

5.1.3 Preparación de la proteína tetánica concentrada

Los controles durante el proceso aplicados a la preparación de la proteína tetánica concentrada se presentan en la tabla 4.

Tabla 4: Controles durante el proceso aplicados en la concentración de la proteína tetánica

Pasos de elaboración	Controles durante el proceso		
	Pruebas	Criterios de aceptación	Justificación
Concentración y ultrafiltración: Etapa 2.11c: Filtración	Carga microbiana (antes de la filtración) (Ph. Eur. 2.6.12, edición actual)	≤ 700 UFC/mL	Evaluar la contaminación biológica antes de la filtración a 0,2 µm

5.1.4 Preparación del polisacárido AH activado de *Haemophilus*

Los controles durante el proceso aplicados en la preparación del polisacárido AH activado de *Haemophilus* se presentan en la tabla 5

Tabla 5: Controles durante el proceso aplicados en la preparación del polisacárido AH activado de *Haemophilus*

Pasos de elaboración	Controles durante el proceso		
	Pruebas	Criterios de aceptación	Justificación
Preparación de PRP-AH Etapa 1.11d: Purificación	Carga microbiana (antes de la filtración) (Ph. Eur. 2.6.12, edición actual)	≤ 10 UFC/mL	Evaluar la contaminación biológica antes de la filtración a 0,45 µm

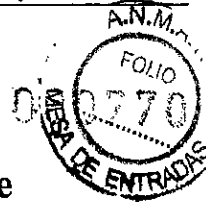
5.1.5 Preparación del granel concentrado conjugado del polisacárido de *Haemophilus*

Los controles durante el proceso aplicados en la preparación del polisacárido AH concentrado conjugado de *Haemophilus* se presentan en la tabla 6

Tabla 6: Controles durante el proceso aplicados en la preparación del granel concentrado conjugado del polisacárido de *Haemophilus*

Pasos de elaboración	Controles durante el proceso		
	Pruebas	Criterios de aceptación	Justificación
Proceso de conjugación Etapa 3b: Purificación	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 µm





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

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

6.1.1 Solución de cloruro de sodio 0,3 M

- Cloruro de sodio
- Agua purificada

6.1.2 Tampón de acetato de sodio 0,3 M

- Acetato de sodio, 3H₂O
- Agua purificada
- Ácido acético concentrado

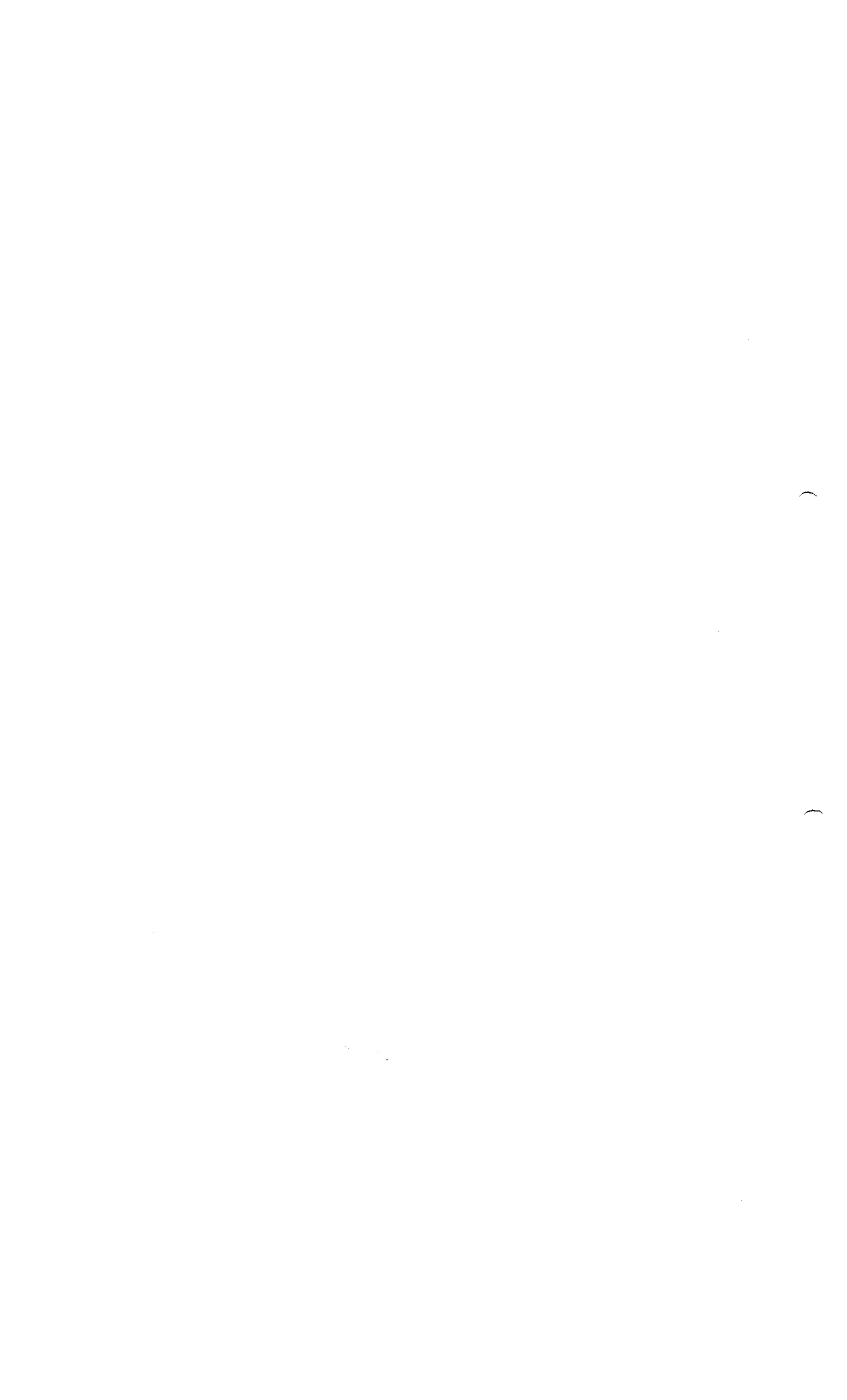
6.1.3 Otros

- Etanol anhidro
- Etanol de 90°
- Fenol
- Acetona
- Éter
- Cloruro de sodio
- Agua purificada

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

6.2.1 Tampón de fosfato disódico, 0,05 M, pH 8,1 a 8,3

- Fosfato disódico dodecahidrato (12H₂O)
- Agua purificada
- HCl concentrado





6.2.2 Solución de cloruro de sodio 0,1 M

- Cloruro de sodio
- Agua purificada

6.2.3 Solución de cloruro de sodio 0,05 M

- Cloruro de sodio
- Agua purificada

6.2.4 Otros

- Sulfato de amonio
- Carbón
- Formaldehído
- Agua purificada

6.3 Tampones y otros aditivos usados durante el proceso de conjugación

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

- Cloruro de sodio
- Agua purificada

6.3.2 Tris-HCl 200 mM, pH 7,2

- Trometamol
- HCl concentrado
- Agua purificada

Membrana de filtración de 0,2 μ m.



6.3.3 Solución amortiguada

- Sacarosa
 - Tampón de Tris-HCl 200 mM, pH 7,2 (vea la sección)
 - Agua purificada
- Membrana de filtración de 0,2 μ m.

6.3.4 Otros

- Hidróxido de sodio 0,2 M
- Ácido clorhídrico
- Agua purificada
- Solución de CNBr
- Solución de ADH
- Solución de EDAC
- Sacarosa





3.2.S.2.4

Control de los Pasos Críticos e Intermedios - PRP-T


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANGRE PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANGRE PASTEUR S.A.



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

Índice

Lista de tablas	2
Lista de figuras	3
1 Pasos críticos del proceso de producción del granel de polisacárido de <i>Haemophilus</i> concentrado conjugado	4
2 Productos intermedios	7



Lista de tablas

Tabla 1: Pasos críticos del proceso de elaboración del PRP-T5
Tabla 2: Números de lote de los intermedios de PRP-T y el principio activo9


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.



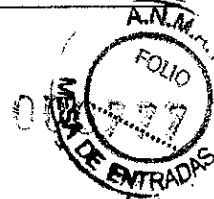
Lista de figuras

Figura 1: Diagrama de flujo de elaboración resumido8


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.





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

1 Pasos críticos del proceso de producción del granel de polisacárido de *Haemophilus* concentrado conjugado

El principio activo, denominado granel de polisacárido de *Haemophilus* concentrado conjugado y abreviado como PRP-T, está compuesto por el polisacárido de *Haemophilus* tipo b unido por enlace covalente a una toxina tetánica detoxificada o proteína tetánica.

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

- Cultivo industrial y purificación del polisacárido de *Haemophilus* (etapas 1.1 a 1.10): el propósito de estos pasos es producir el polisacárido mediante cultivo industrial y eliminar las impurezas. Estos pasos influyen en la calidad del intermedio polisacárido de *Haemophilus* (PRP).
- Unión de la dihidrazida de ácido adípico al polisacárido de *Haemophilus* (etapa 1.11): la finalidad de este paso es activar el polisacárido mediante la unión del ADH (grupo reactivo) antes de la conjugación. Este paso influye en la calidad del intermedio polisacárido-AH de *Haemophilus* activado (PRP-AH).
- Cultivo industrial, purificación e inactivación de la toxina tetánica (etapas 2.1 a 2.10): el propósito de estos pasos es producir la toxina tetánica mediante cultivo industrial, eliminar las impurezas e inactivar la toxina. Estos pasos influyen en la calidad del intermedio proteína tetánica purificada (PTP).
- Concentración de la proteína tetánica (etapa 2.11): el objetivo de esta etapa consiste en concentrar la proteína tetánica purificada y eliminar las impurezas. Este paso influye en la calidad del intermedio proteína tetánica concentrada (CTP).
- Conjugación de la proteína tetánica al polisacárido de *Haemophilus* (etapa 3). Este paso influye en la calidad del principio activo granel de polisacárido de *Haemophilus* concentrado conjugado (PRPT).

Estos pasos se rigen por parámetros de producción y por controles durante el proceso (vea las secciones 3.2.S.2.2 Cultivo celular y cosecha y 3.2.S.2.2 Reacciones de purificación y modificación).

Por otra parte, se aplican pruebas de control de calidad a cuatro de los seis intermedios de producción. Estos intermedios son los siguientes:

- Polisacárido de *Haemophilus* tipo b (PRP);
- Polisacárido AH de *Haemophilus* activado (PRPAH);
- Proteína tetánica purificada (PTP);
- Proteína tetánica concentrada (CTP).



La descripción de las especificaciones, los métodos de prueba y los datos de estabilidad de los intermedios se presentan en esta sección.

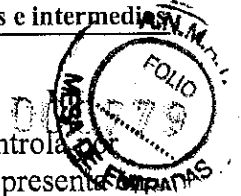
Las especificaciones y los métodos de análisis para el principio activo final (PRP-T) se describen en la sección 3.2.S.4.1 Especificaciones y en la 3.2.S.4.2 Procedimientos analíticos.

Según los resultados de los estudios de validación que demuestran que el proceso de elaboración es reproducible y está bajo control (vea la sección 3.2.S.2.5, Validación y/o evaluación del proceso), los siguientes pasos se consideran críticos para el proceso de elaboración del PRP-T (vea la sección 3.2.S.2.2, Cultivo celular y cosecha y la sección 3.2.S.2.2 Reacciones de purificación y modificación):

Tabla 1: Pasos críticos del proceso de elaboración del PRP-T

Pasos críticos	Control de criticidad	Objetivo del paso
Proceso del polisacárido de <i>Haemophilus</i> tipo b (paso 1)		
Extracción con fenol (etapa 1.8a)	Este paso de purificación se controla mediante: - el monitoreo de los parámetros de producción - los datos de validación (vea la sección 3.2.S.2.5 Validación y/o evaluación del proceso)	Eliminar impurezas, y sobre todo lograr la eliminación de proteínas, ácidos nucleicos y endotoxinas (vea la sección 3.2.S.3.2 Impurezas)
Activación del PRP (etapa 1.11b)	Esta etapa se controla mediante: - el monitoreo de los parámetros de producción - los datos de validación (vea la sección 3.2.S.2.5 Validación y/o evaluación del proceso)	Añadir el componente ADH al PRP activado para preparar la reacción de acoplamiento
Proceso de proteína tetánica (etapa 2)		
Tratamiento con formaldehído (etapa 2.10a)	Este paso de detoxificación se controla mediante: - el monitoreo de los parámetros de producción - los datos de validación (vea la sección 3.2.S.2.5 Validación y/o evaluación del proceso)	Detoxificar la toxina tetánica purificada para obtener la proteína tetánica purificada (PTP)
Preparación del PRP-T (etapa 3)		
Reacción de acoplamiento (etapa 3a)	Este paso de reacción química se controla mediante: - el monitoreo de los parámetros de producción - los datos de validación (vea la sección 3.2.S.2.5 Validación y/o evaluación del proceso)	Conjugación del PRP-AH con la CTP, utilizando EDAC como catalizador La conjugación a una proteína transportadora induce la respuesta inmunitaria.
Purificación del PRP-T con un gradiente de sacarosa (etapa 3b)	Este paso de purificación se controla mediante: - el monitoreo de los parámetros de producción - los datos de validación (vea la sección 3.2.S.2.5 Validación y/o evaluación del proceso) - controles de calidad sobre el principio activo final obtenido (vea la sección 3.2.S.4.1 Especificaciones)	Seleccionar conjugados de alto peso molecular, que inducen una respuesta inmunitaria.

La estabilidad del microgránulo de cetrimida (final de la etapa 1.6b), el producto intermedio (final de la etapa 1.7b), el PRP (final de la etapa 1.10b) durante el almacenamiento se controla mediante el tiempo y la temperatura, con el fin de evitar la degradación. El estudio de estabilidad se presenta en la sección 3.2.S.2.4 Control de los pasos críticos e intermedios: Intermedio PRP



La estabilidad del PRP-AH (final de la etapa 1.11d) durante el almacenamiento se controla por tiempo y temperatura con el fin de evitar su degradación. El estudio de estabilidad se presenta en la sección 3.2.S.2.4 Control de los pasos críticos e intermedios: Intermedio PRP-AH

La estabilidad del PTP (final de la etapa 2.10b) durante el almacenamiento se controla por tiempo y temperatura con el fin de evitar su degradación. El estudio de estabilidad se presenta en la sección 3.2.S.2.4 Control de los pasos críticos e intermedios: Intermedio PTP

La estabilidad de la CTP (final de la etapa 2.11c) durante el almacenamiento se controla por tiempo y temperatura con el fin de evitar su degradación. El estudio de estabilidad se presenta en la sección 3.2.S.2.4 Control de los pasos críticos e intermedios: Intermedio CTP

La estabilidad del PRP-T (final de la etapa 2.11c) durante el almacenamiento se controla por tiempo y temperatura con el fin de evitar su degradación. El estudio de estabilidad se presenta en la sección 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 sobre 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 los intermedios y el principio activo permiten mantener bajo control estos pasos críticos.





2 Productos intermedios

- Microgránulo de ceftriaxona: este producto se aísla del cultivo bacteriano de *Haemophilus* y se almacena hasta la purificación del polisacárido de *Haemophilus* tipo b (vea los datos de estabilidad en la sección 3.2.S.2.4 Control de los pasos críticos e intermedios: Intermedio PRP).
- Producto intermedio: este producto se obtiene después de la purificación preliminar del polisacárido de *Haemophilus* tipo b y se almacena hasta la purificación final (vea los datos de estabilidad en la sección 3.2.S.2.4 Control de pasos críticos e intermedios: Intermedio PRP).
- Polisacárido de *Haemophilus* tipo b purificado (PRP): este producto se aísla después de la purificación final y se almacena como el polisacárido (3.2.S.2.4 Control de los pasos críticos e intermedios: Intermedio PRP).
- Polisacárido AH de *Haemophilus* activado (PRP-AH): este producto se almacena hasta la conjugación de la proteína tetánica (3.2.S.2.4 Control de los pasos críticos e intermedios: Intermedio PRP-AH).
- Proteína tetánica purificada: este producto se aísla del cultivo bacteriano de *Clostridium tetani*, se detoxifica mediante tratamiento con formaldehído y se almacena como proteína tetánica purificada (3.2.S.2.4 Control de los pasos críticos e intermedios: Intermedio PTP).
- Proteína tetánica concentrada: este producto se almacena hasta la conjugación del polisacárido activado (3.2.S.2.4 Control de los pasos críticos e intermedios: Intermedio CTP).

El diagrama de flujo resumido de la elaboración se presenta en la figura 1.

Todos los intermedios se pueden almacenar. Cada intermedio, salvo el microgránulo de ceftriaxona y el producto intermedio, se analiza mediante pruebas de liberación de control de calidad y debe cumplir con sus especificaciones.

En la tabla 2 se presenta información sobre los lotes industriales recientes de los intermedios de PRP-T (PRP, PRP-AH, PTP y CTP que constituyen el mismo linaje de lotes de PRP-T). Los resultados de cada intermedio se presentan en las secciones correspondientes 3.2.S.2.4 Control de pasos críticos e intermedios.

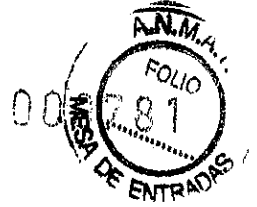


Figura 1: Diagrama de flujo de elaboración resumido

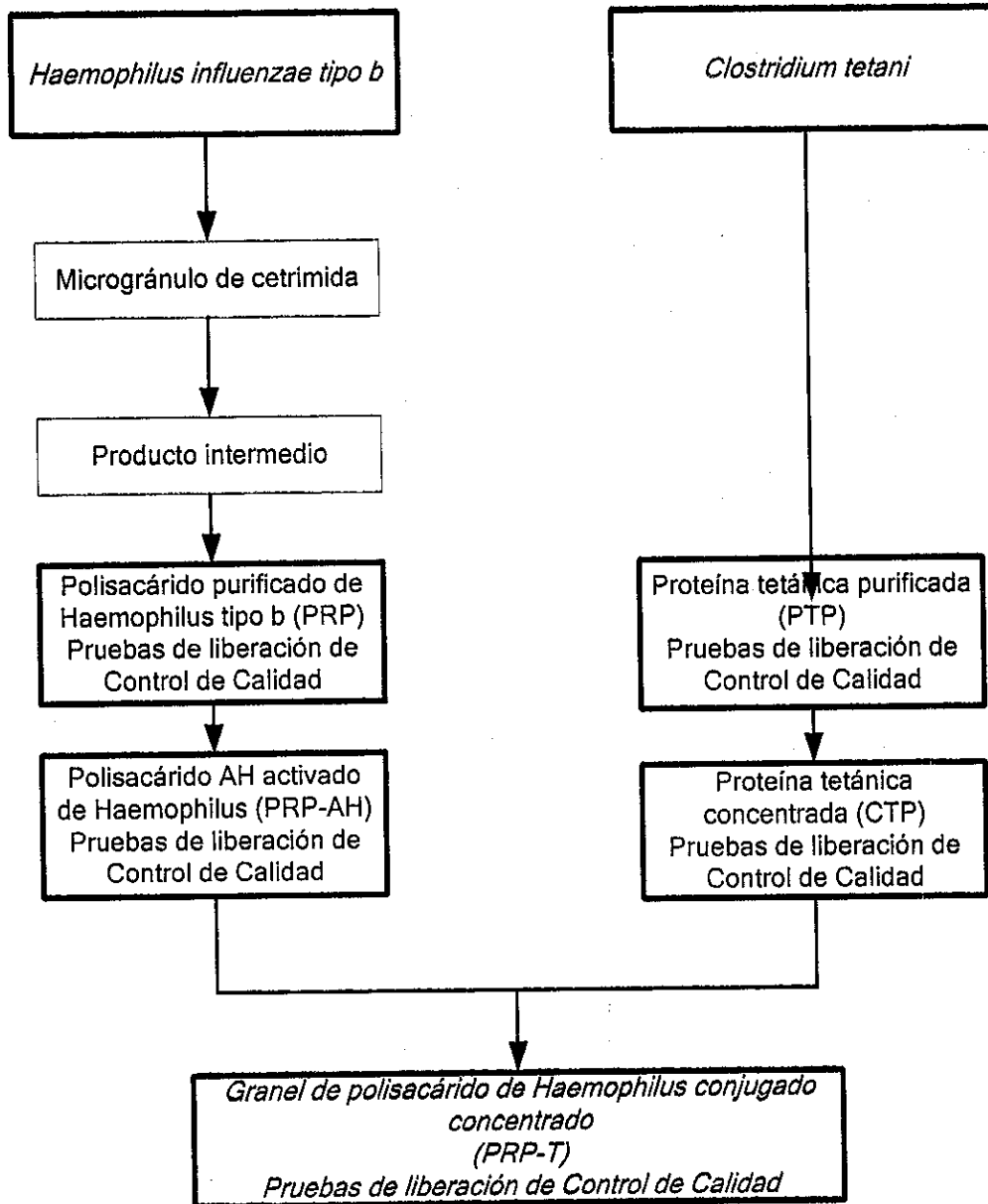




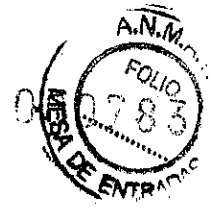


Tabla 2: Números de lote de los intermedios de PRP-T y el principio activo

Productos intermedios	Números de lote:		
PRP (fecha de elaboración)	FA365093 05 nov 2009	FA363635 08 oct 2009	FA363321 4 sep 2009
PRP-AH (fecha de elaboración)	FA376923 23 ene 2010	FA373510 12 dic 2009	FA377119 27 ene 2010
PTP (fecha de elaboración)	FA350783 21 jul 2009	FA350785 27 jul 2009	FA354112 03 sep 2009
CTP (fecha de elaboración)	FA364781 08 oct 2009	FA365947 15 oct 2009	FA366963 22 oct 2009
Principio activo	Números de lote:		
PRP-T (fecha de elaboración)	FA381843 10 mar 2010	FA382491 19 mar 2010	FA384370 01 abr 2010

ROXANA MONTEMILONE
 DIRECTORA TÉCNICA
 SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINGUEZ
 APODERADO
 SANOFI PASTEUR S.A.

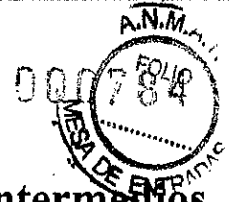


3.2.S.2.4

Control de los Pasos Críticos e Intermedios - Intermedio PRP - PRP-T


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

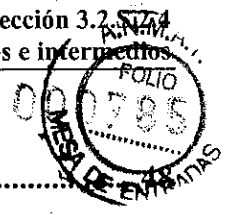

CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.



Sección 3.2.S.2.4 - Controles de los pasos críticos e intermedios Intermedio PRP

Índice

Lista de tablas	3
Lista de figuras	5
1 Especificaciones	6
2 Procedimientos analíticos	7
2.1 Prueba de identificación de <i>Haemophilus</i> tipo b	7
2.2 Distribución del tamaño molecular mediante HP-SEC	9
2.3 Contenido de ribosa	13
2.4 Contenido de fósforo.....	14
2.5 Contenido proteico.....	16
2.6 Contenido de ácidos nucleicos.....	19
2.7 Contenido de endotoxinas bacterianas.....	19
2.8 Prueba de pirógenos.....	19
3 Validación de los procedimientos analíticos	20
3.1 Identificación de <i>Haemophilus</i> tipo b.....	20
3.2 Distribución del tamaño molecular mediante HP-SEC	22
3.3 Contenido de fósforo.....	24
3.4 Contenido proteico.....	29
4 Método analítico utilizado durante el proceso de elaboración con propósitos de control.....	37
4.1 Contenido de humedad residual del PRP	37
4.2 Validación.....	42
5 Análisis de lotes.....	47



6 Justificación de las especificaciones.....

7 Sistema de cierre del envase50

8 Estabilidad 51

8.1 Estudio de estabilidad del PRP después del almacenamiento del microgránulo de ceftriaxona 51

8.2 Estudio de estabilidad del PRP tras el almacenamiento del producto intermedio 56

8.3 Estudio de estabilidad del polisacárido de *Haemophilus* tipo b (PRP)..... 59

9 Procedimiento analítico anterior70

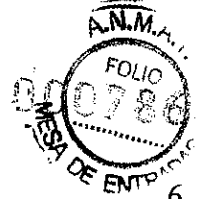
9.1 Distribución del tamaño molecular en PRP mediante LP-SEC70

9.2 Validación del procedimiento analítico para la distribución del tamaño molecular en el PRP mediante LP-SEC..... 72

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.





Lista de tablas

Tabla 1: Especificaciones para el polisacárido (PRP) de <i>Haemophilus</i> tipo b.....	6
Tabla 2: Condiciones cromatográficas	10
Tabla 3: Preparación de las muestras	10
Tabla 4: Preparación de las muestras de mineralización.....	15
Tabla 5: Preparación de la muestra para el análisis por colorimetría*	15
Tabla 6: Preparación del rango de calibración	18
Tabla 7: Prueba de identificación de <i>Haemophilus</i> : Validación, material evaluado.....	20
Tabla 8: Resultados de validación obtenidos con respecto a la especificidad del antisuero para <i>Haemophilus influenzae</i>	21
Tabla 9: Distribución del tamaño molecular mediante HP-SEC en PRP: Validación, resumen.....	22
Tabla 10: Distribución del tamaño molecular mediante HP-SEC en el PRP (K _D): Validación, precisión	22
Tabla 11: Características de repetibilidad y precisión intermedia.....	23
Tabla 12: Contenido de fósforo en PRP: Validación, resumen.....	24
Tabla 13: Contenido de fósforo en PRP: Validación, linealidad; Cantidad de fósforo en la muestra (%)	25
Tabla 14: Contenido de fósforo en PRP: Validación, exactitud; factor de concentración calculada	26
Tabla 15: Recuperación porcentual promedio.....	27
Tabla 16: Contenido de fósforo en PRP: Validación, precisión; concentración en fósforo (% de peso seco)	28
Tabla 17: Características de repetibilidad y precisión intermedia.....	29
Tabla 18: Contenido proteico del PRP: Validación, resumen.....	30
Tabla 19: Contenido proteico del PRP: Validación, linealidad; cantidad de proteína en la muestra (µg/mL)	31
Tabla 20: Contenido proteico del PRP: Validación, exactitud; factor de concentración calculada.....	33
Tabla 21: Recuperación porcentual promedio.....	33
Tabla 22: Contenido proteico del PRP: Validación, precisión; contenido de proteínas, agregado de 5 µg (%).....	34
Tabla 23: Contenido proteico del PRP: Validación, precisión; contenido de proteínas, agregado de 100 µg (%).....	34
Tabla 24: Características de repetibilidad y precisión intermedia: Agregado de 5 µg.....	34
Tabla 25: Características de repetibilidad y precisión intermedia: Agregado de 100 µg.....	35

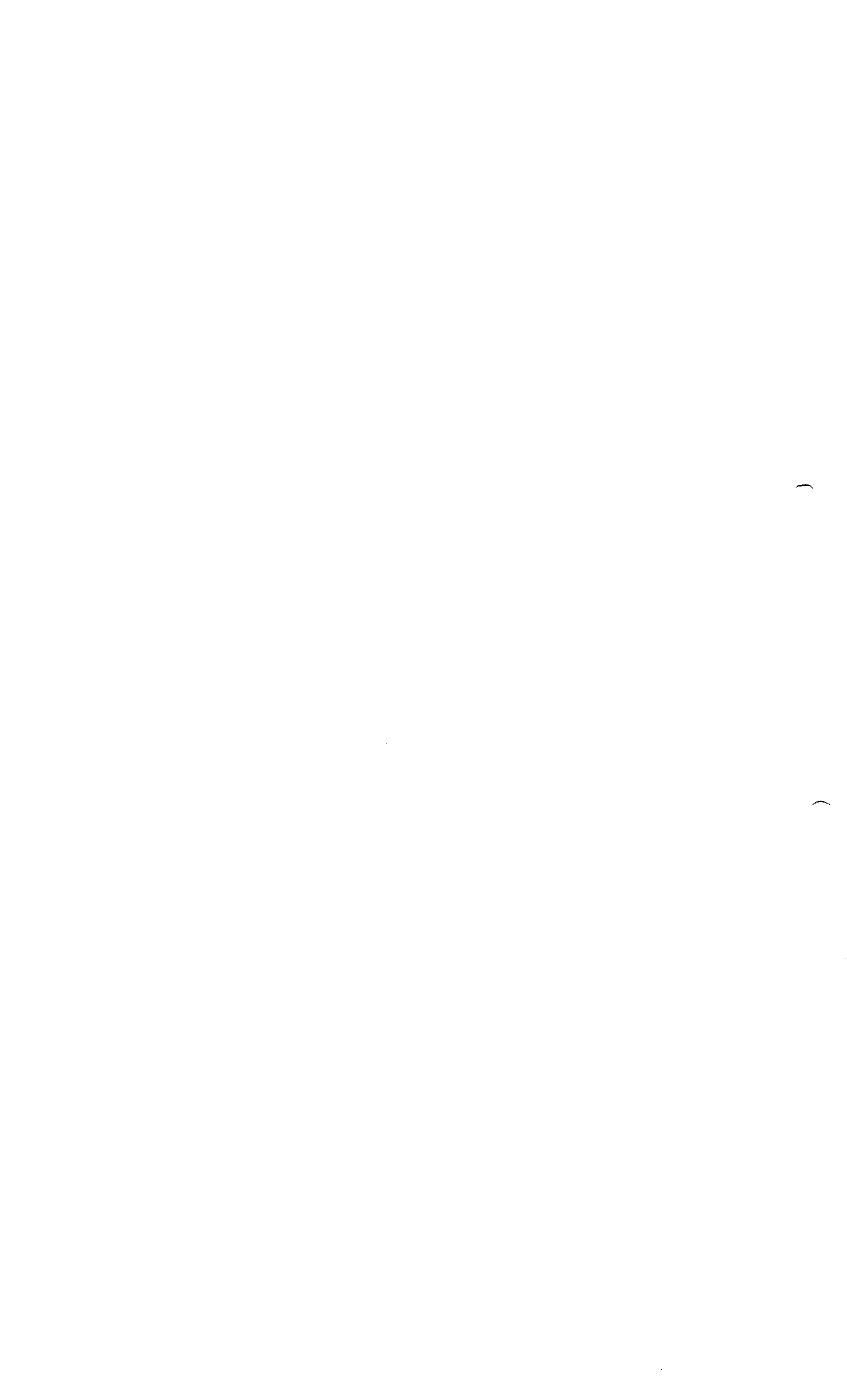




Tabla 26: Contenido de proteína en el PRP: Validación, límite inferior de cuantificación, cultura de los picos del testigo36

Tabla 27: Contenido de agua del PRP: Validación, resumen.....42

Tabla 28: Contenido de disolventes residuales en el PRP: análisis de etanol; validación, resumen44

Tabla 29: Contenido de solventes residuales en el PRP: Análisis de acetona; validación, resumen45

Tabla 30: Contenido de disolventes residuales en el PRP: contenido de éter; validación, resumen46

Tabla 31: Resultados de los análisis de lotes de polisacárido de *Haemophilus* tipo b47

Tabla 32: Composición del sistema de cierre del envase para almacenar los intermedios50

Tabla 33: Información general sobre los lotes de microgránulos de ceftriaxona y de PRP relacionados52

Tabla 34: Resultados de estabilidad para el lote FA199674 de PRP almacenado a ≤ -35 °C, elaborado a partir de microgránulos de ceftriaxona almacenados54

Tabla 35: Información general sobre los lotes de polisacárido de *Haemophilus* tipo b56

Tabla 36: Resultados del control de calidad del polisacárido de *Haemophilus* tipo b después del almacenamiento/sin almacenamiento del producto intermedio58

Tabla 37: Panorama de los estudios de estabilidad del PRP59

Tabla 38: Información general del producto de los lotes de PRP60

Tabla 39: Información general del producto de los lotes de PRP reprocesados60

Tabla 40: Resultados de estabilidad para el PRP almacenado a ≤ -35 °C: Lote FA03534163

Tabla 41: Resultados de estabilidad para el PRP almacenado a ≤ -35 °C: Lote FA03534264

Tabla 42: Resultados de estabilidad para el PRP almacenado a ≤ -35 °C: Lote FA04976265

Tabla 43: Resultados de estabilidad para el PRP reprocesado almacenado a ≤ -35 °C: Lote Hi2096R67

Tabla 44: Resultados de estabilidad para el PRP reprocesado almacenado a ≤ -35 °C: Lote Hi2120R68

Tabla 45: Resultados de estabilidad para el PRP reprocesado almacenado a ≤ -35 °C: Lote Hi2122R69

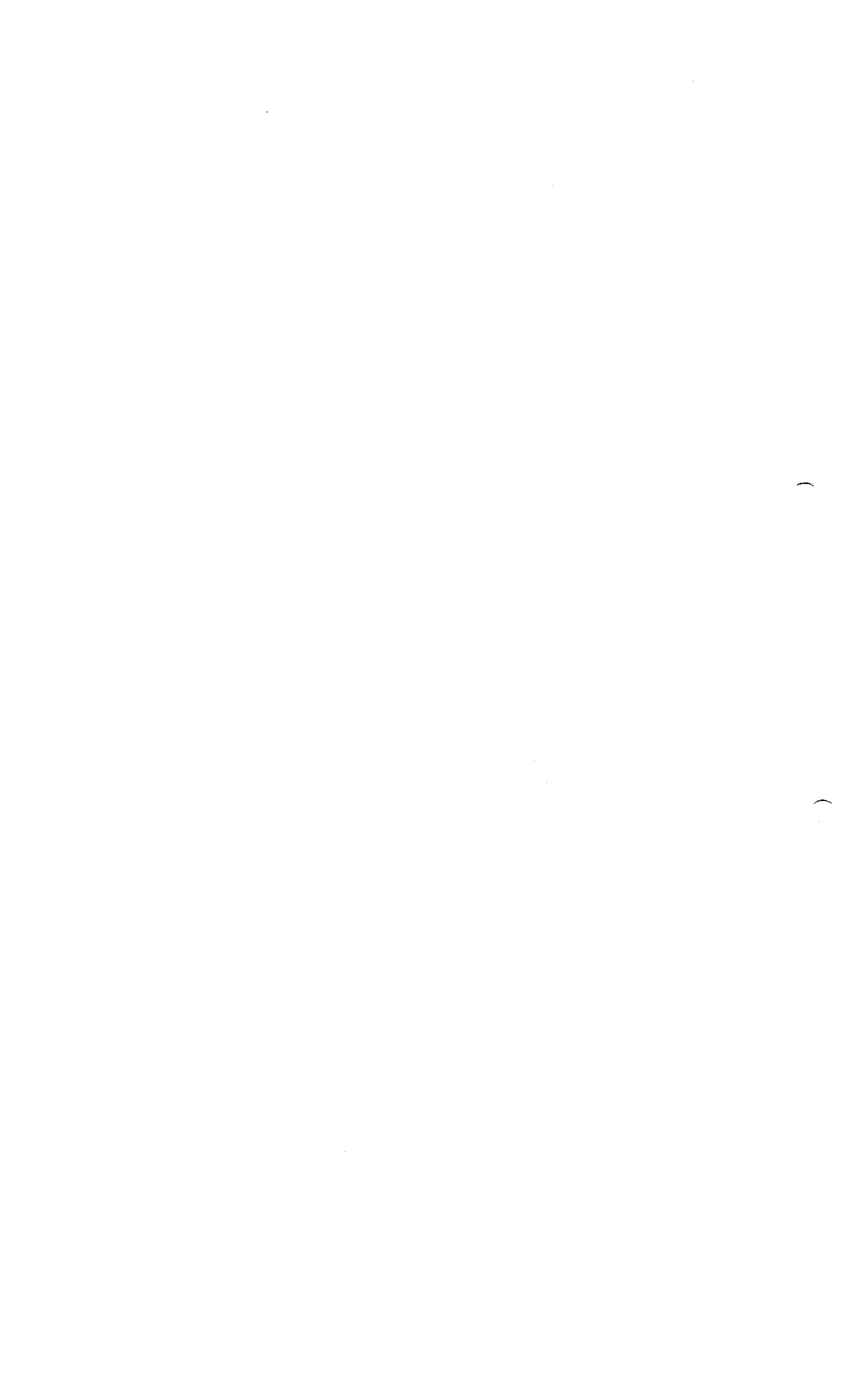
Tabla 46: Distribución del tamaño molecular mediante LP-SEC: validación, resumen.....72

Tabla 47: Distribución del tamaño molecular mediante LP-SEC: Validación, precisión.....72

Tabla 48: Características de repetibilidad y precisión intermedia.....73

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.





Lista de figuras

Figura 1: Cromatograma típico del Vo.....	11
Figura 2: Cromatograma típico del Vd.....	12
Figura 3: Cromatograma típico del Vt	12
Figura 4: Cromatograma típico del PRP sometido a prueba.....	13
Figura 5: Contenido de fósforo en PRP: validación, gráfico de linealidad	26
Figura 6: Contenido proteico en el PRP: validación, gráfica de linealidad.....	32

