



Sección 3.2.S.2.2 - Descripción del proceso de elaboración y del control del proceso

Reacciones de purificación y modificación

Índice

Lista de tablas	3
Lista de figuras	4
1 Purificación y activación del polisacárido de <i>Haemophilus</i> tipo b.....	5
1.1 Purificación preliminar (etapa 1.7)	8
1.2 Purificación final (etapa 1.8).....	8
1.3 Precipitación en etanol (etapa 1.9).....	9
1.4 Desección del polisacárido de <i>Haemophilus</i> Tipo b (etapa 1.10).....	9
1.5 Reprocesado	9
1.6 Preparación del polisacárido AH activado de <i>Haemophilus</i> (etapa 1.11)	10
2 Purificación, detoxificación y concentración de la toxina tetánica.....	11
2.1 Ajuste del volumen (etapa 2.8)	12
2.2 Precipitación de la purificación de la toxina tetánica (etapa 2.9)	12
2.3 Detoxificación de la toxina tetánica purificada (etapa 2.10)	13
2.4 Preparación de la proteína tetánica concentrada (fase 2.11).....	14
3 Preparación del granel concentrado conjugado de polisacárido de <i>Haemophilus</i> (PRP-T)	15
3.1 Acoplamiento del polisacárido AH activado de <i>Haemophilus</i> y de la proteína tetánica concentrada (etapa 3a).....	16
3.2 Purificación y preparación del granel concentrado final de PRPT (etapa 3b).....	16
4 Llenado y condiciones de almacenamiento	17





5 Controles durante el proceso.....18

5.1 Panorama de los controles durante el proceso 18

5.1.1 Purificación del polisacárido de *Haemophilus* tipo b..... 18

5.1.2 Purificación y detoxificación de la toxina tetánica..... 18

5.1.3 Preparación de la proteína tetánica concentrada..... 19

5.1.4 Preparación del polisacárido AH activado de *Haemophilus* 19

5.1.5 Preparación del granel concentrado conjugado del polisacárido de *Haemophilus* 19

6 Tampones y otros aditivos usados durante las reacciones de purificación y modificación.....20

6.1 Tampones y otros aditivos usados durante la purificación del polisacárido de *Haemophilus* tipo b.....20

6.1.1 Solución de cloruro de sodio 0,3 M.....20

6.1.2 Tampón de acetato de sodio 0,3 M.....20

6.1.3 Otros20

6.2 Tampones y otros aditivos usados durante la purificación, la detoxificación y la concentración de la toxina tetánica20

6.2.1 Tampón de fosfato disódico, 0,05 M, pH 8,1 a 8,320

6.2.2 Solución de cloruro de sodio 0,1 M.....21

6.2.3 Solución de cloruro de sodio 0,05 M.....21

6.2.4 Otros21

6.3 Tampones y otros aditivos usados durante el proceso de conjugación.....21

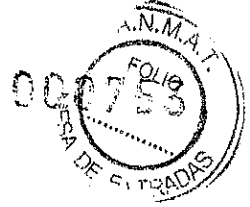
6.3.1 Solución de cloruro de sodio 0,05 M, 0,1 M y 0,2 M21

6.3.2 Tris-HCl 200 mM, pH 7,221

6.3.3 Solución amortiguada.....22

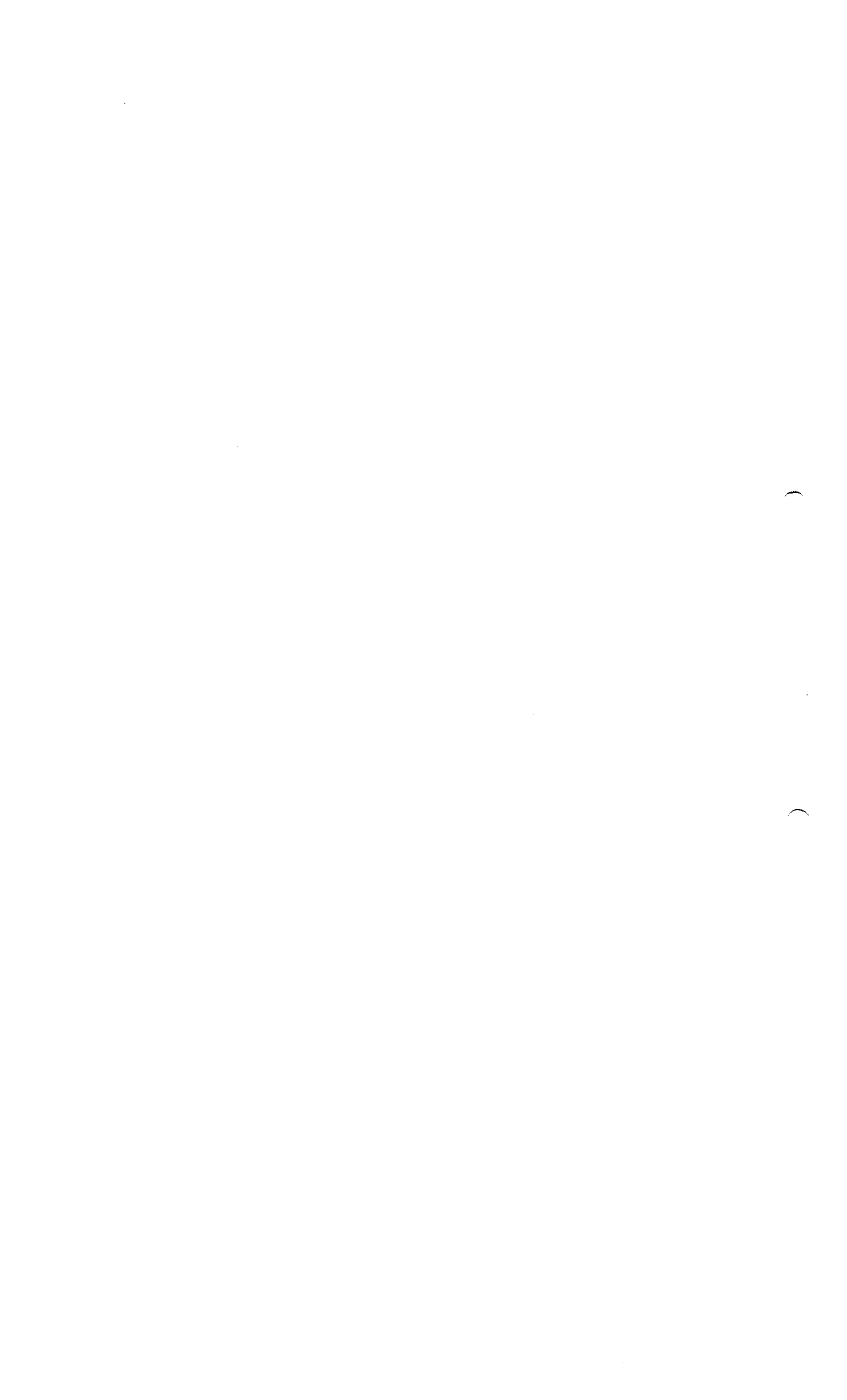
6.3.4 Otros22

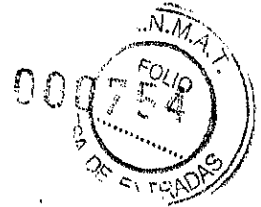




Lista de tablas

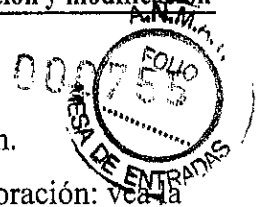
Tabla 1: Condiciones de almacenamiento para los productos almacenados durante la producción de granel del polisacárido de <i>Haemophilus</i> concentrado conjugado.....	17
Tabla 2: Controles durante el proceso aplicados en la purificación del polisacárido de <i>Haemophilus</i> tipo b	18
Tabla 3: Controles durante el proceso aplicados en la purificación y la detoxificación de la proteína tetánica.....	18
Tabla 4: Controles durante el proceso aplicados en la concentración de la proteína tetánica.....	19
Tabla 5: Controles durante el proceso aplicados en la preparación del polisacárido AH activado de <i>Haemophilus</i>	19
Tabla 6: Controles durante el proceso aplicados en la preparación del granel concentrado conjugado del polisacárido de <i>Haemophilus</i>	19





Lista de figuras

Figura 1: Purificación del polisacárido de <i>Haemophilus</i> tipo b	6
Figura 2: Activación del polisacárido de <i>Haemophilus</i> tipo b	7
Figura 3: Preparación de la proteína tetánica purificada	11
Figura 4: Preparación de la proteína tetánica concentrada	12
Figura 5: Preparación del granel concentrado conjugado del polisacárido de <i>Haemophilus</i>	15



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

Lista y descripción de materiales y equipo utilizados durante este proceso de elaboración: vea la sección 3.2.A.1 Instalaciones y equipo.

El proceso de elaboración que se describe a continuación se completa mediante los programas de validación presentados en la sección 3.2.S.2.5 Validación y/o evaluación del proceso con estudios sobre los parámetros de producción y sobre los controles durante el proceso.

1 Purificación y activación del polisacárido de *Haemophilus* tipo b

El proceso de purificación del polisacárido de *Haemophilus* tipo b se muestra en la figura 1.

El proceso de activación del polisacárido de *Haemophilus* tipo b se muestra en la figura 2.

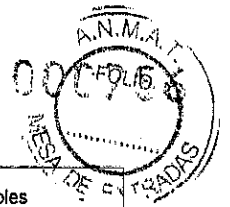


Figura 1: Purificación del polisacárido de *Haemophilus* tipo b

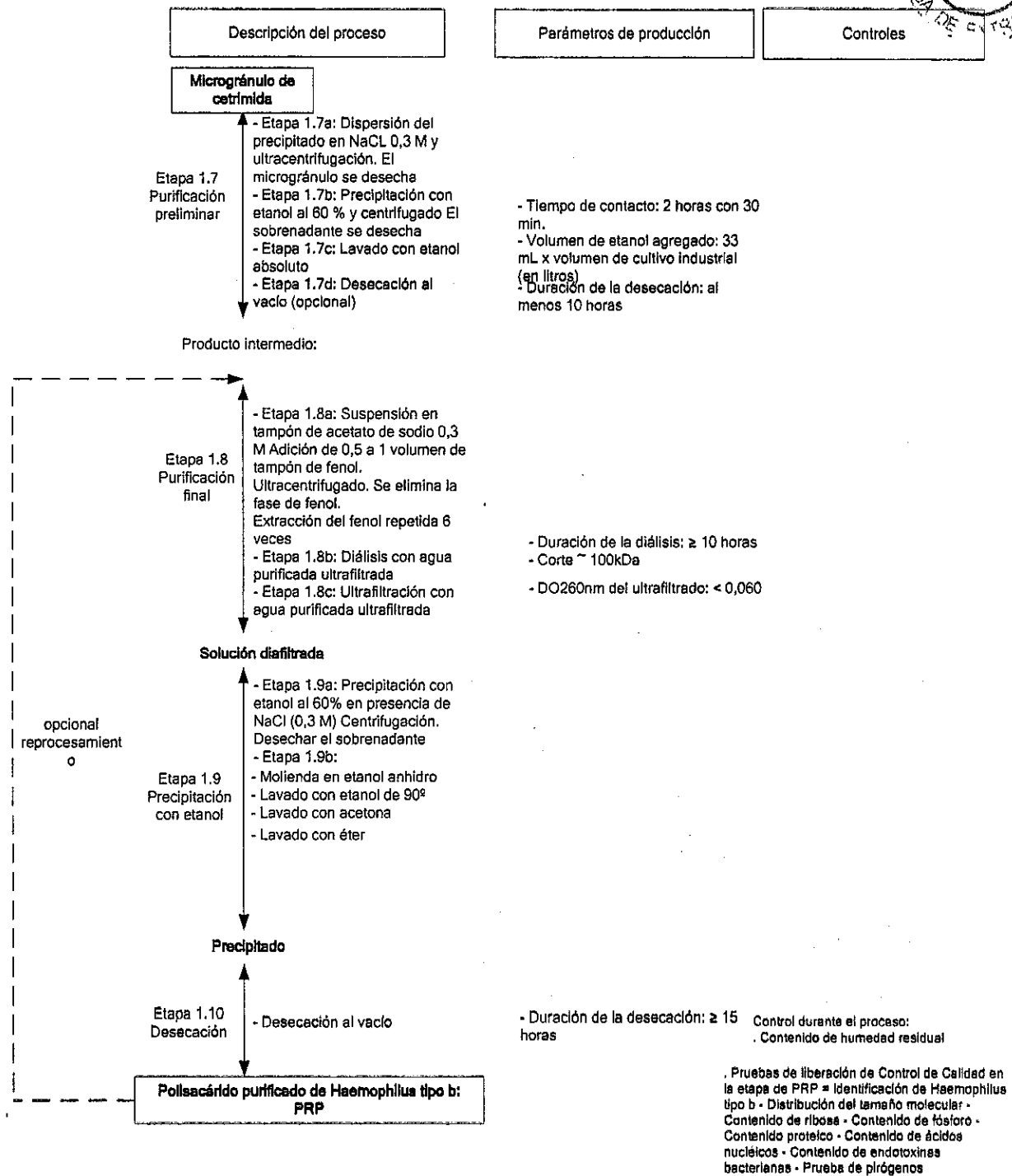
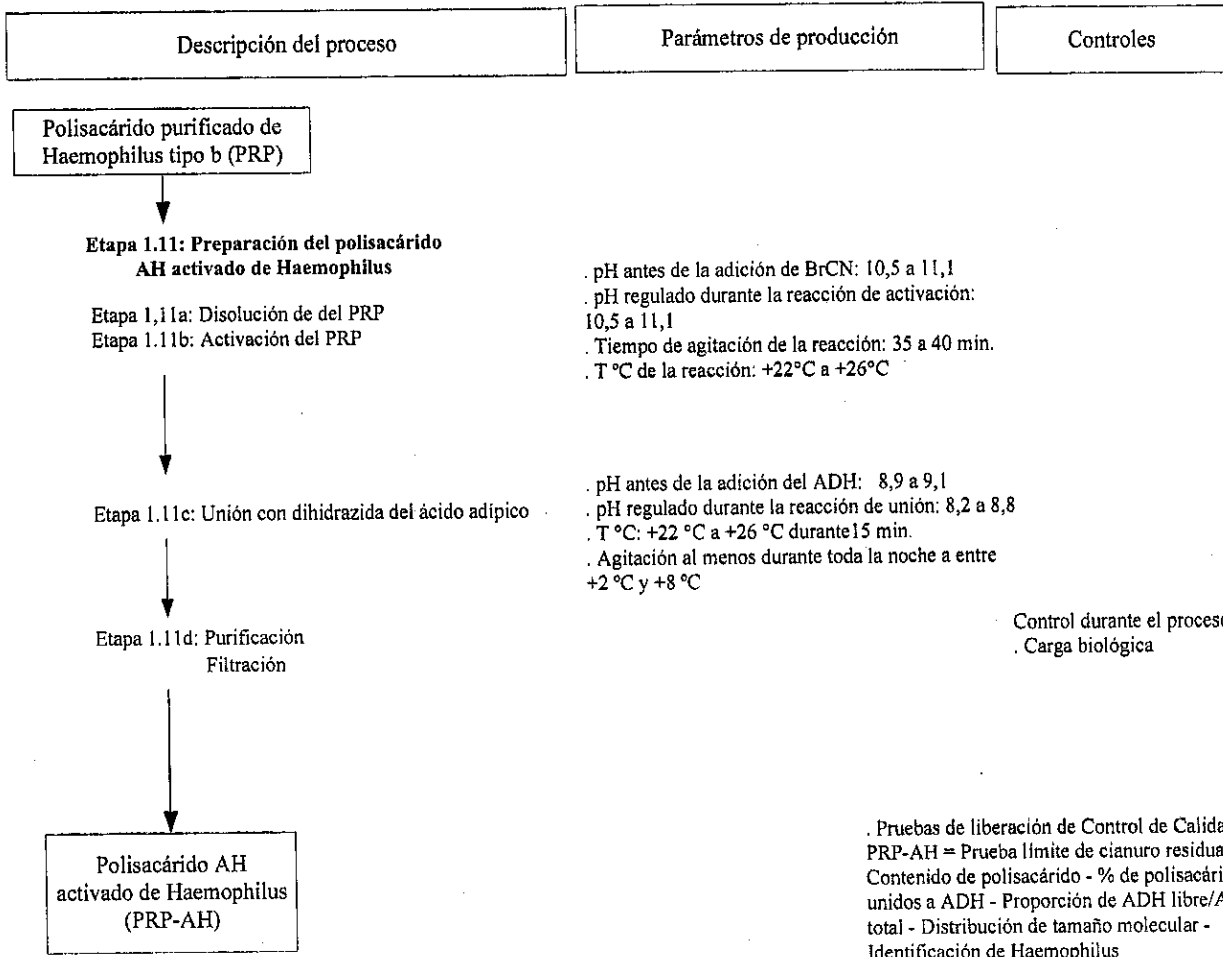
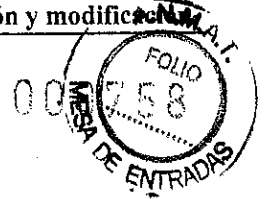




Figura 2: Activación del polisacárido de *Haemophilus* tipo b







1.1 Purificación preliminar (etapa 1.7)

- Etapa 1.7a: Disociación de los microgránulos de PRP-cetrimida

Los microgránulos de polisacárido-cetrimida se disocian mediante dispersión en una solución de cloruro de sodio 0,3 M (ver el capítulo 6.1.1). Se ultracentrifuga la solución: se conserva el sobrenadante y se desecha el microgránulo que contiene la cetrimida disociada.

- Etapa 1.7b: Precipitación con etanol al 60 %

El polisacárido presente en el sobrenadante se precipita mediante la adición de etanol anhidro frío durante 2 h 30 min. El precipitado se recupera por centrifugación de baja velocidad: el sobrenadante se desecha y el microgránulo se conserva.

- Etapa 1.7c: Lavado con etanol anhidro

El precipitado se lava con etanol anhidro frío.

- Etapa 1.7d: Desecación al vacío

Antes del almacenamiento, el producto intermedio se trata en vacío durante al menos 10 horas. El producto intermedio se almacena a ≤ -20 °C (vea la sección 3.2.S.2.4 Pasos críticos e intermedios: Intermedio del PRP, capítulo 7.2).

Este paso se realiza sólo si es necesario almacenar el producto intermedio antes de su procesado posterior.

1.2 Purificación final (etapa 1.8)

- Etapa 1.8a: Extracción con fenol

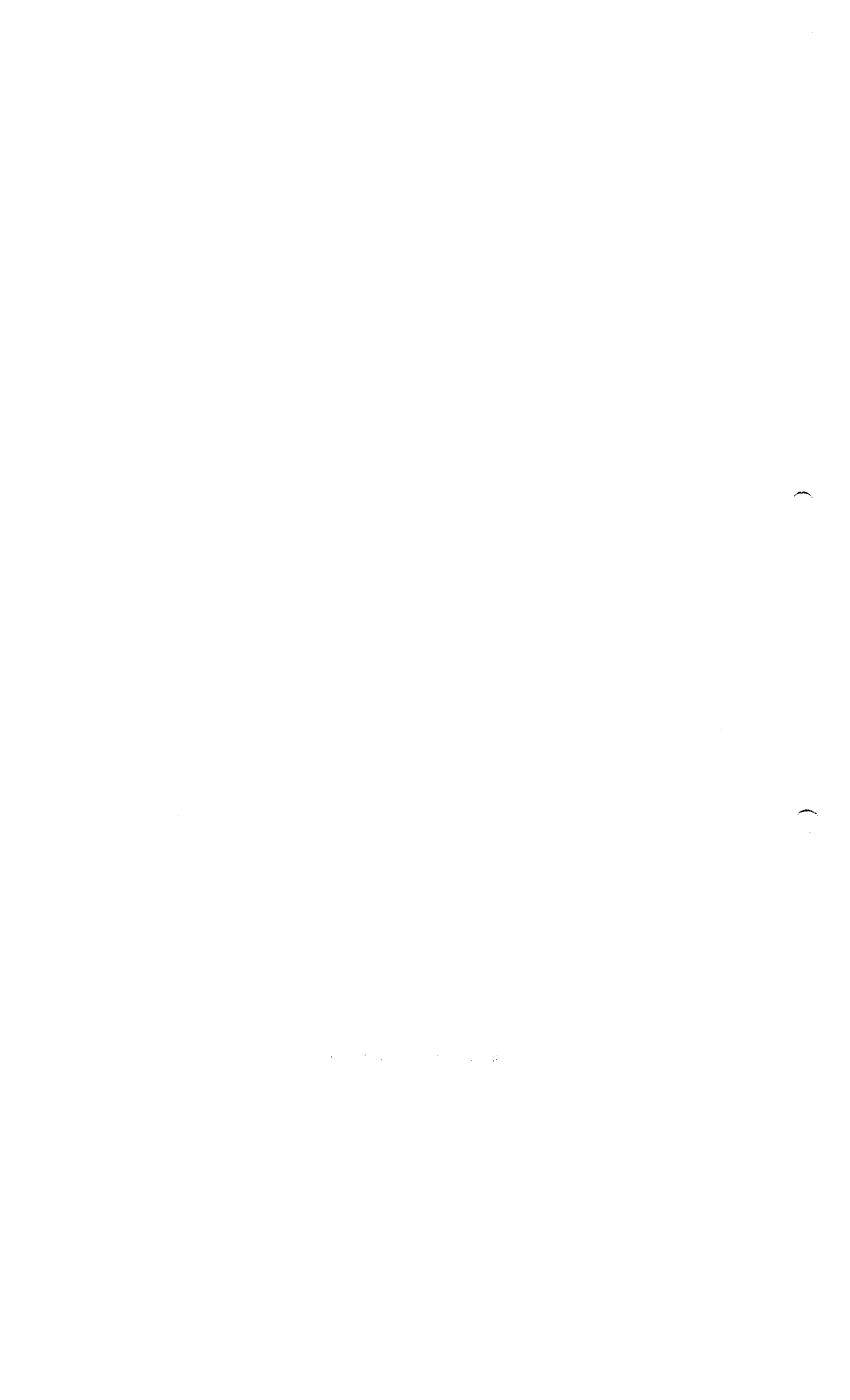
El producto intermedio se resuspende en tampón de acetato de sodio 0,3 M (vea el capítulo) y se purifica mediante extracción con fenol. La fase acuosa se recolecta mediante ultracentrifugación y la fase superior se desecha. El paso de extracción se realiza 6 veces.

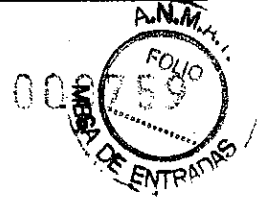
- Etapa 1.8b: Diálisis

La fase acuosa obtenida previamente se suspende en tubos de diálisis durante un mínimo de 10 horas en agua purificada ultrafiltrada.

- Etapa 1.8c: Ultrafiltración

La solución dializada se ultrafiltra (valor de corte de la membrana ≈ 100 kDa) frente a agua purificada.





1.3 Precipitación en etanol (etapa 1.9)

- Etapa 1.9a: Precipitación en etanol al 60 % en presencia de cloruro de sodio

El polisacárido capsular de *Haemophilus* tipo b se precipita a partir de la solución ultrafiltrada mediante la adición de cloruro de sodio y de etanol anhidro frío. El precipitado se recolecta mediante centrifugación y el sobrenadante se desecha.

- Etapa 1.9b: Lavado con etanol, acetona y éter

El microgránulo se muele en etanol anhidro y después se lava sucesivamente con etanol de 90° frío, acetona y éter con filtración a través de un embudo de Büchner entre cada paso lavado.

1.4 Dsecación del polisacárido de *Haemophilus* Tipo b (etapa 1.10)

- Etapa 1.10a: Dsecación

El microgránulo se seca al vacío durante al menos 15 horas.

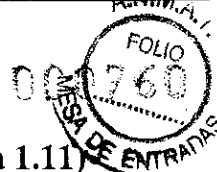
- Etapa 1.10b: Almacenamiento

Se toman muestras para los controles durante el proceso (vea el capítulo 5.1). El polvo del polisacárido purificado de *Haemophilus* tipo b (PRP) se almacena a ≤ -35 °C. Se toman muestras para los controles de calidad (vea la sección 3.2.S.2.4 Control de los pasos críticos e intermedios: Intermedios de PRP).

1.5 Reprocesado

El paso final de purificación (etapas 1.8 a 1.10) puede repetirse una vez si es necesario, cuando las pruebas de pirógenos y de contenido de endotoxinas realizadas en el PRP se encuentren fuera de las especificaciones (vea la Figura 1). Los estudios de estabilidad han demostrado que el paso de reprocesado no afecta la calidad del polisacárido de *Haemophilus* tipo b (vea la sección 3.2.S.2.4 Control de los pasos críticos e intermedios: Intermedios de PRP).





1.6 Preparación del polisacárido AH activado de *Haemophilus* (etapa 1.11)

- Etapa 1.11a: Disolución del PRP

El polisacárido purificado de *Haemophilus* tipo b (PRP) desecado (vea la etapa 1.10.b) se diluye en agua purificada a una concentración de 5 mg/mL.

- Etapa 1.11b: Activación del PRP

Se agita la solución y se añade una solución de bromuro de cianógeno. La reacción de activación se realiza mediante incubación de la mezcla de reacción durante 35 a 40 min., a entre +22 °C y +26 °C, bajo condiciones de agitación.

- Etapa 1.11c: Unión con dihidrazida de ácido adípico

Al final de la incubación se añade dihidrazida de ácido adípico (ADH). La mezcla se incuba durante 15 min. a entre +22 °C y +26 °C y después al menos durante una noche a entre +2 °C y +8 °C con agitación suave.

- Etapa 1.11d: Purificación

El producto se ultrafiltra (membrana de corte de 10 kDa) contra una solución de cloruro de sodio 0,1 M (vea el capítulo 6.3) para purificarlo y concentrarlo.

Se toman muestras para los controles durante el proceso antes de la filtración (vea el capítulo 5.1.4). El polisacárido AH activado (PRP-AH) de *Haemophilus* que se obtiene se filtra a través de un filtro de membrana cuyos poros tienen un tamaño de 0,45 µm. El polisacárido AH (PRP-AH) de *Haemophilus* se almacena a ≤ -35 °C. Se toman muestras para los controles de calidad (vea la sección 3.2.S.2.4 Control de los pasos críticos e intermedios: Intermedio del PRP-AH).





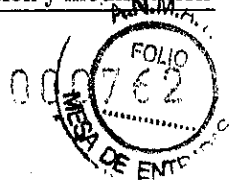
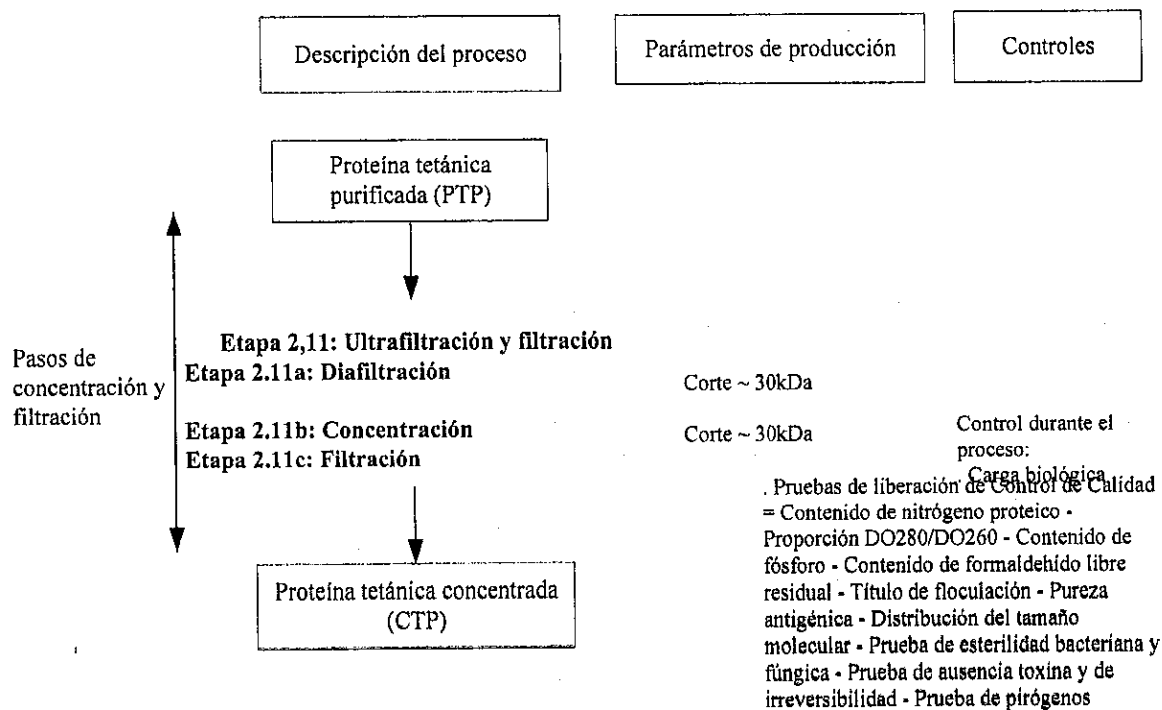


Figura 4: Preparación de la proteína tetánica concentrada



2.1 Ajuste del volumen (etapa 2.8)

El volumen final de la toxina tetánica concentrada (fin de la etapa 2.7c) se ajusta con tampón de fosfato disódico 0,07M, pH 8,1 a 8,3 (vea el capítulo 6.2) para alcanzar una concentración final de toxina de aproximadamente 500 Lf/mL.

2.2 Precipitación de la purificación de la toxina tetánica (etapa 2.9)

Se realiza una doble precipitación con sulfato amónico para obtener la toxina tetánica purificada.

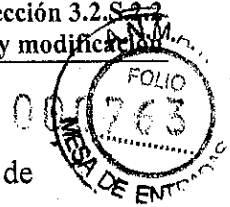
El proceso de purificación se realiza en 7 días.

- Etapa 2.9a: Primera precipitación con sulfato de amonio y carbón vegetal en condiciones de enfriamiento

La primera precipitación se realiza mediante la adición de sulfato amónico a la toxina tetánica concentrada y diafiltrada, seguida por tratamiento con carbón vegetal para obtener un líquido ligeramente opalescente.

Después se filtra la toxina a través del filtro de carbón vegetal, se filtra en un cartucho de filtro de 0,45 µm y se clarifica para retirar el precipitado.





- Etapa 2.9b: segunda precipitación con sulfato de amonio y carbón en condiciones de enfriamiento

La segunda precipitación se realiza mediante la adición de sulfato de amonio al sobrenadante de la primera precipitación. Después de reposar durante al menos 64 horas, se obtiene el microgránulo mediante centrifugación continua. El microgránulo se disuelve en una solución tampón de fosfato disódico 0,05 M (pH 8,1 a 8,3).

- Etapa 2.9c: Diafiltración

La solución tamponada de toxina tetánica se dializa con una solución tampón de fosfato disódico 0,05 M (pH 8,1 a 8,3).

Se toman muestras para los controles durante el proceso (vea el capítulo 5.1.2). Luego se ajusta el volumen con el mismo tampón para obtener una concentración final de aproximadamente 300 Lf/mL.

- Etapa 2.9d: Filtración

La solución se filtra a través de una membrana con tamaño de poro de 0,2 μm y constituye la "toxina tetánica purificada". Se toman muestras para los controles durante el proceso (vea el capítulo 5.1.2).

2.3 Detoxificación de la toxina tetánica purificada (etapa 2.10)

- Etapa 2.10a: Tratamiento con formaldehído en un tanque con doble cubierta

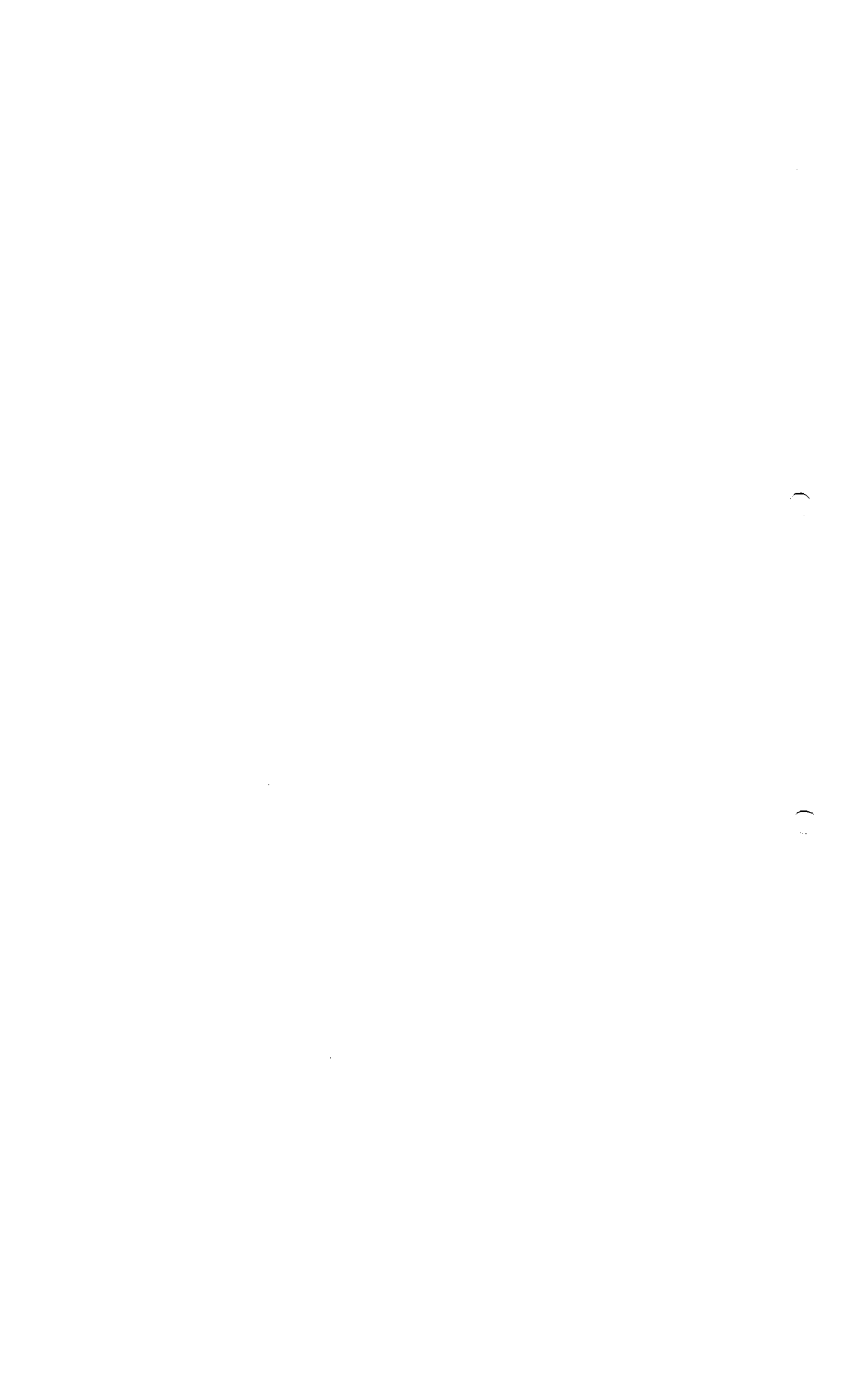
Se añade formaldehído al 36 % a la solución de toxina tetánica purificada bajo condiciones de agitación. La inactivación se logra en un periodo de incubación total como se describe a continuación:

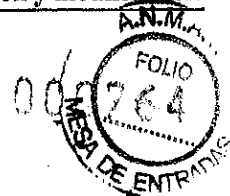
- 2-3 días a entre +15 °C y +25 °C
- Por lo menos 10 días a entre +36 °C y +38 °C
- 4-7 días con agua fría circulante (de +5 °C a +10 °C)
- Por lo menos 13,25 días a entre +36 °C y +38 °C

Después se enfría el producto a una temperatura de entre +5 °C y +10 °C.

- Etapa 2.10b: Filtración

Luego, la proteína tetánica purificada (PTP) detoxificada se filtra a través de una membrana de 0,2 μm y se almacena a entre +2 °C y +8 °C. Se toman muestras para los Controles de Calidad (vea la sección 3.2.S.2.4 Controles de los pasos críticos e intermedios: Intermedio de PTP).





2.4 Preparación de la proteína tetánica concentrada (fase 2.11)

La preparación de la proteína tetánica concentrada se resume en la figura 4.

- Etapa 2.11a: Diafiltración

La proteína tetánica purificada se diafiltra con una solución de cloruro de sodio 0,1 M (membrana de corte de 30 kDa) (vea el capítulo 6.2.2).

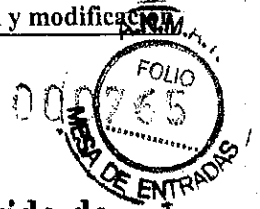
- Etapa 2.11b: Concentración después de la diafiltración

La solución de la proteína tetánica purificada se concentra mediante ultrafiltración (membrana de corte de 30 kDa) con cloruro de sodio 0,1 M. Después se ajusta la concentración del cloruro de sodio en la solución concentrada de proteína tetánica 0,05 M.

- Etapa 2.11c: Filtración

Se toman muestras para los controles durante el proceso antes de la filtración (ver el capítulo 5.1.3). Finalmente, la proteína tetánica concentrada (CTP) se filtra a través de una membrana de 0,2 μm y se almacena a entre +2 °C y +8 °C. Se obtienen muestras para los controles de calidad (vea la sección 3.2.S.2.4 Controles de pasos críticos e intermedios: Intermedio de CTP).



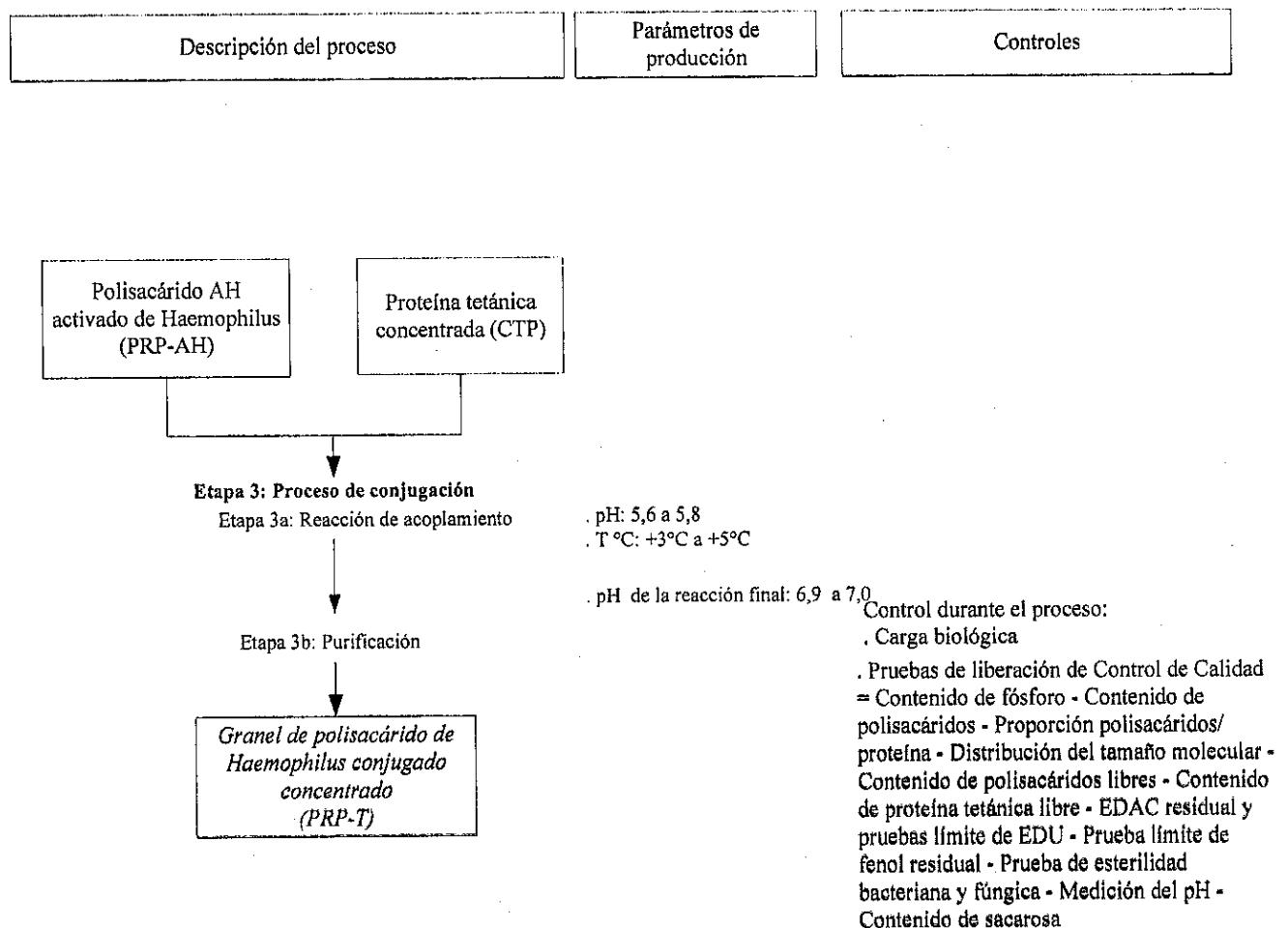


3 Preparación del granel concentrado conjugado de polisacárido de *Haemophilus* (PRP-T)

El conjugado se prepara mediante unión covalente de la proteína tetánica concentrada (etapa 2.11.c) con el polisacárido AH de *Haemophilus* activado (etapa 1.11) mediante una reacción de condensación mediada por una reacción mediada por carbodiimida utilizando 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDAC).

La descripción de la preparación del granel concentrado conjugado del polisacárido de *Haemophilus* mediante la reacción de conjugación (etapa 3) se muestra en la figura 5

Figura 5: Preparación del granel concentrado conjugado del polisacárido de *Haemophilus*





3.1 Acoplamiento del polisacárido AH activado de *Haemophilus* y de la proteína tetánica concentrada (etapa 3a)



El polisacárido AH activado de *Haemophilus* y la proteína tetánica concentrada (obtenidos, respectivamente, al final de las etapas 1.11d y 2.11c) se diluyen con cloruro de sodio 0,05 M (vea el capítulo 6.3.1). Luego se le agrega solución de EDAC (-etil 3-(3-dimetil aminopropil carbodiimida clorhidrato) a la mezcla de reacción.

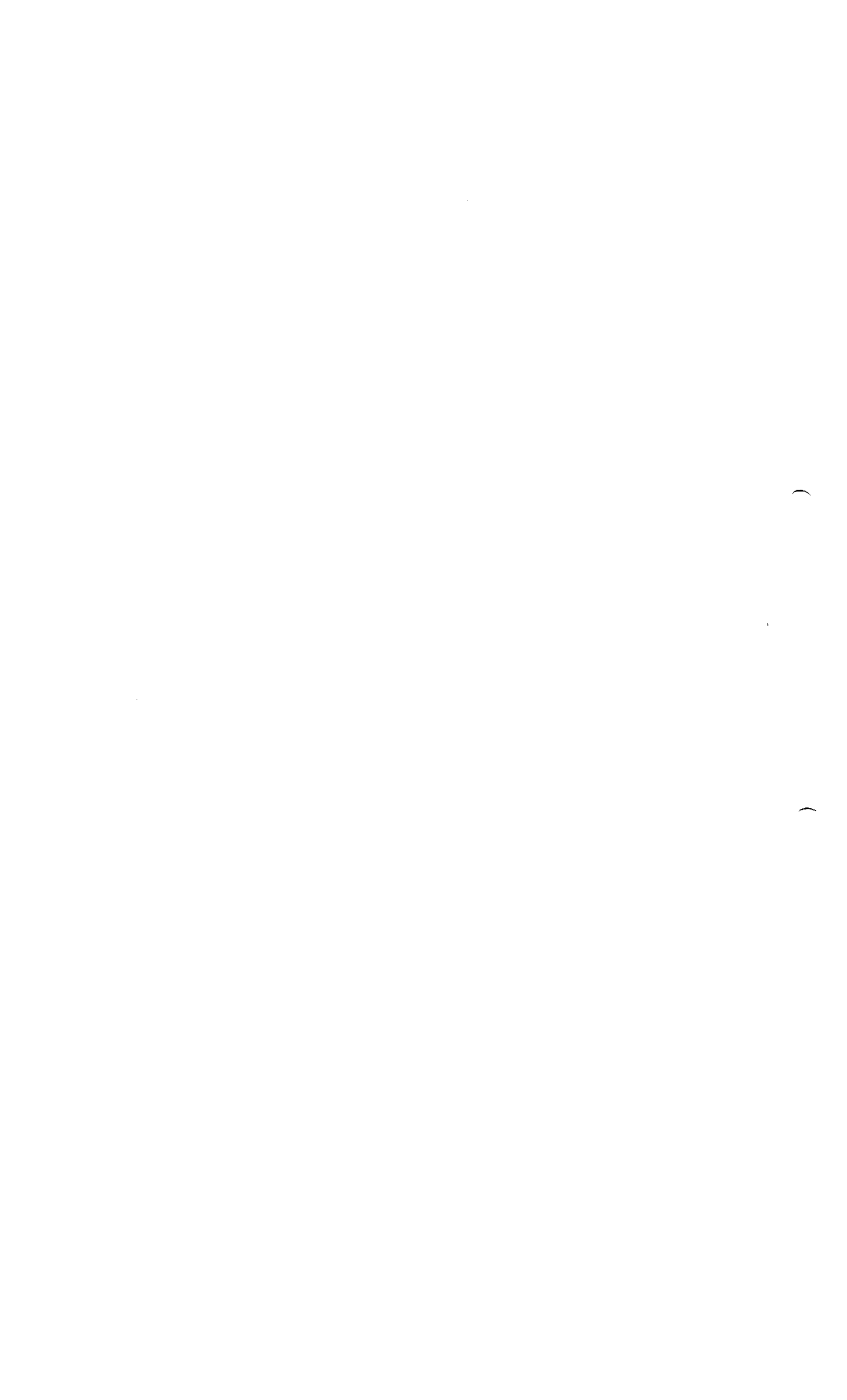
Esta mezcla se incuba durante 60 minutos a entre +3 °C y +5 °C. La reacción se detiene ajustando el pH a entre 6,9 y 7,0 con hidróxido de sodio 0,1 N.

3.2 Purificación y preparación del granel concentrado final de PRPT (etapa 3b)

La solución se dializa con tres baños sucesivos de cloruro de sodio 0,2 M (vea el capítulo 6.3.1) a entre +2 °C y +8 °C.

La mezcla dializada resultante se purifica mediante ultracentrifugación sobre un gradiente de sacarosa. El polisacárido de alto peso molecular recuperado se diluye en una solución compuesta por agua purificada, sacarosa y tampón de Tris-HCl 200 mM (= solución tamponada, vea el capítulo 6.3.3).

Se toman muestras para los controles durante el proceso antes de la filtración (ver el capítulo 5.1.5). La solución se filtra a través de una membrana de 0,2 µm. El "granel concentrado conjugado de polisacárido de *Haemophilus*" (PRP-T) resultante se almacena a ≤-35 °C (vea la sección 3.2.S.7.1 Resumen y conclusiones sobre la estabilidad). Se toman muestras para los controles de calidad (vea la sección 3.2.S.4.1 Especificaciones).





4 Llenado y condiciones de almacenamiento

Para el almacenamiento a ≤ 35 °C, el granel de polisacárido de *Haemophilus* concentrado conjugado se trasvasa a matraces de polipropileno (vea la sección 3.2.S.6 Sistema de cierre del envase).

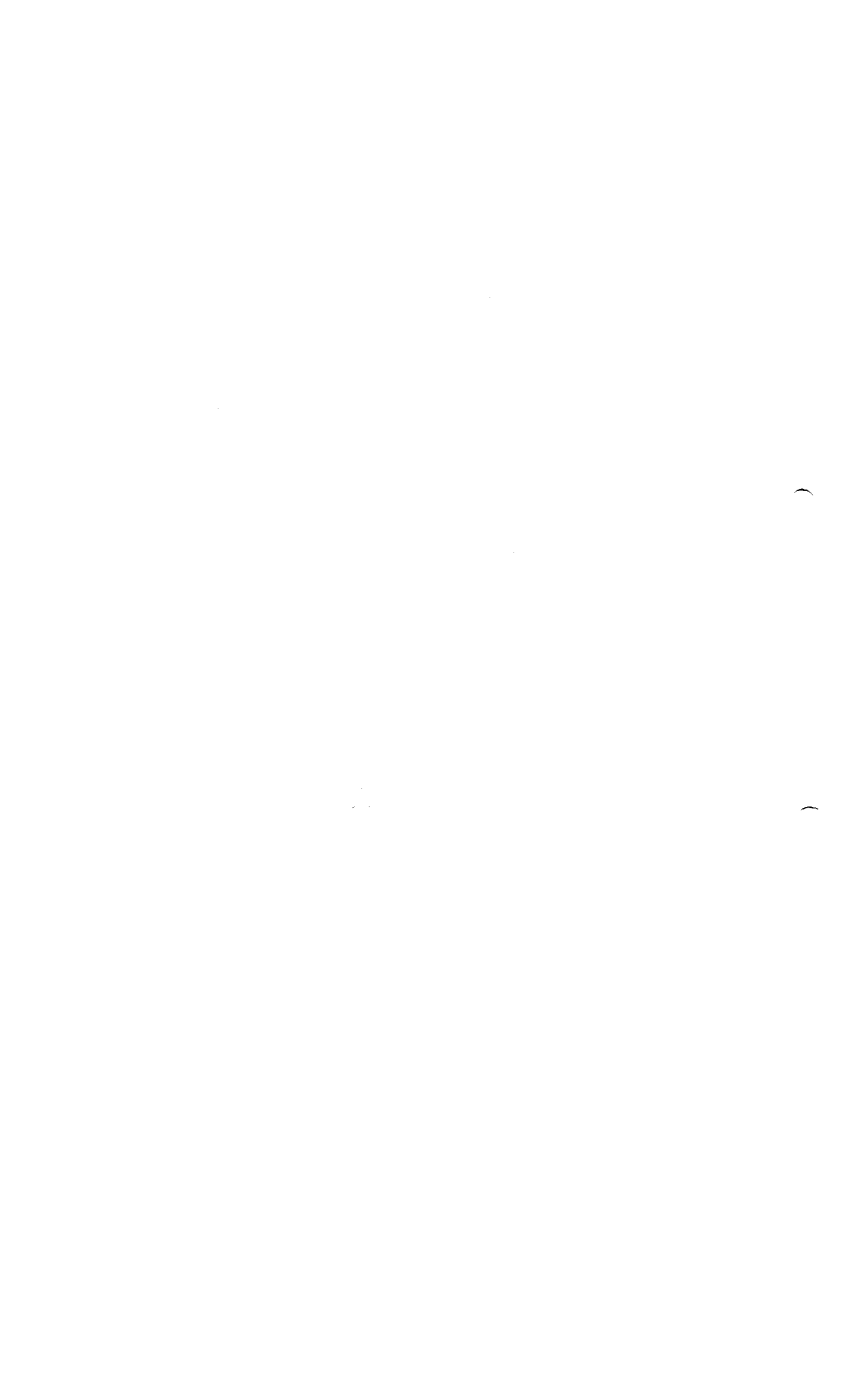
Durante el proceso de elaboración del PRP-T, se obtienen y almacenan 4 productos intermedios sujetos a pruebas de liberación de control de calidad (vea las secciones 3.2.S.2.4 Control de pasos críticos e intermedios: Intermedio de PRP, 3.2.S.2.4 Control de pasos críticos e intermedios: Intermedio del PRP-AH, 3.2.S.2.4 Control de pasos críticos e intermedios: Intermedio del PTP y 3.2.S.2.4 Control de pasos críticos e intermedios: Intermedio de la CTP), como se describe en la tabla 1. Además, también se almacenan otros dos productos no controlados por las pruebas de liberación de calidad: el microgránulo de ceftriaxona y el producto intermedio (vea la tabla 1). La vida útil de cada producto intermedio está respaldada por los datos de estabilidad que se presentan en las secciones 3.2.S.2.4 Control de pasos críticos e intermedios: Intermedio de PRP, 3.2.S.2.4 Control de pasos críticos e intermedios: Intermedio del PRP-AH, 3.2.S.2.4 Control de pasos críticos e intermedios: Intermedio del PTP y 3.2.S.2.4 Control de pasos críticos e intermedios: Intermedio de la CTP.

Tabla 1: Condiciones de almacenamiento para los productos almacenados durante la producción de granel del polisacárido de *Haemophilus* concentrado conjugado

	Envase	Temperatura	Vida útil
Microgránulo de ceftriaxona*	Vaso de precipitación de acero inoxidable	≤ -20 °C	9 meses
Producto intermedio*	Envase de policarbonato	≤ -20 °C	3 meses
Polisacárido de <i>Haemophilus</i> tipo b (PRP)†	Envase de vidrio cerrado con tapón de goma	≤ -35 °C	5 años
Proteína tetánica purificada (PTP)†	Matraces de polipropileno con tapones roscados de polipropileno	+2 °C a +8 °C	12 meses
Proteína tetánica concentrada (CTP)†	Envase de vidrio con tapón de goma	+2 °C a +8 °C	12 meses
Polisacárido AH de <i>Haemophilus</i> activado (PRP-AH)†	Envase de vidrio con tapón de goma	≤ -35 °C	24 meses
Polisacárido de <i>Haemophilus</i> concentrado conjugado (PRP-T)	Envase de polipropileno con cierre de polipropileno	≤ -35 °C	36 meses

* Productos intermedios no controlados por pruebas de liberación de control de calidad

† Productos intermedios sujetos a pruebas de liberación de control de calidad





5 Controles durante el proceso

5.1 Panorama de los controles durante el proceso

5.1.1 Purificación del polisacárido de *Haemophilus* tipo b

Los controles durante el proceso que se aplican durante la purificación del polisacárido de *Haemophilus* tipo b se presentan en la tabla 2.

Tabla 2: Controles durante el proceso aplicados en la purificación del polisacárido de *Haemophilus* tipo b

Pasos de elaboración	Controles durante el proceso		
	Pruebas	Criterios de aceptación	Justificación
Etapa 1.10b: Molienda	Contenido de humedad residual (Ediciones actuales de la Ph. Eur. 2.5.32 Microdeterminación de agua, Ph. Eur. 2.4.24 Solventes residuales y Ph. Eur. 2.2.28 Cromatografía de gases)	Sin criterios de aceptación	Para el cálculo del peso en seco del polisacárido

5.1.2 Purificación y detoxificación de la toxina tetánica

Los controles durante el proceso aplicados durante la purificación, la detoxificación y la concentración de la toxina tetánica se presentan en la tabla 3

Tabla 3: Controles durante el proceso aplicados en la purificación y la detoxificación de la proteína tetánica

Pasos de elaboración	Controles durante el proceso		
	Pruebas	Criterios de aceptación	Justificación
Precipitación de la toxina tetánica Etapa 2.9c: Diafiltración Etapa 2.9d: Filtración	Título de floculación (Ph. Eur. 2.7.27, edición actual: prueba de Ramon) Contenido de sulfato de amonio (método interno)	Sin criterios de aceptación $\leq 3,1$ mg/L	Prueba realizada para ajustar el título a 300 Lf/mL Verificar el rendimiento de la diafiltración expresado como eliminación de sulfato de amonio
Inactivación Etapa 2.10b: Filtración	Carga microbiana (antes de la filtración) (Ph. Eur. 2.6.12, edición actual)	≤ 20 UFC/mL	Evaluar la contaminación biológica antes de la filtración a 0,2 μ m

