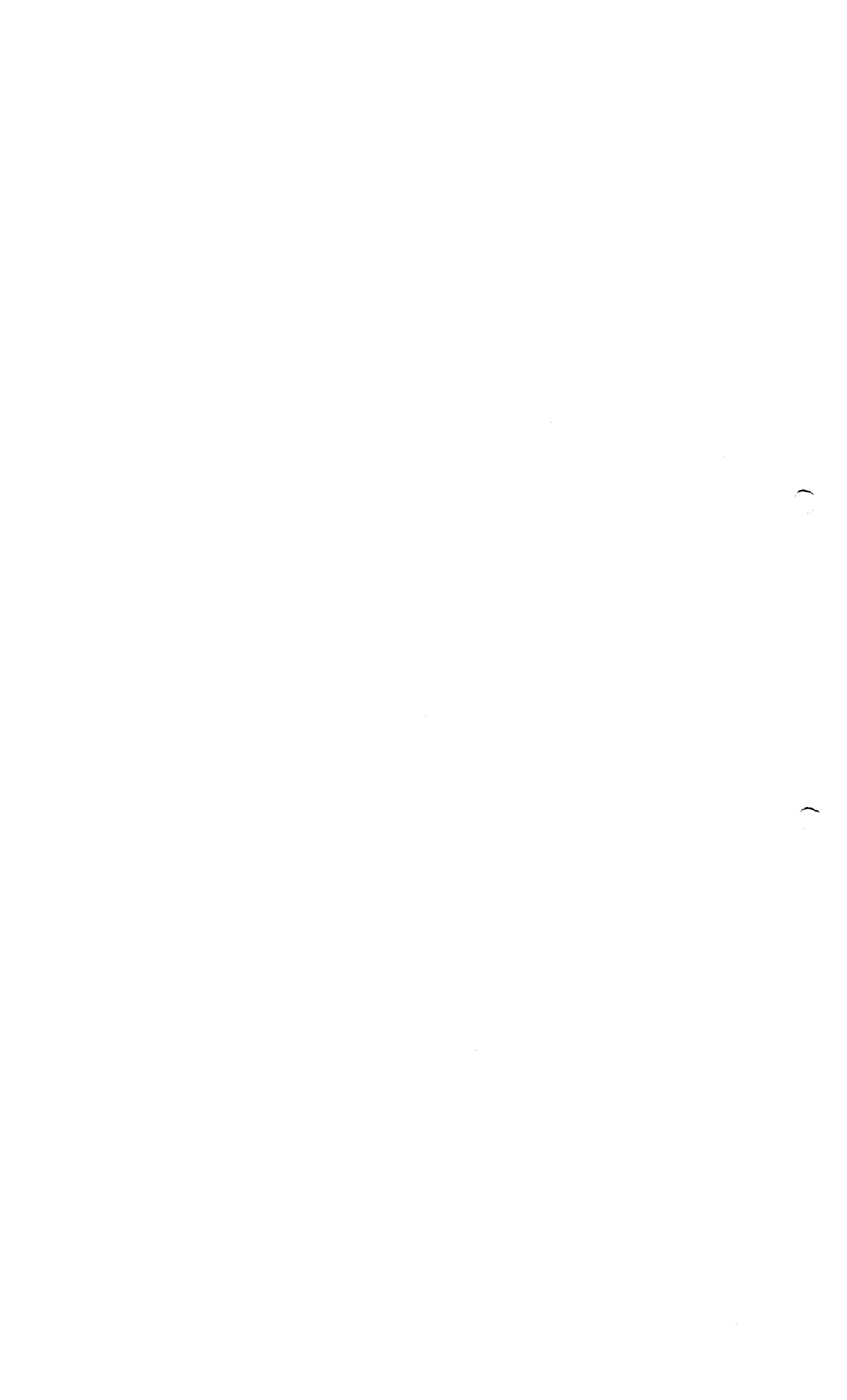
3.4 Diafiltración, sonicación y filtración previo (etapas 19 a 21)

Los reactivos residuales se extraen por diafiltración con solución tampón de carbonato (etapa 19).

En esta etapa, se recogen muestras para realizar los controles durante el proceso (vea la Tabla 3).

La solución de toxoide pertúsico luego se homogeneiza y se somete a sonicación para desestabilizar los posibles agregados (etapa 20). Después de 2 etapas de filtración previo (0,45 μm y 0,2 μm), el PTxd se transfiere a un tanque de filtración (etapa 21).

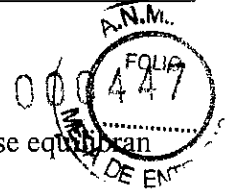
En esta etapa, se recopilan muestras para realizar los controles del proceso (vea la Tabla 3).



- Uso y reutilización de las unidades de diafiltración

Antes de su uso, las unidades de diafiltración (membrana) se enjuagan con agua y se equilibran con solución tampón de carbonato.

Después de las diafiltraciones, los 2 sistemas se enjuagan con tampón de carbonato y se limpian con hidróxido de sodio, hipoclorito de sodio y agua. Luego, se almacenan en una solución tampón de hidróxido de sodio hasta su próximo uso.



3.5 Filtración estéril (etapa 22)

Por último, el toxoide pertúsico se filtra mediante filtración estéril (0,22 μ m) y se coloca en un tanque de adsorción de 450 litros.

Cuando el tamaño del lote es superior a 210 litros, la mitad del toxoide pertúsico purificado en solución se transfiere a un segundo tanque de adsorción de 450 litros.

Se recopilan muestras para el Control de Calidad.

Luego, los tanques se almacenan a $+5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ para esperar los resultados del contenido proteico.

Al final de esta etapa, se realizan pruebas de liberación. Los métodos utilizados para estas pruebas se describen en 3.2.S.2.4 Control de los pasos críticos e intermedios.

4 Adsorción de los antígenos en hidróxido de aluminio

La adsorción en gel de hidróxido de aluminio del toxoide pertúsico purificado en solución, se realiza al final del proceso de detoxificación de manera separada de la adsorción de la FHA en solución.

Los pasos de la adsorción para la FHA y para el toxoide pertúsico purificado se encuentran en la figura 4 y figura 5 respectivamente.

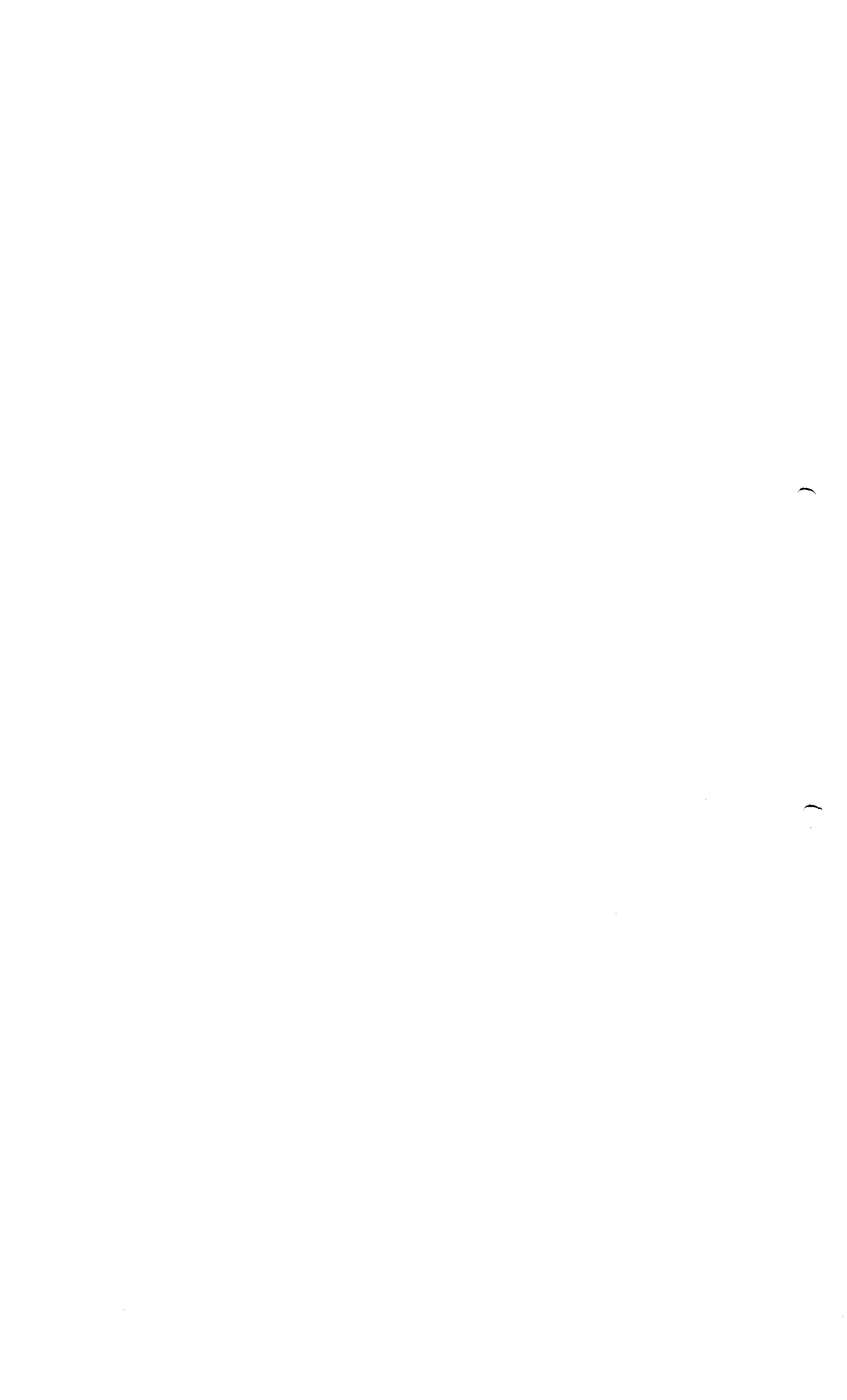
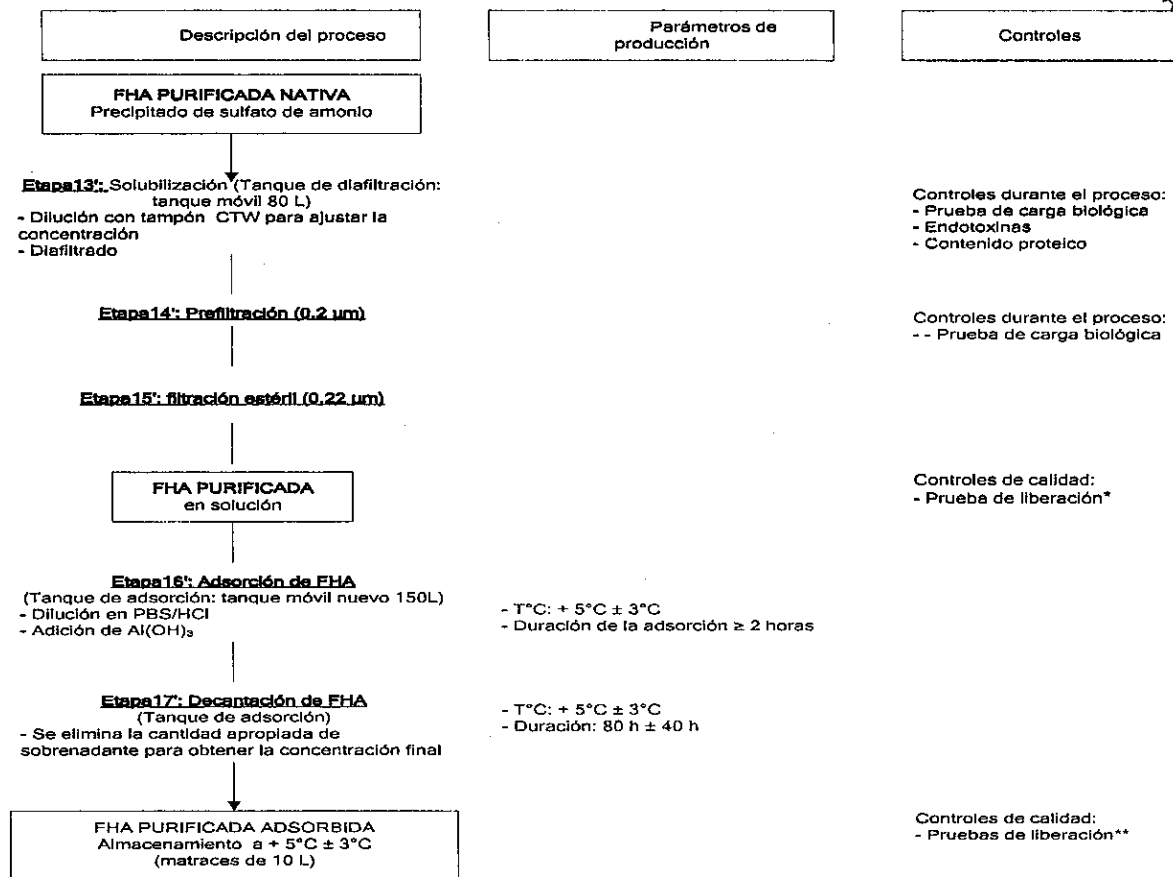




Figura 4: Diagrama de flujo de la adsorción de la FHA en hidróxido de aluminio



**Las pruebas de liberación se detallan en la sección 3.2.S.4. Control de los pasos críticos e intermedios
*Las pruebas de liberación se detallan en la sección 3.2.S.4.1 Especificación del principio activo

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.

)

)

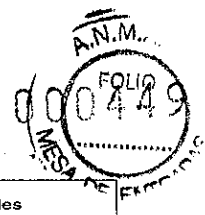
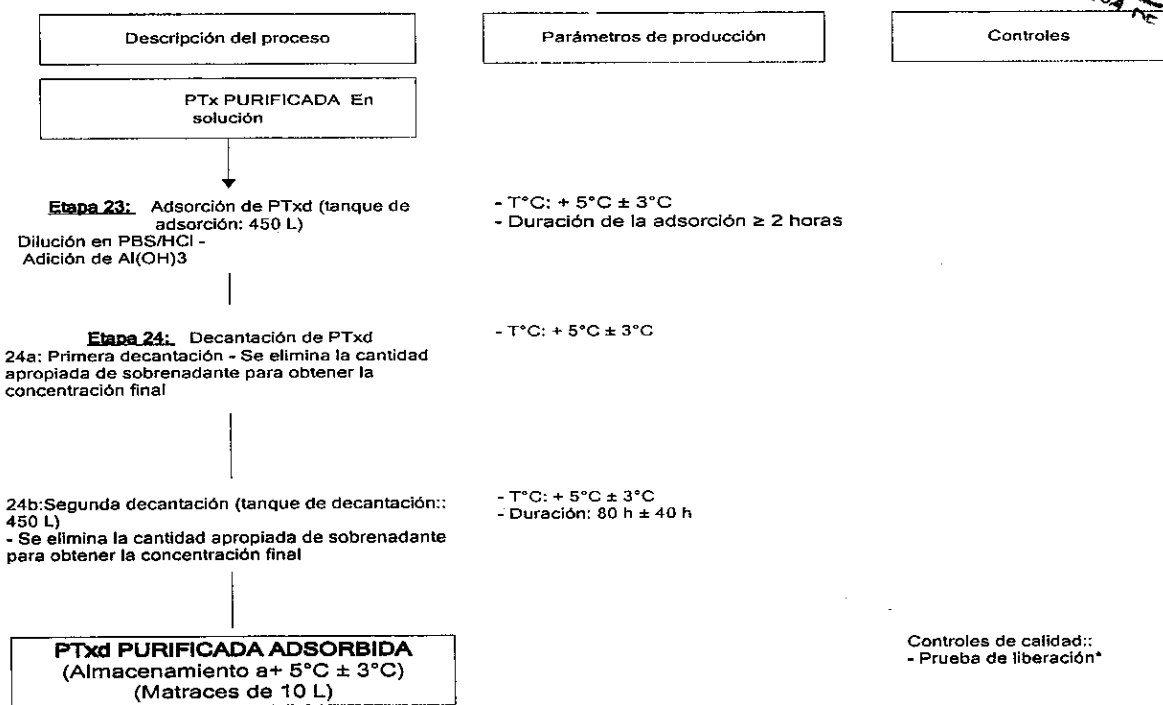




Figura 5: Diagrama de flujo de la adsorción de la PT en hidróxido de aluminio



*Las pruebas de liberación se detallan en la sección 3.2.S.4.1 - Especificación del principio activo


 ROXANA MONTEMLONE
 DIRECTORA TÉCNICA
 SANOFI PASTEUR S.A.


 CHRISTIAN DOMINGUEZ
 APODERADO
 SANOFI PASTEUR S.A.



4.1 Solubilización de la FHA (etapa 13')

Luego, se solubiliza la FHA precipitada con sulfato de amonio. De acuerdo con el tamaño del lote, se disuelve una cantidad adecuada de precipitado de FHA purificada en una solución tampón de CTW en un tanque de diafiltración, y se extrae el sulfato de amonio residual mediante diafiltración con una solución tampón de carbonato.

Al final de esta fase, se toman muestras para realizar los controles durante el proceso (vea la Tabla 4).

- Uso y reutilización de las unidades de diafiltración

Antes de su uso, los cartuchos de diafiltración se enjuagan con agua y se equilibran con solución tampón de CTW.

Después de diafiltrar la FHA, el sistema se enjuaga con solución tampón de CTW y se limpia con hidróxido de sodio, hipoclorito de sodio y agua. Luego, se almacena en una solución tampón de hidróxido de sodio hasta su próximo uso.

4.2 Filtración previa y filtración estéril (0,22 µm) de la FHA (fases 14' y 15')

La FHA purificada en solución se filtra previamente en una membrana de 0,2 µm (etapa 14') y luego se realiza una filtración estéril (0,22 µm) (etapa 15'). La FHA purificada se recolecta en el tanque de adsorción que se coloca a +5 °C ± 3 °C.

Al final del paso 14', se recogen muestras para realizar los controles durante el proceso (vea la Tabla 4).

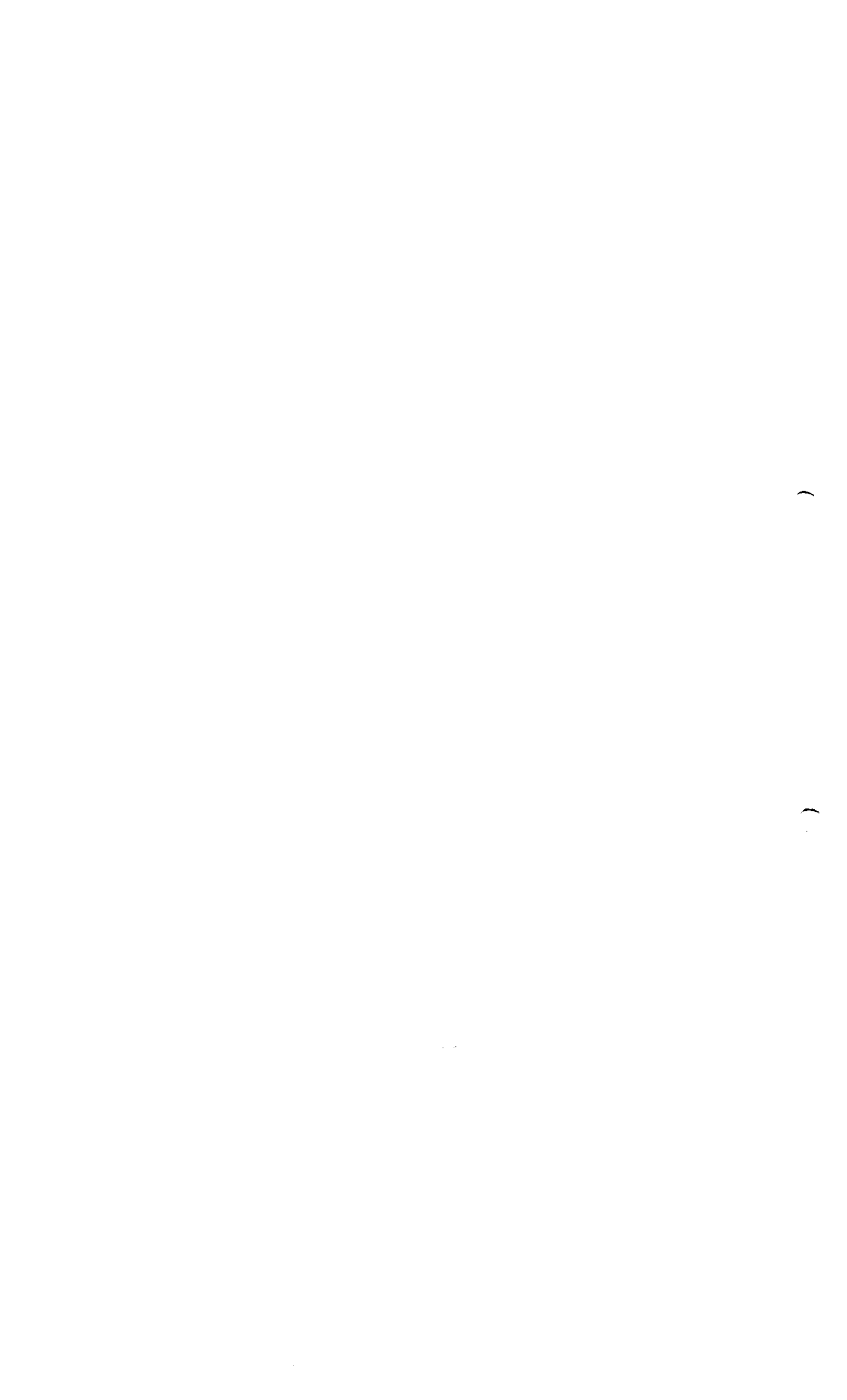
Los controles de calidad se realizan en la FHA purificada en solución (vea 3.2.S.2.4 Control de los pasos críticos e intermedios).

4.3 Adsorción de antígenos

La etapa de adsorción es idéntica en el caso de los dos antígenos (etapa 16' para la FHA en solución y etapa 23 para el toxoide pertúsico purificado en solución). Cada antígeno, por separado, (toxoides pertúsicos purificados en solución y FHA purificada en solución) se diluye con solución salina tamponada con fosfato ácido (PBS/HCl). Luego, se adsorben en hidróxido de aluminio y se agitan durante, al menos, 2 horas antes de almacenarlos a +5 °C ± 3 °C.

4.4 Decantación (etapa 17' para la FHA y etapa 24 para el PTxd)

Los dos graneles monovalentes se concentran por decantación. Se realizan dos decantaciones consecutivas para el toxoide pertúsico, con el fin de obtener la concentración final. Según el tamaño del lote en esta etapa, entre 15 y 75 litros, los antígenos (FHA o PTxd) purificados adsorbidos finales, se distribuyen en matraces de 10 litros y de 1 litro para respetar, al menos, el 80 % del llenado. Los matraces de 1 litro se utilizan para reducir el volumen de espacio libre y, por ende, las variaciones de pH causadas por la volatilidad del CO₂ de la solución tampón de CTW.



Luego los antígenos adsorbidos se almacenan a $+5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$.

Se toman muestras para las pruebas de liberación (vea 3.2.S.4.1 Especificación).



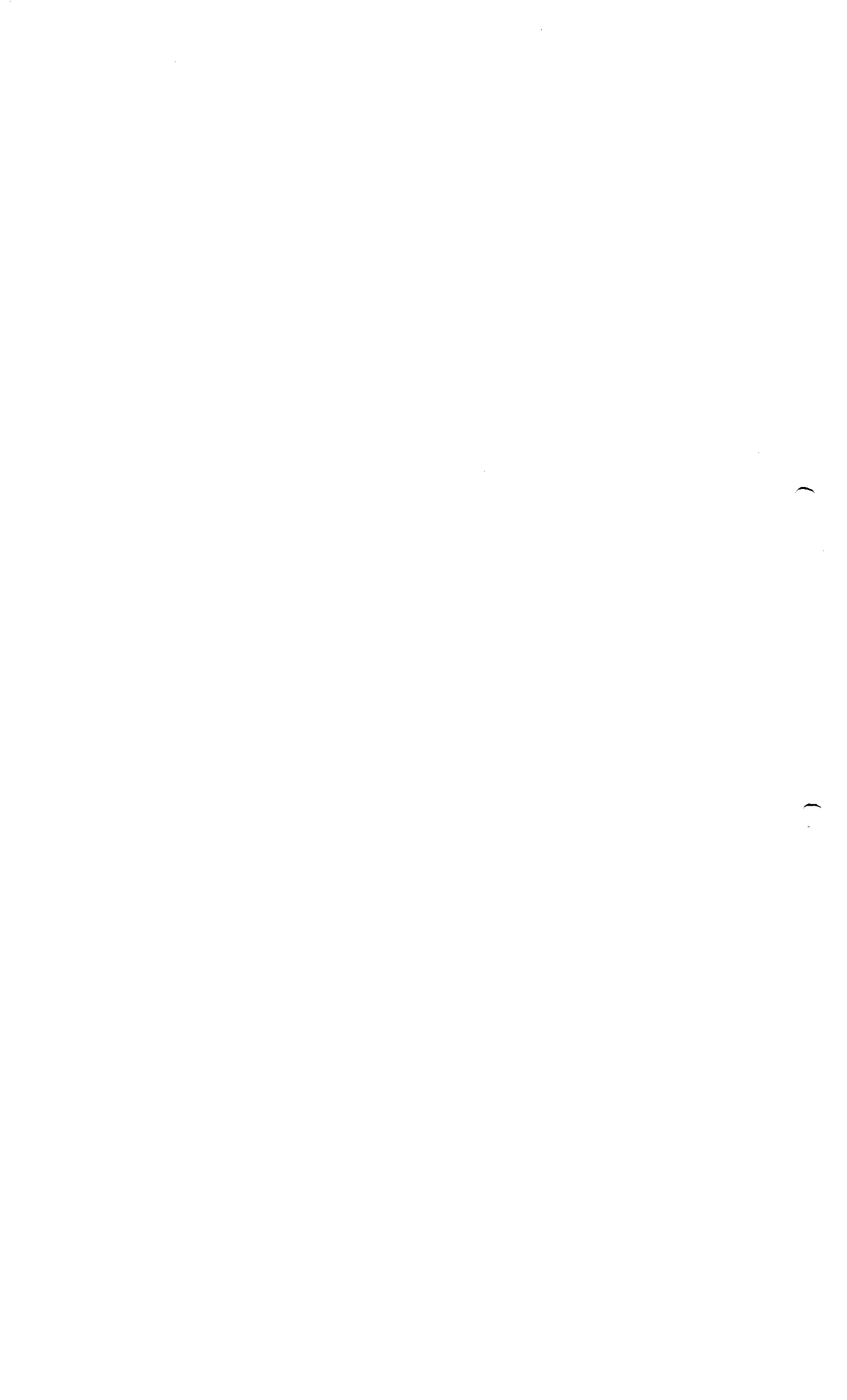
5 Condiciones de llenado y almacenamiento

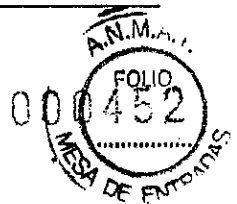
Los productos intermedios, FHA purificada nativa y PT purificada nativa, se almacenan en matraces de vidrio de 10 litros a $+5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$, durante 48 meses (vea 3.2.S.2.4 Control de los pasos críticos e intermedios).

Los productos intermedios, FHA purificada en solución y PTxd purificado en solución, no se someten a un proceso de almacenamiento y, por lo tanto, no se proporcionan datos de estabilidad en la sección 3.2.S.2.4 Control de los pasos críticos e intermedios.

Los antígenos adsorbidos purificados (PTxd y FHA) se almacenan en matraces de vidrio tipo I de 10 litros y de 1 litro, y se tapan con una tapa de polipropileno (con montura de acero inoxidable [vea 3.2.S.6 Sistema de cierre del envase]).

El principio activo se puede almacenar a $+5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ durante 48 meses (vea 3.2.S.7.1 Resumen y conclusiones sobre la estabilidad).





6 Controles durante el proceso

6.1 Panorama de los controles durante el proceso aplicados a la purificación de la PT

Los controles durante el proceso aplicados a la purificación de la PT se proporcionan en la Tabla 1.

Tabla 1: Controles durante el proceso de purificación de la PT

Pasos de elaboración	Controles durante el proceso		
	Pruebas	Criterios de aceptación/límites	Justificación
Filtración de cultivo concentrado	Prueba de carga biológica	≤ 900 UFC/mL	Seguimiento de la contaminación biológica
Fase 9: Recuperación de la PT	Título de hemaglutinación (HA)	0% de inhibición de HA en presencia de colesterol	Evaluación de la actividad específica
Fase 12: Eliminación del sobrenadante ASF-4B	Título de hemaglutinación (HA)	0% de inhibición de HA en presencia de colesterol	Evaluación de la actividad específica
Fase 14a: elución de las fracciones de PT	SDS-PAGE	Perfil electroforético comparable con el perfil de la referencia (5 bandas entre 30 y 14 kDa)	Selección de las fracciones de elución que contienen PT y evaluación de la actividad específica
	Título de hemaglutinación (HA)	≤ 20% de inhibición de HA en presencia de colesterol	
	Contenido proteico según el método BCA	Para cálculos	
Fase 14b: agrupación de materiales eluidos	Prueba de carga biológica	≤ 500 UFC/mL	Seguimiento de la contaminación biológica
	Título de hemaglutinación (HA)	≤ 20% de inhibición de HA en presencia de colesterol	Evaluación de la actividad específica
	Contenido proteico según el método BCA	Para cálculos	Cuantificación del antígeno purificado






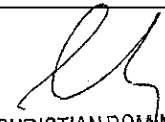
6.2 Panorama de los controles durante el proceso aplicados a la purificación de la FHA

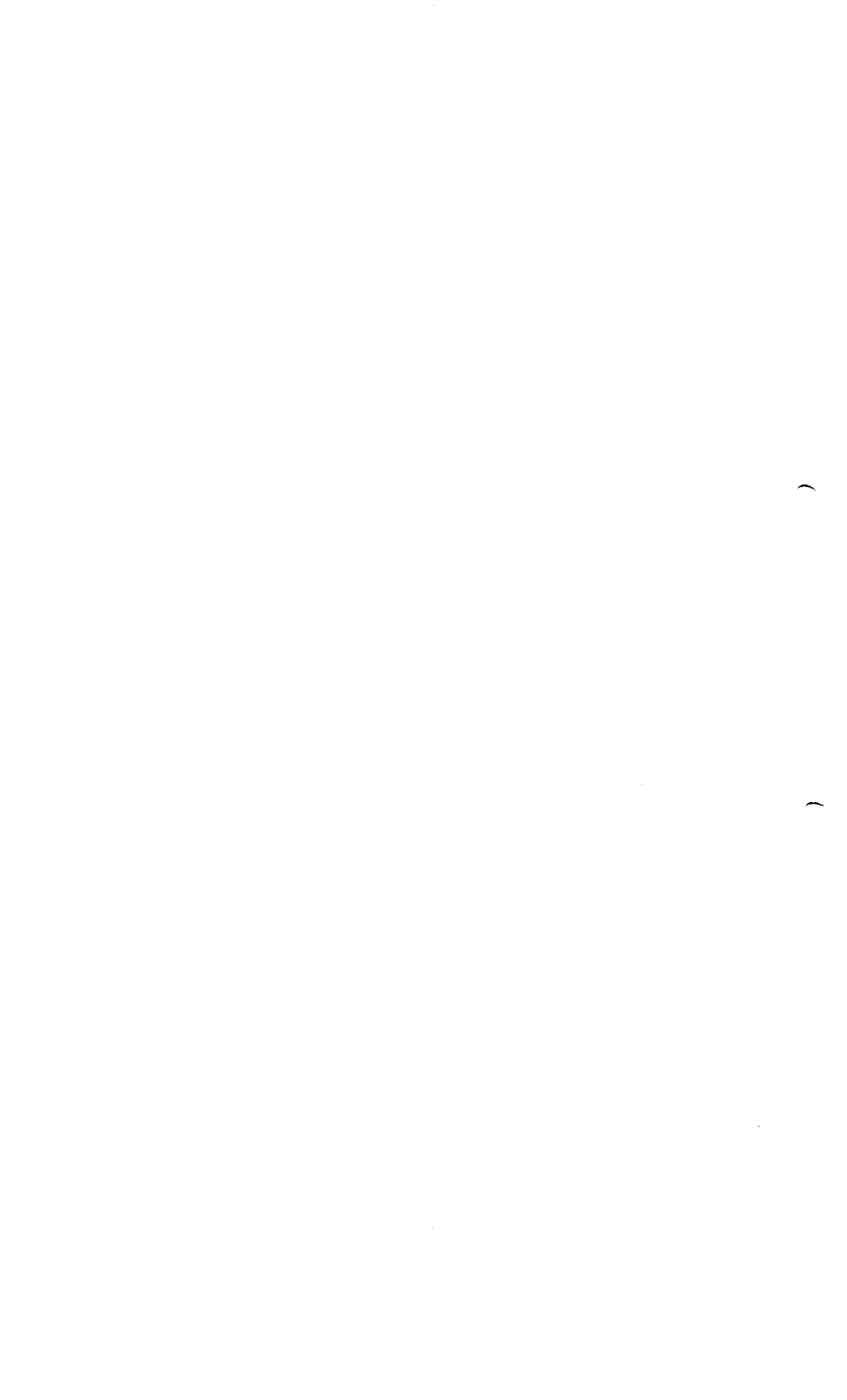
Los controles durante el proceso aplicados a la purificación de la FHA se proporcionan en la Tabla 2.

Tabla 2: Controles durante el proceso de purificación de FHA

Pasos de elaboración	Controles durante el proceso		
	Pruebas	Criterios de aceptación/límites	Justificación
Etapa 10 ^b : Elución de FHA	Título de hemaglutinación	≥ 90% de inhibición de HA en presencia de colesterol	Selección de las fracciones de elución que contienen FHA y evaluación de la actividad específica
	SDS-PAGE	Perfil electroforético comparable con el perfil de referencia (una banda principal a aproximadamente 220 kDa > 70 % y algunas bandas secundarias)	
	Contenido proteico según el método BCA	Para cálculos	Cuantificación del antígeno purificado
Etapa 11 ^b : agrupación de materiales eluidos	Título de hemaglutinación	≥ 90% de inhibición de HA en presencia de colesterol	Evaluación de la actividad específica
	Contenido proteico según el método BCA	Para cálculos	Cuantificación del antígeno purificado
	Prueba de carga biológica	≤ 10 ⁴ UFC/mL	Control de la contaminación biológica


 ROXANA MONTEMILONE
 DIRECTORA TÉCNICA
 SANOFI PASTEUR S.A.


 CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
 APODERADO
 SANOFI PASTEUR S.A.



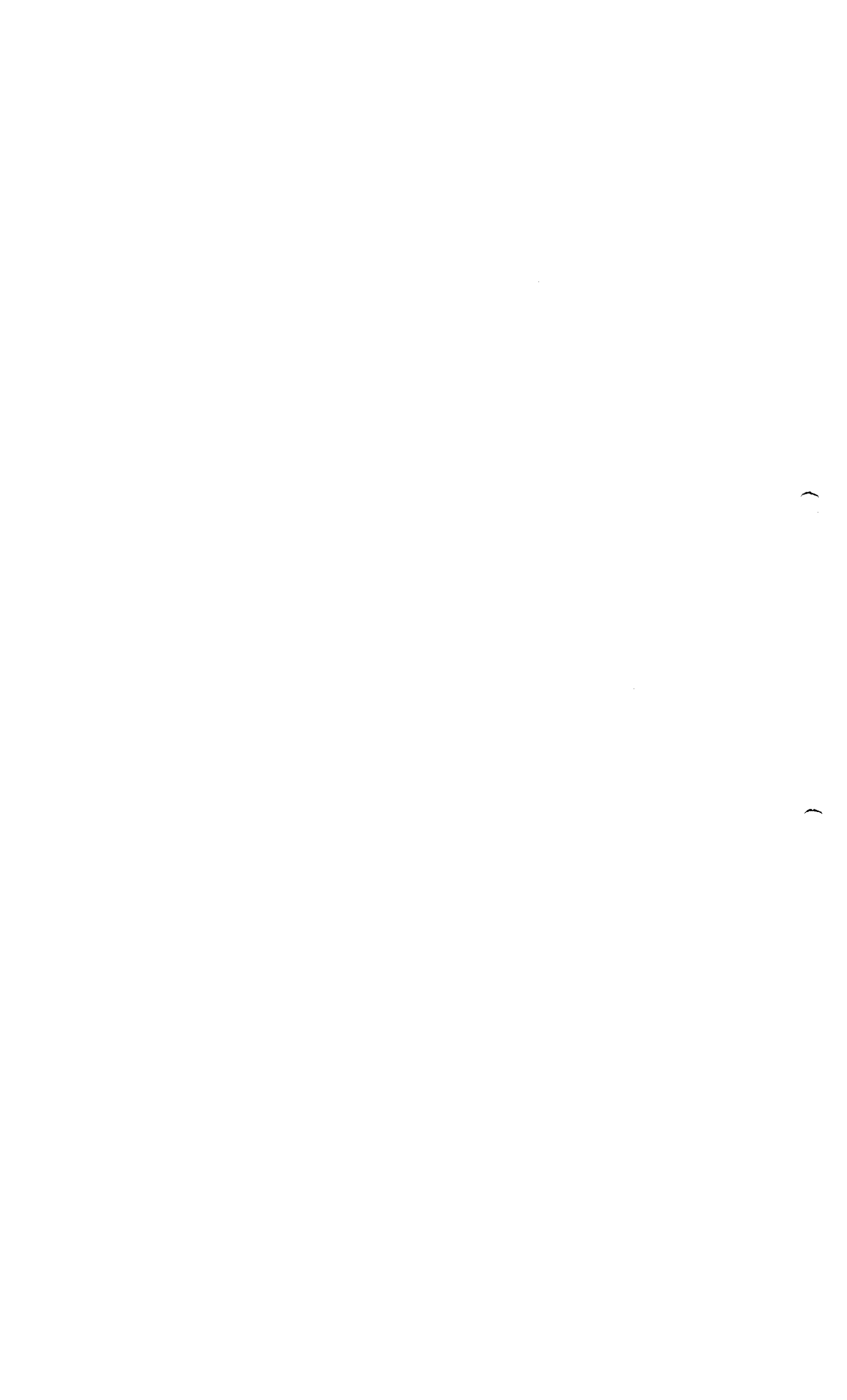


6.3 Panorama de los controles durante el proceso aplicados durante la detoxificación de PT

Los controles durante el proceso aplicados durante la detoxificación de PT se proporcionan en la Tabla 3.

Tabla 3: In-Process Controls during Detoxification of PT

Pasos de elaboración	Controles durante el proceso		
	Pruebas	Criterios de aceptación/límites	Justificación
Toxina pertúsica purificada nativa (precipitado de sulfato de amonio)	Prueba de carga biológica	≤ 200 UFC/mL	Control de la carga biológica
	Contenido de endotoxinas	≤ 10 ⁵ UI/mL	Control de endotoxinas
Fase 16: Solubilización de la PT	Contenido proteico mediante el método de Lowry, después de la 1. ^a diafiltración	590 a 1300 µg/mL	Control del rendimiento intermedio
	Contenido proteico mediante el método de Lowry, después de la diafiltración	560 a 1310 µg/mL	Control del rendimiento intermedio y ajuste de la concentración proteica a 200 ± 50 µg/mL
Fase 19: Diafiltración del toxoide pertúsico	Contenido proteico mediante el método de Lowry, después de la 2. ^a diafiltración	90 a 164 µg/mL	Control del rendimiento intermedio
Fase 21: Filtración previo del toxoide pertúsico	Prueba de carga biológica	≤ 50 UFC/10 mL	Control de la carga biológica en la última fase antes del filtración estéril final (0,22 µm)



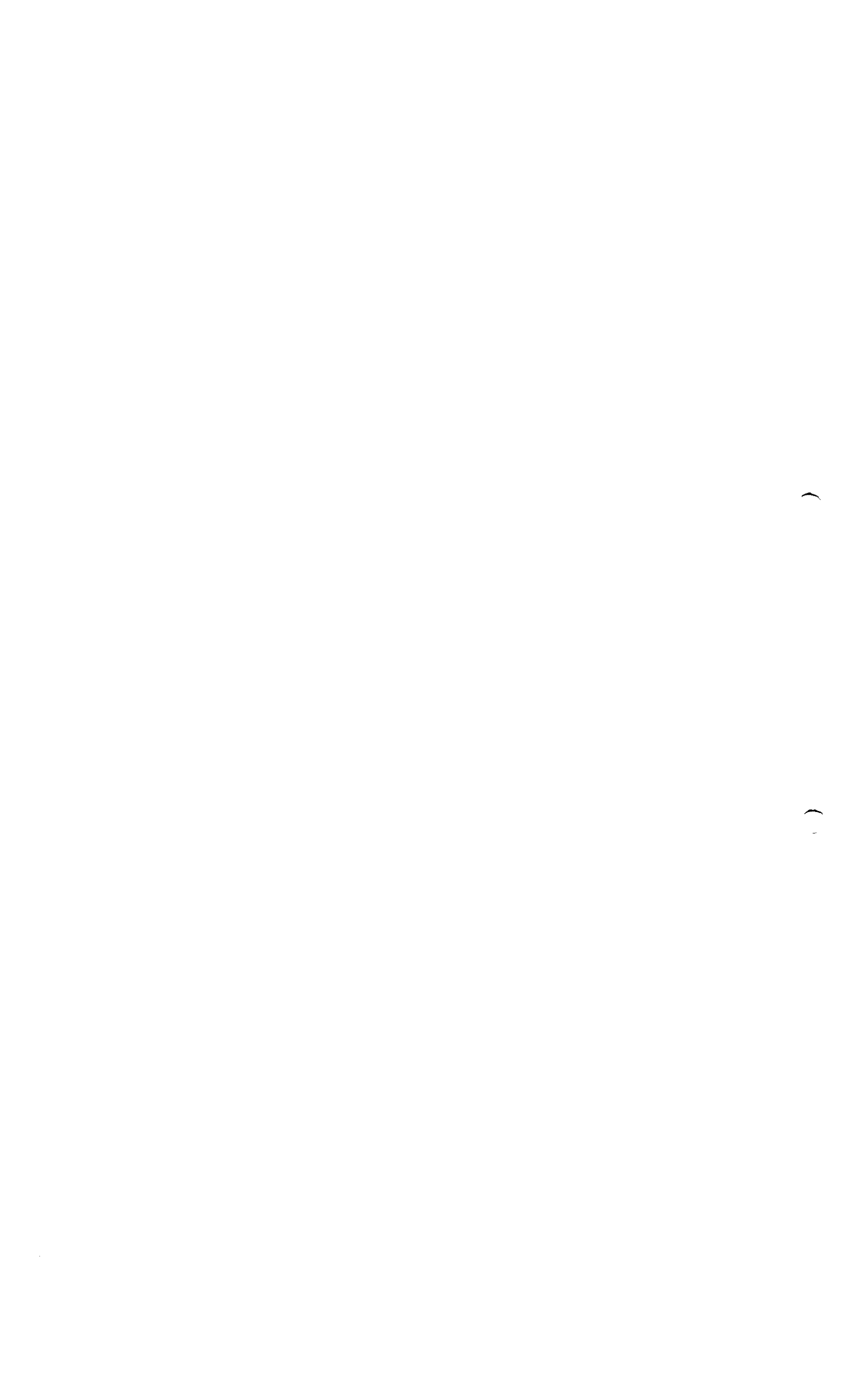


6.4 Panorama de los controles durante el proceso aplicados a la adsorción de los antígenos en hidróxido de aluminio

Los controles durante el proceso aplicados a la adsorción de los antígenos se proporcionan en la Tabla 4.

Tabla 4: Controles durante el proceso de adsorción de antígenos

Pasos de elaboración	Controles durante el proceso		
	Pruebas	Criterios de aceptación/límites	Justificación
Etapa 13': Solubilización de la FHA	Prueba de carga biológica	≤ 200 UFC/mL	Control de la contaminación biológica
	Contenido de endotoxinas	≤ 400 UI/mL	Control de endotoxinas
	Contenido proteico según el método de Lowry	520 a 1400 μ g/mL	Control del rendimiento intermedio
Etapa 14': Filtración previa de la FHA	Prueba de carga biológica	≤ 50 UFC/10 mL	Control de la carga biológica en la última fase antes del filtración estéril (0,22 μ m)





7 Composición de los tampones y de otros aditivos utilizados durante la purificación

7.1 Composición de los tampones y de las soluciones utilizadas durante el proceso

7.1.1 Tampón de fosfato

- Fosfato dihidrógeno de sodio dihidratado
- Fosfato disódico dihidratado
- Agua purificada

La solución se filtra en una membrana de 0,2 μm .

7.1.2 Tampón de fosfato, NaCl

- Fosfato dihidrógeno de sodio dihidratado
- Fosfato disódico dihidratado
- Cloruro de sodio
- Agua purificada

La solución se filtra en una membrana de 0,2 μm .

7.1.3 Tampón de carbonato-Tween (CTW)

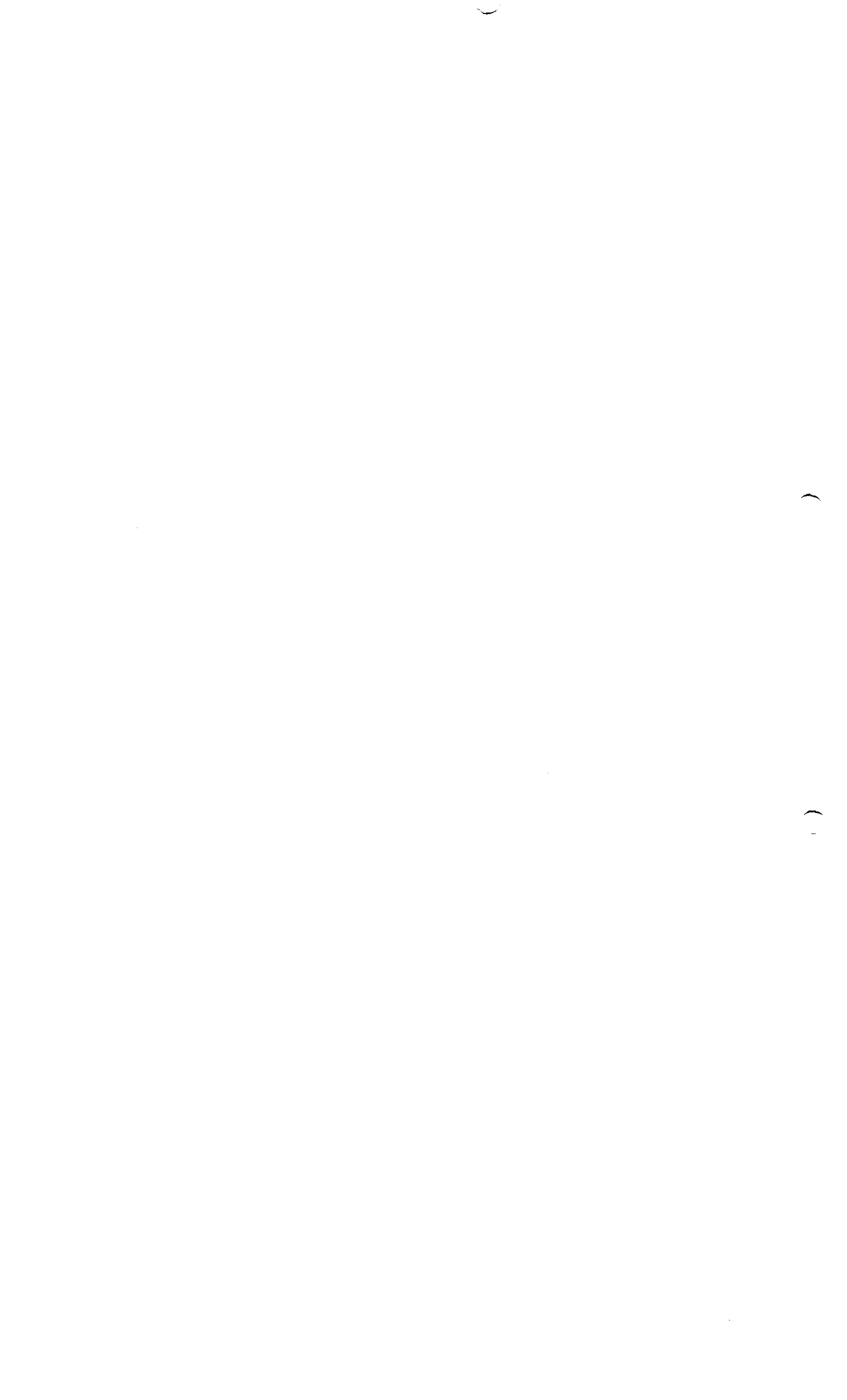
- Carbonato ácido de sodio
- Carbonato de sodio decahidratado
- Tween 80
- Agua purificada

La solución se filtra en una membrana de 0,2 μm .

7.1.4 Tampón de carbonato

- Carbonato de sodio anhidro
- Carbonato ácido de sodio
- Agua purificada

La solución se filtra en una membrana de 0,2 μm .





7.1.5 L-lisina

- Base de L-lisina
- Tampón de CTW

7.1.6 Solución salina tamponada con fosfato ácido (PBS/HCl) (Solución tamponada con fosfato)

- Cloruro de sodio
- Fosfato disódico dihidratado
- Fosfato de potasio dihidrogenado
- HCl 12N
- Agua purificada

La solución se filtra en una membrana de 0,2 µm.

7.2 Preparación de la asialofetuina-sefarosa CL-4B (ASF-4B)

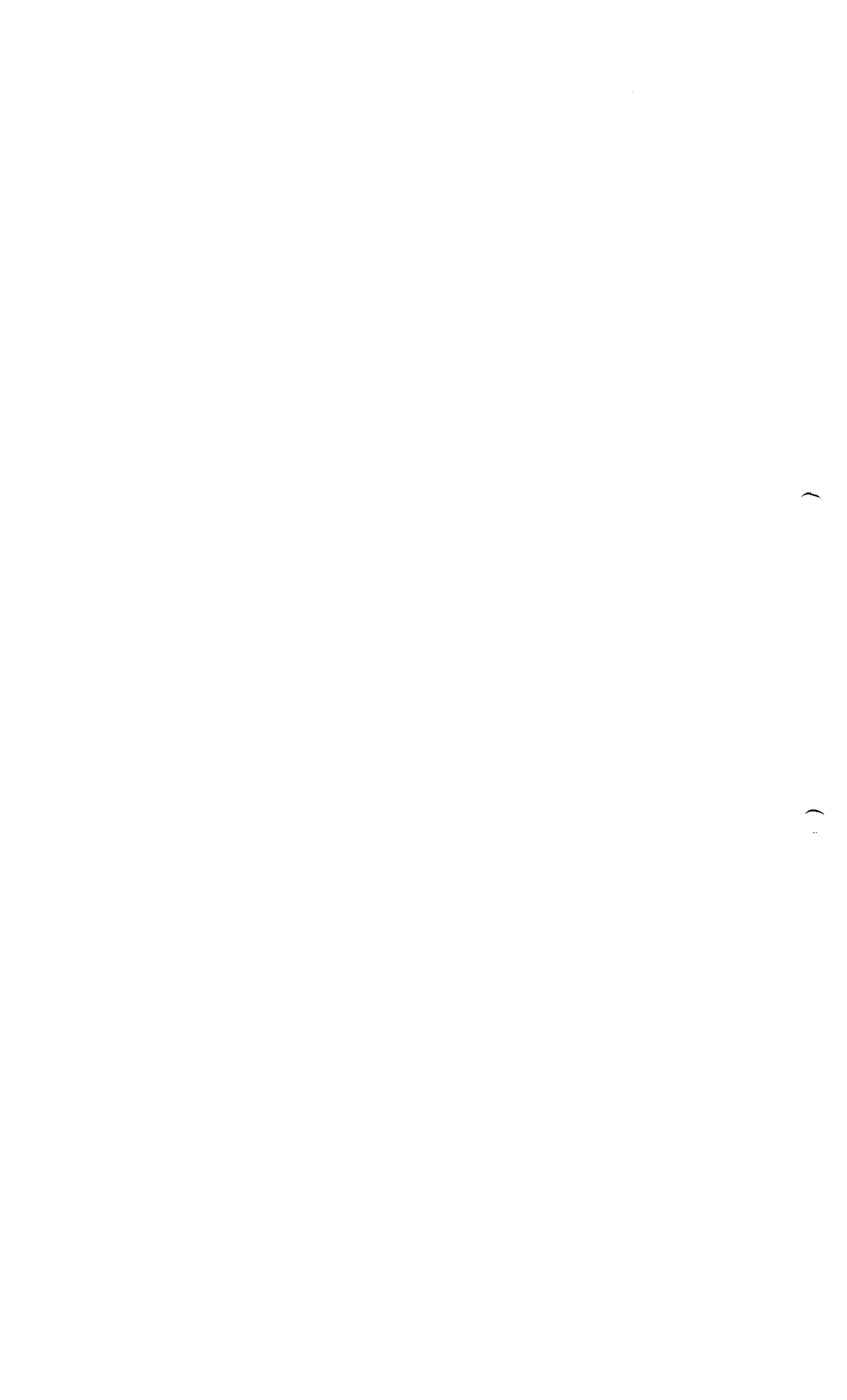
El procedimiento de purificación para los componentes de la vacuna acelular contra la tos ferina se basa principalmente en la cromatografía de afinidad con un soporte de asialofetuina-sefarosa CL-4B. La asialofetuina se produce mediante la desialilación de una solución de fetuina purificada.

La fetuina se prepara a partir de un suero bovino fetal tanto para la fetuina preparada internamente como para la fetuina que se compra a un proveedor externo.

La fetuina preparada internamente se produce por precipitaciones secuenciales de suero bovino fetal en etanol frío, en presencia de metales pesados. Luego, el producto derivado del paso anterior se somete a diafiltración con agua purificada y a cromatografía de interacción hidrofóbica en soporte C16 o C18. Posteriormente, las proteínas se eluyen con ácido fórmico. Las fracciones cromatográficas se agrupan y se dializan con una solución de acetato de potasio. La fetuina purificada se obtiene después de la cromatografía de intercambio iónico (DEAE) y se eluye con acetato de potasio.

Para extraer el ácido siálico de la proteína y obtener la asialofetuina, la fetuina purificada se hidroliza con ácido sulfúrico (H₂SO₄) y se concentra por diafiltración. La asialofetuina luego se enlaza de manera covalente con sefarosa CL4B activada con bromuro de cianógeno (CNBr) (GE Healthcare).

La fetuina comercial se prepara a partir de suero bovino fetal por fraccionamiento con sulfato de amonio. La asialofetuina purificada y la asialofetuina-sefarosa CL-4B obtenidas de este modo se controlan de acuerdo con las especificaciones descritas en la Tabla 5 y en la Tabla 6, respectivamente.



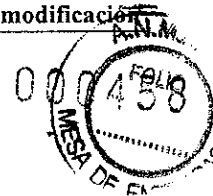
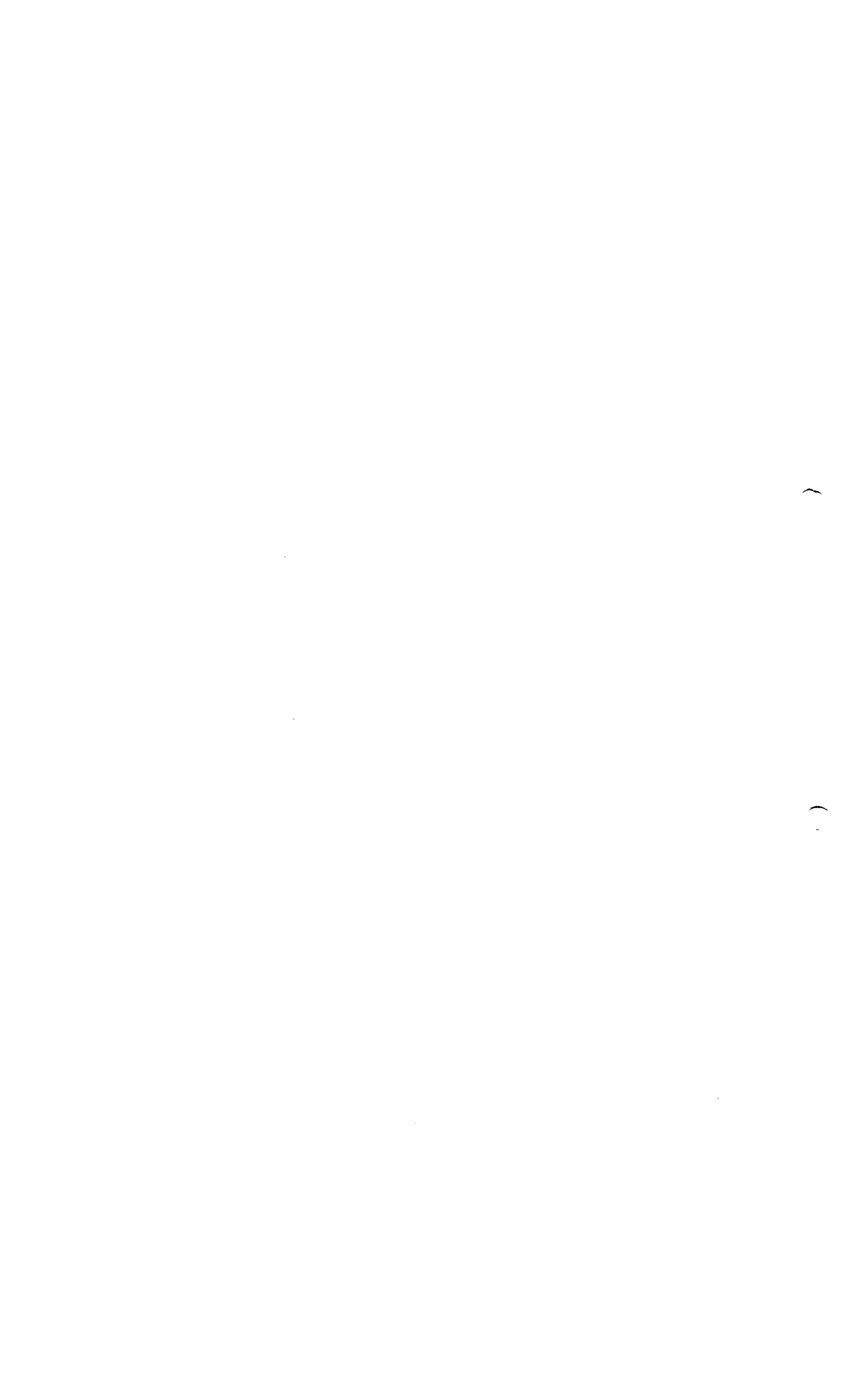


Tabla 5: Pruebas realizadas en la asialofetina

Control durante el proceso	Criterios de aceptación
Contenido proteico	Para cálculo
SDS-PAGE (en condiciones de no reducción, tinción con azul de Coomassie)	Dos bandas principales de aproximadamente 54 a 60 kDa y de 48 a 54 kDa
Contenido de ácido siálico	Reducción del 75 % del contenido de ácido siálico comparado con la fetina correspondiente

Tabla 6: Pruebas realizadas en la asialofetina sefarosa CL-4B

Control durante el proceso	Criterios de aceptación
Prueba de adsorción de la PT purificada nativa en sefarosa ASF-4B	Adsorción de 0,2 mg de PT purificada nativa por mL de base de gel (determinada por HA antes y después de la adsorción)



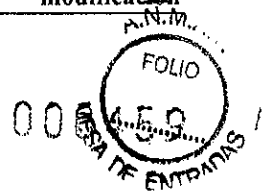
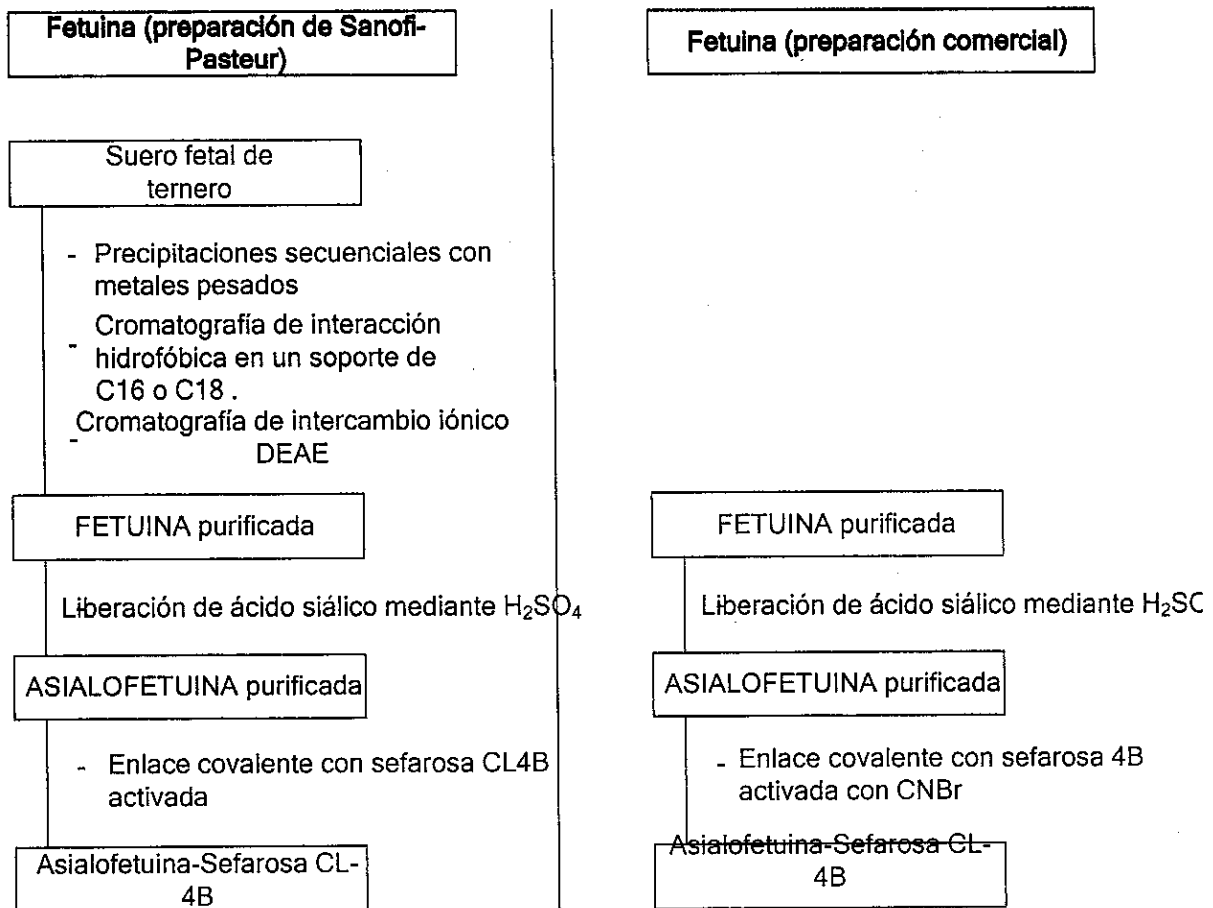
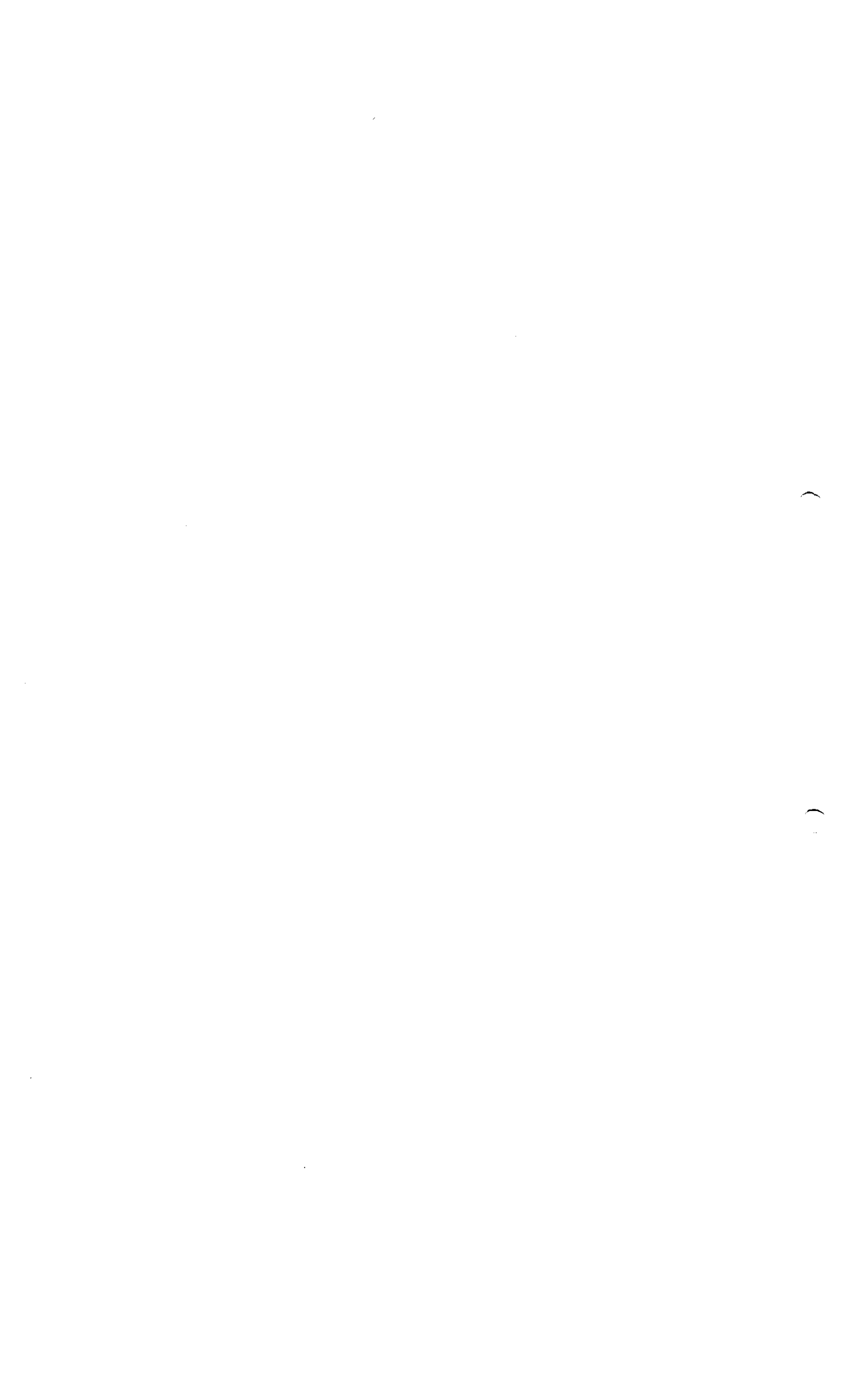


Figura 6: Preparación de la asialofetuina sefarosa CL-4B (ASF-4B)




ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.




CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.

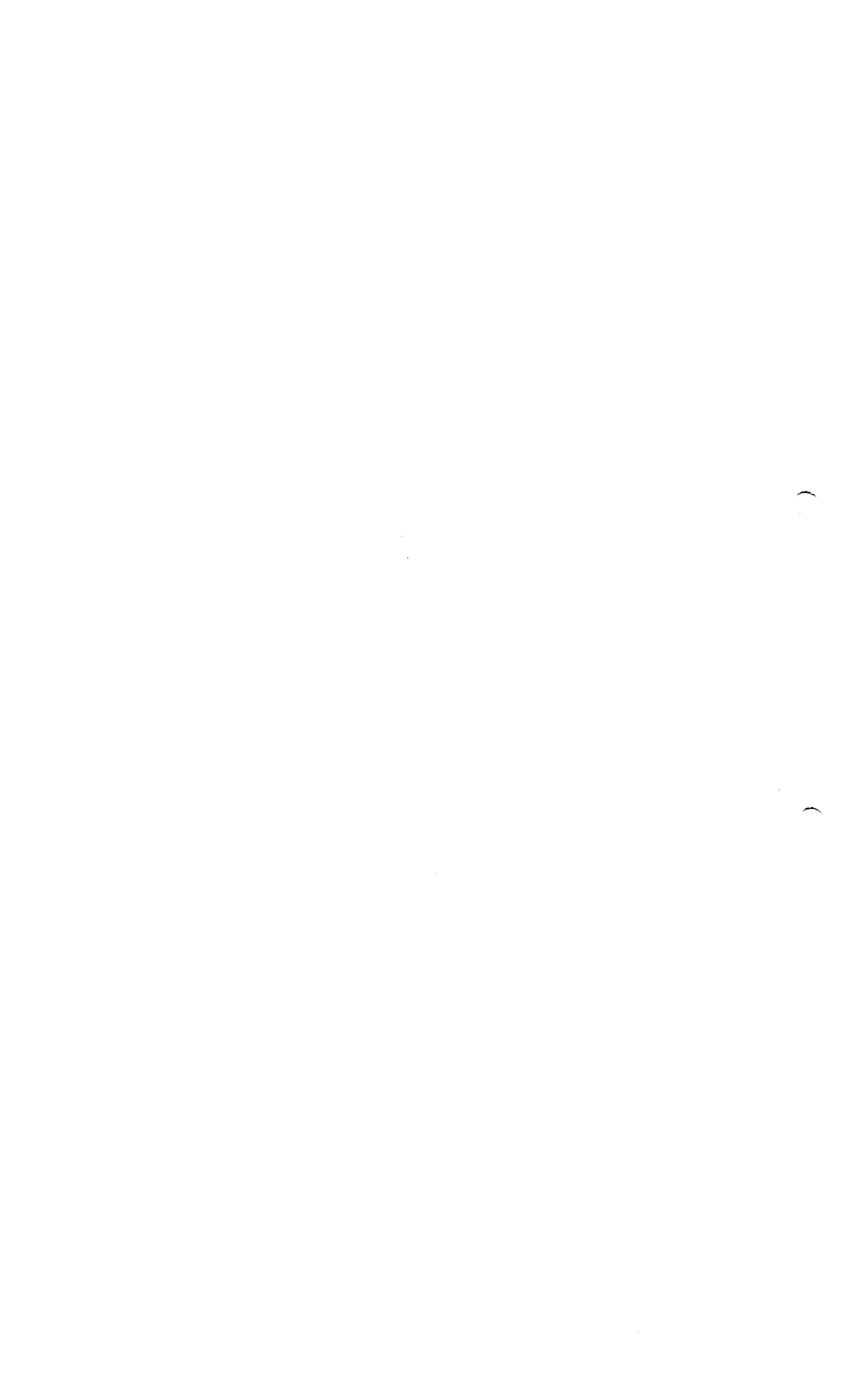




3.2.S.2.4

Control de los Pasos Críticos e Intermedios - FHA PTxd

	
ROXANA MONTEMILONE	CHRISTIAN DOMINGUEZ
DIRECTORA TÉCNICA	APODERADO
SANOPI PASTEUR S.A.	SANOPI PASTEUR S.A.






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

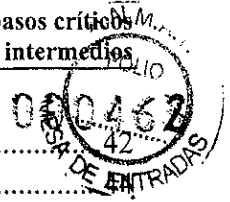
Índice

Lista de tablas	3
Lista de figuras	7
1 Panorama	8
2 Pasos críticos	8
3 Intermedios	10
3.1 Especificaciones	10
3.2 Procedimientos analíticos	12
3.2.1 Contenido proteico	13
3.2.2 SDS-Page	15
3.2.3 Identificación de la FHA y de la toxina pertúsica	15
3.2.4 Actividad de agrupamiento en las células CHO	16
3.2.5 Actividad de hemaglutinación	18
3.2.6 Antigenicidad: titulación de la FHA y del toxoide pertúsico (PTxd) por ELISA	20
3.2.7 Contenido de endotoxinas	22
3.2.8 Contenido de glutaraldehído residual	22
3.2.9 Prueba de irreversibilidad para el toxoide pertúsico	24
3.3 Validación de los procedimientos analíticos	25
3.3.1 Identificación de la FHA y de la toxina pertúsica	25
3.3.1.1 Principio	25
3.3.1.2 Especificidad	25
3.3.1.3 Conclusión	26
3.3.2 Actividad de agrupamiento en células CHO	26
3.3.2.1 Validación en la toxina pertúsica purificada nativa	26
3.3.2.2 Validación en la FHA purificada nativa y en el toxoide pertúsico purificado en solución	32
3.3.3 Actividad de hemaglutinación	34
3.3.3.1 Panorama	34
3.3.3.2 Especificidad	36
3.3.3.3 Linealidad	38


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.





3.3.3.4 Exactitud 47

3.3.3.5 Precisión 47

3.3.3.6 Conclusión 47

3.3.4 Antigenicidad: Titulación del toxoide pertúsico y de la FHA por el método ELISA 47

3.3.4.1 Validación en la etapa de toxoide pertúsico purificado en solución 47

3.3.4.2 Validación en la etapa de FHA purificada en solución 55

3.3.5 Contenido de glutaraldehído residual 62

3.3.5.1 Panorama 62

3.3.5.2 Límite de cuantificación 62

3.3.5.3 Conclusión 64

3.4 Análisis de lote 65

3.4.1 Datos de los análisis de lote para los intermedios de la FHA purificada adsorbida 65

3.4.2 Datos del análisis de lote para los intermedios de toxoide pertúsico purificado adsorbido 66

3.5 Justificación de las especificaciones 68

3.6 Sistema de cierre del envase 71

3.6.1 Identidad de los materiales de construcción 71

3.6.2 Idoneidad 72

3.7 Estabilidad 72

3.7.1 Estabilidad de la FHA purificada nativa 72


3.7.1.1 Resumen y conclusiones sobre la estabilidad 72


3.7.1.2 Datos de estabilidad de la FHA purificada nativa 74

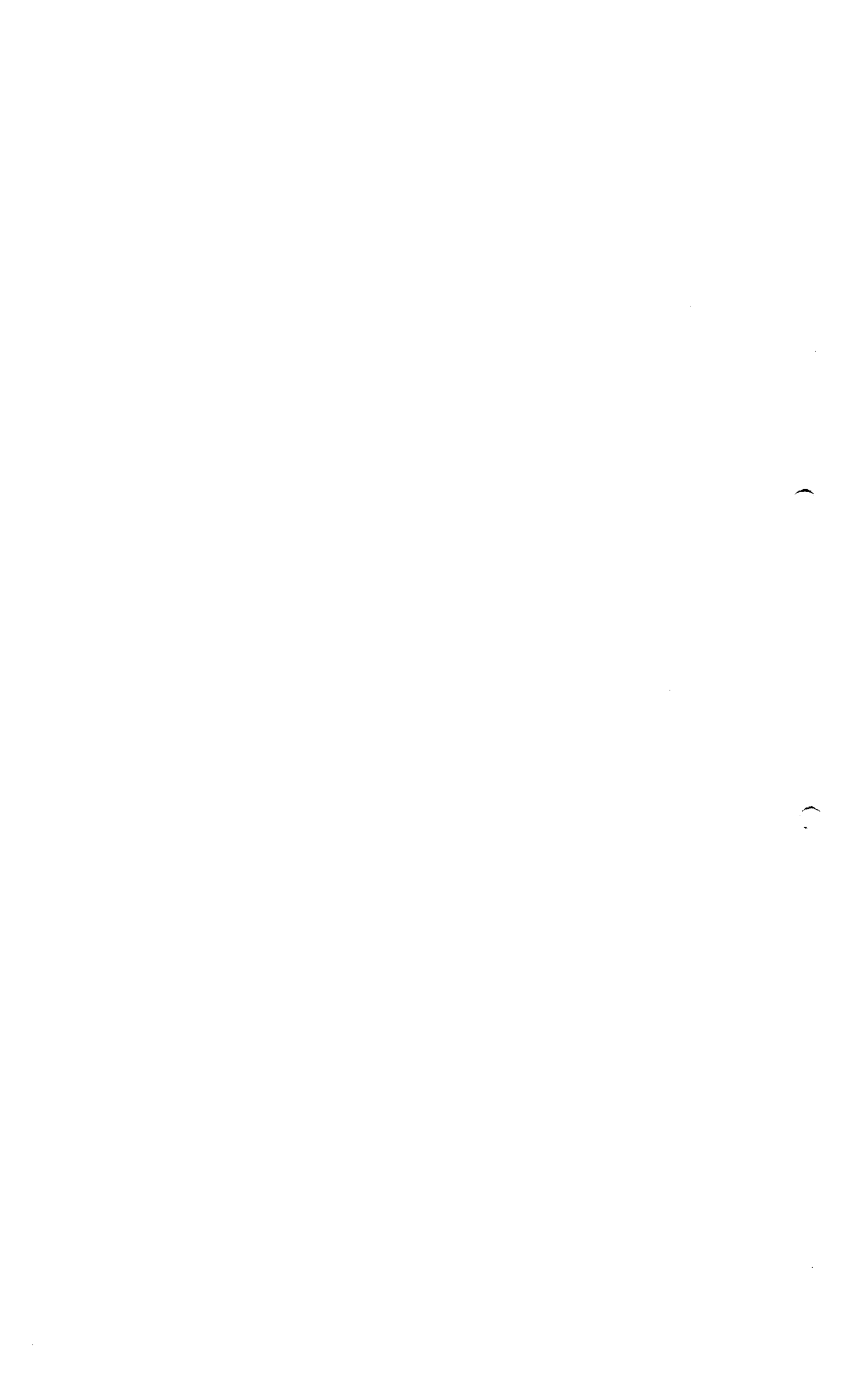
3.7.2 Estabilidad de la toxina pertúsica purificada nativa 81

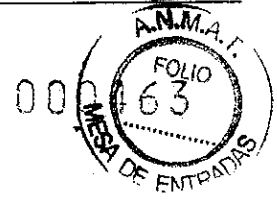
3.7.2.1 Resumen y conclusiones sobre la estabilidad 81

3.7.2.2 Datos de estabilidad de la PT purificada nativa 83


 ROXANA MONTEMILONE
 DIRECTORA TÉCNICA
 SANOFI PASTEUR S.A.


 CHRISTIAN DOMINGUEZ
 APODERADO
 SANOFI PASTEUR S.A.





Lista de tablas

Tabla 1: Pasos críticos del proceso de elaboración de la vacuna contra la tos ferina, acelular, de dos componentes (FHA-PTxd).....	9
Tabla 2: Especificaciones para la FHA purificada nativa	10
Tabla 3: Especificaciones para la FHA purificada en solución.....	11
Tabla 4: Especificaciones para la toxina pertúsica purificada nativa.....	11
Tabla 5: Especificaciones para el toxoide pertúsico purificado en solución.....	11
Tabla 6: Panorama de las pruebas realizadas en los intermedios.....	12
Tabla 7: Reactivos usados en la prueba de antigenicidad	20
Tabla 8: Criterios de validez aplicados a la prueba de antigenicidad.....	22
Tabla 9: Resultados de validación obtenidos sobre la especificidad para los antisueros de la FHA y de la PT.....	25
Tabla 10: Actividad de agrupamiento en células CHO en la etapa de toxina pertúsica (PT) purificada nativa: resumen de validación	27
Tabla 11: Linealidad, dilución inversa con 100 % de agrupamientos (promedio de 4 determinaciones).....	28
Tabla 12: Exactitud, factor de concentración calculado.....	30
Tabla 13: Exactitud, porcentaje de recuperación medio	30
Tabla 14: Precisión, actividad de la toxina (CPU/ μ g de proteínas)	31
Tabla 15: Precisión, características de repetibilidad y precisión intermedia.....	32
Tabla 16: Actividad de agrupamiento en células CHO en la FHA purificada nativa y en el toxoide pertúsico purificado en solución, resumen de validación.....	33
Tabla 17: Datos sin procesar en la etapa de la FHA purificada nativa.....	33
Tabla 18: Datos sin procesar en la etapa de toxoide pertúsico purificado	34
Tabla 19: Actividad de hemaglutinación, resumen de validación.....	35
Tabla 20: Especificidad, porcentaje de inhibición para la PT purificada nativa y para la FHA purificada nativa (%).....	37
Tabla 21: Linealidad; PT purificada nativa, concentraciones medidas en comparación con las concentraciones teóricas previstas (UHA/mg de proteínas).....	38
Tabla 22: Linealidad; PT purificada nativa, ecuación de la recta de regresión.....	39
Tabla 23: Linealidad; FHA purificada nativa, concentraciones medidas en comparación con las concentraciones teóricas previstas (UHA/mg de proteínas).....	40

()

()

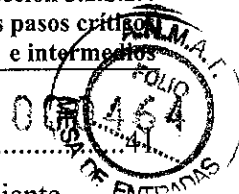


Tabla 24: Linealidad; FHA purificada nativa, Ecuación de la recta de regresión.....43

Tabla 25: Linealidad; PT purificada nativa, porcentaje de recuperación promedio mediante concentración.....43

Tabla 26: Exactitud; toxina pertúsica purificada nativa, porcentaje de recuperación promedio global y límites de confianza del 95 %.....43

Tabla 27: Exactitud; FHA purificada nativa, porcentaje de recuperación promedio por concentración.....44

Tabla 28: Exactitud; FHA purificada nativa, porcentaje de recuperación promedio global y límite de confianza del 95 %.....44

Tabla 29: Precisión; PT purificada nativa, concentración de hemaglutinina (UHA/mg de proteínas).....45

Tabla 30: Precisión; PT purificada nativa, características de repetibilidad y precisión intermedia.....46

Tabla 31: Precisión; FHA purificada nativa, concentración de hemaglutinina (UHA/mg de proteínas).....46

Tabla 32: Precisión, características de repetibilidad y precisión intermedia.....47

Tabla 33: Titulación del PTxd por el método ELISA en la etapa de PTxd purificado en solución, resumen de validación48

Tabla 34: Especificidad, FHA purificada en solución en comparación con el límite inferior de la curva de calibración (DO)49

Tabla 35: Linealidad, título antigénico medido de la vacuna diluida (UE/L).....50

Tabla 36: Exactitud, factor de concentración calculado a partir del ensayo53

Tabla 37: Exactitud, porcentaje de recuperación promedio y límite de confianza del 95 %.....53

Tabla 38: Precisión, concentraciones del antígeno PTxd (UE/mg).....54

Tabla 39: Precisión, características de repetibilidad y precisión intermedia.....54

Tabla 40: Titulación de la FHA por el método ELISA en la etapa de FHA purificada en solución, Resumen de validación.....55

Tabla 41: Especificidad, PTxd purificado en solución en comparación con el primer punto del rango (DO).....56

Tabla 42: Linealidad, concentraciones medidas en comparación con las concentraciones teóricas previstas (UE/mL)57


Tabla 43: Linealidad, ecuación de la recta de regresión58


Tabla 44: Exactitud, porcentaje de recuperación promedio por concentración59

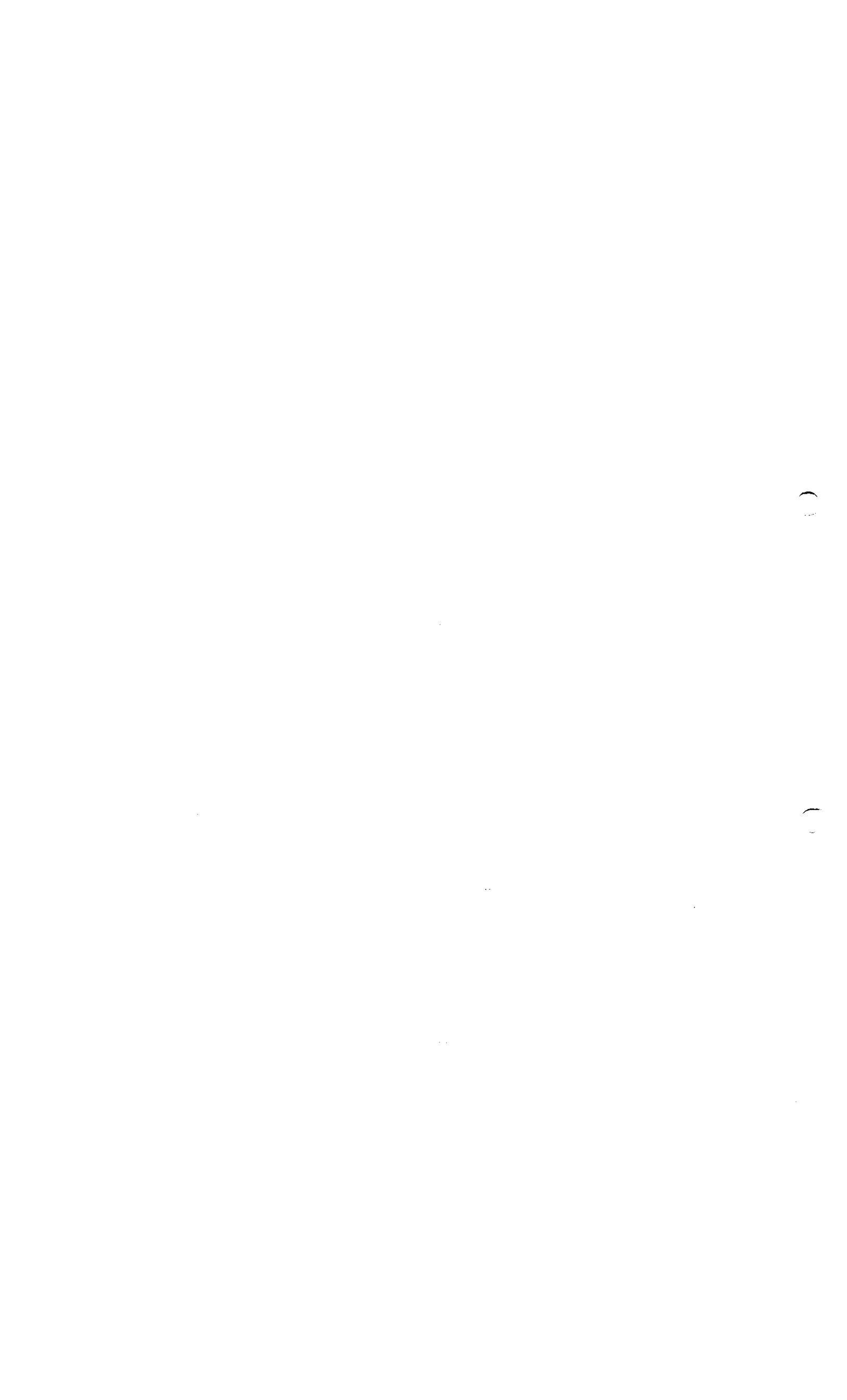
Tabla 45: Exactitud, porcentaje de recuperación promedio global y límites de confianza del 95 %59

Tabla 46: Precisión, concentraciones del antígeno de FHA (UE/mg).....61

Tabla 47: Precisión, características de repetibilidad y precisión intermedia.....61


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA GENERAL
SANOFI PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.



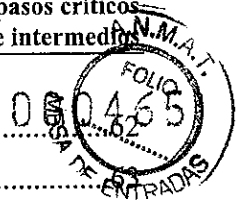


Tabla 48: Contenido de glutaraldehído residual, resumen de validación.....

Tabla 49: Densidades ópticas, validación en el nivel de 4 µg/mL de la muestra.....

Tabla 50: Densidades ópticas, validación en el nivel de 8µg/mL de la muestra.....63

Tabla 51: Resultados estadísticos, validación en el nivel de 4 µg/mL de la muestra64

Tabla 52: Resultados estadísticos, validación en el nivel de 8 µg/mL de la muestra64

Tabla 53: FHA purificada adsorbida, números de lote de los intermedios65

Tabla 54: Datos del análisis de lote para el intermedio de FHA purificada nativa65

Tabla 55: Datos del análisis de lote para el intermedio de FHA purificada en solución66

Tabla 56: Toxoide pertúsico purificado adsorbido, números de lote de los intermedios.....66

Tabla 57: Datos del análisis de lote para el intermedio de la toxina pertúsica purificada nativa....66

Tabla 58: Datos del análisis de lote para el intermedio del toxoide pertúsico purificado en solución67

Tabla 59: Resultados de potencia para los lotes de producción de FHA y de PTxd69

Tabla 60: Límites de confianza del 95 % para la prueba de antigenicidad70

Tabla 61: Composición del sistema de cierre del envase para almacenamiento de intermedios71

Tabla 62: Lotes de FHA purificada nativa utilizados para el estudio de estabilidad72

Tabla 63: Diseño del estudio de estabilidad para el estudio de estabilidad de la FHA purificada nativa73

Tabla 64: Resumen de las condiciones de almacenamiento.....74

Tabla 65: Resultados del estudio de estabilidad para el lote de FHA purificada nativa FA109856 a +5 °C ± 3 °C75

Tabla 66: Resultados del estudio de estabilidad para el lote de FHA purificada nativa FA109857 a +5 °C ± 3 °C76

Tabla 67: Resultados del estudio de estabilidad para el lote de FHA purificada nativa FA109858 a +5 °C ± 3 °C77

Tabla 68: Resultados del estudio de estabilidad para el lote de FHA purificada nativa FA109859 a +5 °C ± 3 °C78

Tabla 69: Resultados del estudio de estabilidad para el lote de FHA purificada nativa FA109860 a +5 °C ± 3 °C79

Tabla 70: Resultados del estudio de estabilidad para el lote de FHA purificada nativa FA109861 a +5 °C ± 3 °C80

Tabla 71: Lotes de toxina pertúsica purificada nativa incluidos en el estudio de estabilidad.....81

Tabla 72: Diseño del estudio de estabilidad para el estudio de estabilidad de la PT purificada nativa81

Tabla 73: Resumen de las condiciones de almacenamiento.....83


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.

