



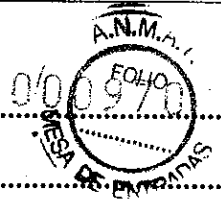
## Sección 3.2.S.2.4 - Controles de los pasos críticos e intermedios Intermedio CTP

### Índice

Lista de tablas .....	3
Lista de figuras .....	5
<b>1 Especificaciones .....</b>	<b>6</b>
<b>2 Procedimientos analíticos .....</b>	<b>7</b>
2.1 Contenido de nitrógeno proteico.....	7
2.2 Densidad óptica a 280 nm y 260 nm.....	9
2.3 Contenido de fósforo.....	9
2.4 Contenido de formaldehído residual libre.....	11
2.5 Título de floculación.....	15
2.6 Pureza antigénica .....	15
2.7 Distribución del tamaño molecular (HPLC): porcentaje de monómeros.....	15
2.8 Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica.....	15
2.9 Ausencia de toxina (toxicidad específica) e irreversibilidad del toxoide .....	15
2.10 Prueba de pirógenos.....	15
<b>3 Validación de los procedimientos analíticos .....</b>	<b>16</b>
3.1 Contenido de nitrógeno proteico.....	16
3.2 Índice $DO_{280}/DO_{260}$ .....	21
3.3 Contenido de fósforo.....	23
3.4 Contenido de formaldehído residual.....	25
3.5 Distribución del tamaño molecular por HPLC (porcentaje de monómeros) .....	35
<b>4 Análisis de lote .....</b>	<b>37</b>
<b>5 Justificación de las especificaciones.....</b>	<b>38</b>



6	Sistema de cierre del envase .....	40
7	Estabilidad .....	41
7.1	Resumen y conclusiones de estabilidad.....	41
7.2	Datos de estabilidad .....	43



  
ROXANA MONTEMILONE  
DIRECTORA TÉCNICA  
SANOFI PASTEUR S.A.

  
CHRISTIAN DOMINGUEZ  
APODERADO  
SANOFI PASTEUR S.A.





## Lista de tablas

Tabla 1: Especificaciones para la proteína tetánica concentrada (CTP) .....	6
Tabla 2: Preparación de las muestras .....	10
Tabla 3: Preparación de las muestras .....	13
Tabla 4: Nitrógeno proteico en la CTP, resumen de validación.....	16
Tabla 5: Nitrógeno proteico en la CTP; validación, linealidad: cantidad de nitrógeno proteico de la muestra (mg).....	17
Tabla 6: Contenido de nitrógeno proteico en el CTP; validación, exactitud: factor de concentración calculado .....	18
Tabla 7: Recuperación porcentual media .....	19
Tabla 8: Contenido de nitrógeno proteico en el CTP; validación, precisión: contenido de nitrógeno proteico (mg/mL).....	19
Tabla 9: características de repetibilidad y precisión intermedia .....	20
Tabla 10: Razón DO <sub>280</sub> /DO <sub>260</sub> del CTP; resumen de validación.....	21
Tabla 11: Índice DO <sub>280</sub> /DO <sub>260</sub> del CTP; validación, precisión Resultados del índice DO <sub>280</sub> /DO <sub>260</sub> .....	21
Tabla 12: Características de repetibilidad y precisión intermedia.....	22
Tabla 13: Contenido de fósforo en CTP: Resumen de validación .....	23
Tabla 14: Contenido de fósforo en el CTP; Validación, límite de detección: Densidades ópticas.....	23
Tabla 15: Media, desviación estándar e intervalo de confianza del 95 % de la media .....	24
Tabla 16: Contenido de formaldehído residual en la CTP; validación, resumen.....	26
Tabla 17: Especificidad, linealidad, exactitud: Concentraciones de formaldehído residual (µg/mg de proteína).....	28
Tabla 18: Recuperación porcentual promedio.....	29
Tabla 19: Contenido de formaldehído residual en la CTP; Validación, exactitud: recuperaciones porcentuales para cada nivel.....	31
Tabla 20: Precisión del análisis al nivel de liberación: Concentraciones de formaldehído residual (µg/mg de proteína) .....	32
Tabla 21: características de repetibilidad y precisión intermedia .....	33
Tabla 22: Precisión del análisis al nivel de cuantificación: Concentración de formaldehído residual (µg/mg de proteína) .....	33
Tabla 23: características de repetibilidad y precisión intermedia .....	34



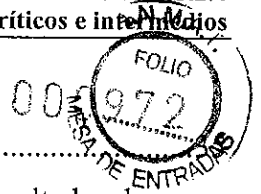


Tabla 24: Distribución del tamaño molecular en la CTP: validación, resumen.....35

Tabla 25: Distribución del tamaño molecular en la CTP: validación, precisión Resultados de monómeros en porcentajes .....35

Tabla 26: Características de precisión intermedia.....36

Tabla 27: Resultados de los análisis de lotes de CTP .....37

Tabla 28: Composición del sistema de cierre del envase para almacenar los intermedios .....40

Tabla 29: Panorama del estudio de estabilidad de la CTP .....41

Tabla 30: Información general del producto de los lotes de CTP .....42

Tabla 31: Resultados de estabilidad para la CTP almacenada a +5 °C ±3 °C: Lote FA023808 ....44

Tabla 32: Resultados de estabilidad para la CTP almacenada a +5 °C ±3 °C: Lote FA024805 .....45

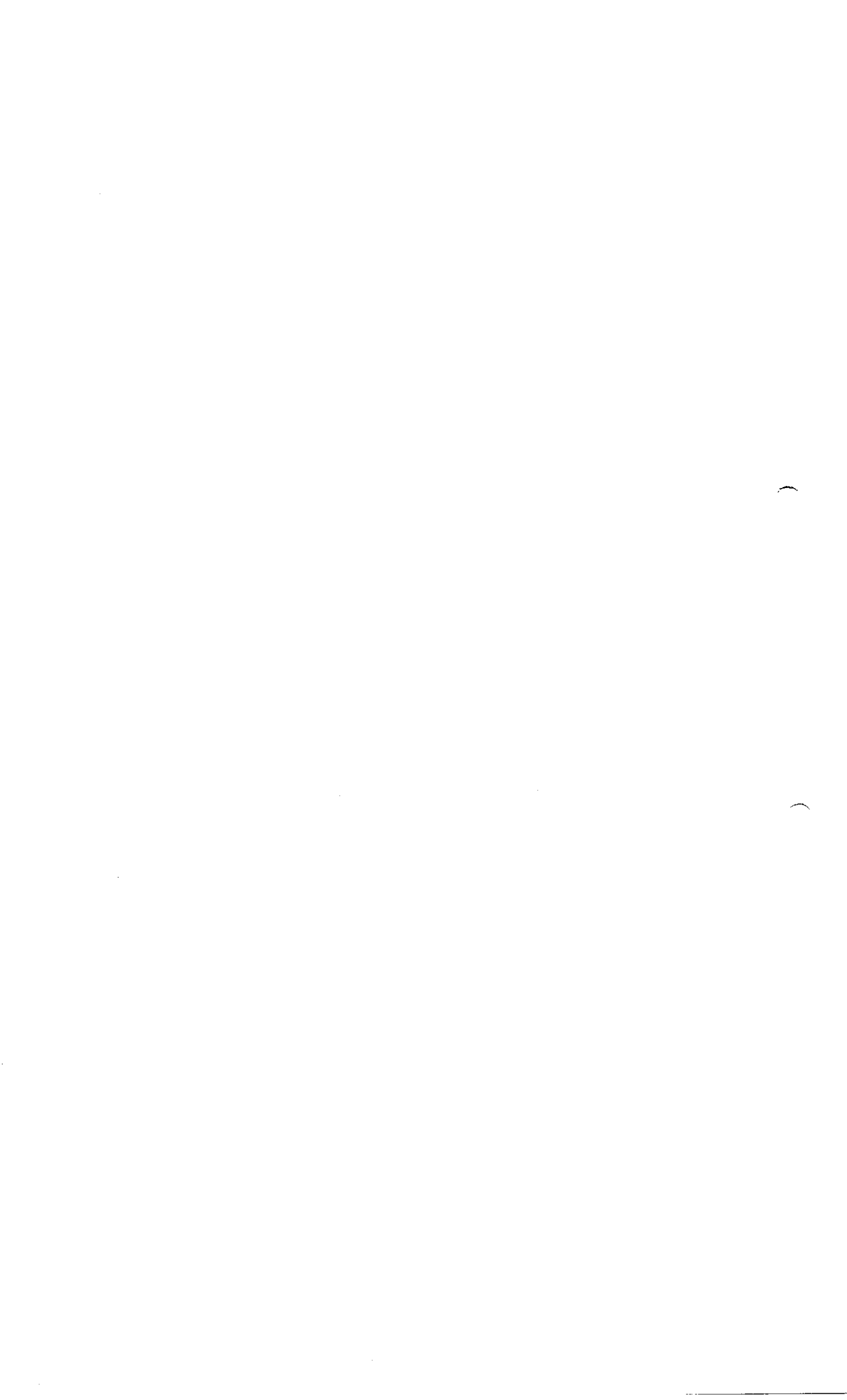
Tabla 33: Resultados de estabilidad para la CTP almacenada a +5 °C ±3 °C: Lote FA024806 .....46





## Lista de figuras

Figura 1: Contenido de nitrógeno proteico en el CTP; validación, gráfica de linealidad .....	18
Figura 2: Gráfico de linealidad.....	30





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

## 1 Especificaciones

Tabla 1: Especificaciones para la proteína tetánica concentrada (CTP)

Pruebas	Requeridas por	Métodos	Criterios de aceptación
Contenido de nitrógeno proteico	Ph. Eur. 0452/1219, edición actual	Ph. Eur. 2.5.9, edición actual y 2.5.33, edición actual, método 7.A Método de Kjeldahl después de la precipitación de proteínas por ácido tricloroacético y mineralización por ácido sulfúrico.	Para cálculo
Razón DO <sub>280</sub> /DO <sub>260</sub>	/	Medición de la densidad óptica	≥ 1,3
Contenido de fósforo	/	Según la Ph. Eur. 2.5.18, edición actual Medición del contenido de fósforo según el método de Chen	< 1,5 µg/mg de proteína
Contenido de formaldehído residual libre	Ph. Eur. 0452/1219, edición actual TRS 800	Método colorimétrico Visible a la espectrofotometría UV (método de Nash)	< 10 µg/mg de proteína
Título de floculación	/	Ph. Eur. 2.7.27, edición actual, prueba de Ramon Floculación visible y comparación con una referencia interna calibrada.	Para calcular la pureza antigénica
Pureza antigénica	Ph. Eur. 0452/1219, edición actual TRS 800/897	Cálculo: valor obtenido mediante la razón entre el título de floculación y el contenido de nitrógeno proteico.	≥ 1500 LI/mg de nitrógeno proteico
Distribución del tamaño molecular (HPLC), porcentaje de monómeros	/	Ph. Eur. 2.2.30, edición actual Cromatografía de exclusión por tamaño (HPLC)	≥ 50 % de monómeros
Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica	Ph. Eur. 0452/1219, edición actual TRS 800	Ph. Eur. 2.6.1, edición actual Filtración por membrana	Sin crecimiento microbiano
Ausencia de toxina (toxicidad específica) e irreversibilidad del toxoide	Ph. Eur. 0452, edición actual TRS 800	Ph. Eur. 0452, edición actual Inyección a cobayos	Cumple con la Ph. Eur. (no se observan síntomas tetánicos y hay por lo menos 93 % de supervivencia)
Prueba de pirógenos	Ph. Eur. 1219, edición actual	Ph. Eur. 2.6.8, edición actual Inyección en conejos	Cumple con la Ph. Eur. (Δ temperatura ≤ +1,15 °C para la prueba en 3 conejos)





## 2 Procedimientos analíticos

Para los procedimientos analíticos descritos en la Farmacopea Europea (Ph. Eur.), sólo se proporciona la referencia y se mencionan detalles específicos si corresponde.

Para los procedimientos analíticos no descritos en la Ph. Eur., se proporcionan los métodos en este capítulo.

### 2.1 Contenido de nitrógeno proteico

#### Referencia

La prueba se lleva a cabo de acuerdo con la monografía 2.5.9 de la Ph. Eur., 2.5.9 "Determination of nitrogen by sulphuric acid digestion" y 2.5.33 "Total protein" (método 7.A) con el método de Kjeldhal.

#### Principio

El nitrógeno orgánico que contiene la muestra analizada se transforma en sulfato de amonio durante una mineralización sulfúrica. Después de alcalinizar con hidróxido de sodio, se recolecta el amoníaco destilado y se analiza con una solución titulada de ácido clorhídrico.

Como se indica en la Ph. Eur. 2.5.33, método 7.A, la interferencia causada por la presencia en la muestra de prueba de sustancias que contienen nitrógeno puede afectar la determinación de las proteínas. En consecuencia, se lleva a cabo la precipitación de la solución de CTP con ácido tricloroacético (TCA) antes del análisis de determinación del nitrógeno.

#### Equipos y reactivos

- **Equipo:** equipo estándar de laboratorio con centrifugadora, unidad y tubos de digestión y sistema de destilación Kjeldahl
- **Reactivos:** agua purificada desionizada, hidróxido de sodio 1 N concentrado y ácido sulfúrico 2/3 N, solución de 5 glucosa monohidrato a razón de 50 g/L en agua purificada, ácido clorhídrico 0,1 N en agua purificada, catalizador de mineralización en comprimido, ácido tricloroacético al 40 % p/v en agua purificada y ácido tricloroacético al 5 % p/v en agua purificada, solución de control interno de nitrógeno a razón de 2 mg/mL en agua purificada (por lo general se usa sulfato de amonio desecado).

#### Soluciones

- **Solución muestra:** use 1 mL de la solución de CTP de prueba y afofe a 5 mL con agua purificada. Agregue 3 mL de solución de ácido tricloroacético al 40 % p/v, agite energicamente y deje a temperatura ambiente. Centrifugue a por lo menos 4000 rpm durante varios minutos y deseche el sobrenadante. Agregue 5 mL de solución de ácido tricloroacético al 5% p/v, agite energicamente y deje a temperatura ambiente. Centrifugue a por lo menos 4000 rpm durante varios minutos y deseche el sobrenadante. Disuélvase el precipitado con 1 mL de solución de hidróxido de sodio 1 N. Agregue a un tubo de digestión. Duplique..





- **Aparato testigo:** corresponde a un tubo de digestión vacío. Triplique.
- **Testigo digerido:** agregue 1 mL de solución de 50 g/L de glucosa monohidrato a un tubo de digestión. Duplicar.
- **Solución de control:** agregue 1 mL de solución de control de nitrógeno a razón de 2 mg/mL a un tubo de digestión. Duplique.

**Procedimiento operativo**

Para digerir los tubos del aparato testigo, las soluciones de control, el testigo digerido y las soluciones muestra para determinar el contenido de nitrógeno total o de nitrógeno proteico, agregue 1 comprimido del catalizador de mineralización y 10 mL de ácido sulfúrico concentrado.

La digestión se realiza con una unidad de digestión (por lo común durante 120 minutos, con 40 minutos a + 200 °C, 40 minutos a + 300 °C y 40 minutos a + 400 °C). Las condiciones pueden variar según el equipo utilizado.

**Lectura, cálculo, resultados**

Considerando que 1 mL de HCl 0,1 N corresponde a 1,4 mg de nitrógeno, se utilizan las siguientes ecuaciones para calcular el contenido de nitrógeno de las soluciones muestra y de control:

$$\text{mg de nitrógeno por mL de muestra} = \frac{(V - V_0) \times 1.4 \times d}{X}$$

$$\text{mg de nitrógeno por mL de control interno} = \frac{(V - V_0') \times 1.4 \times d}{1}$$

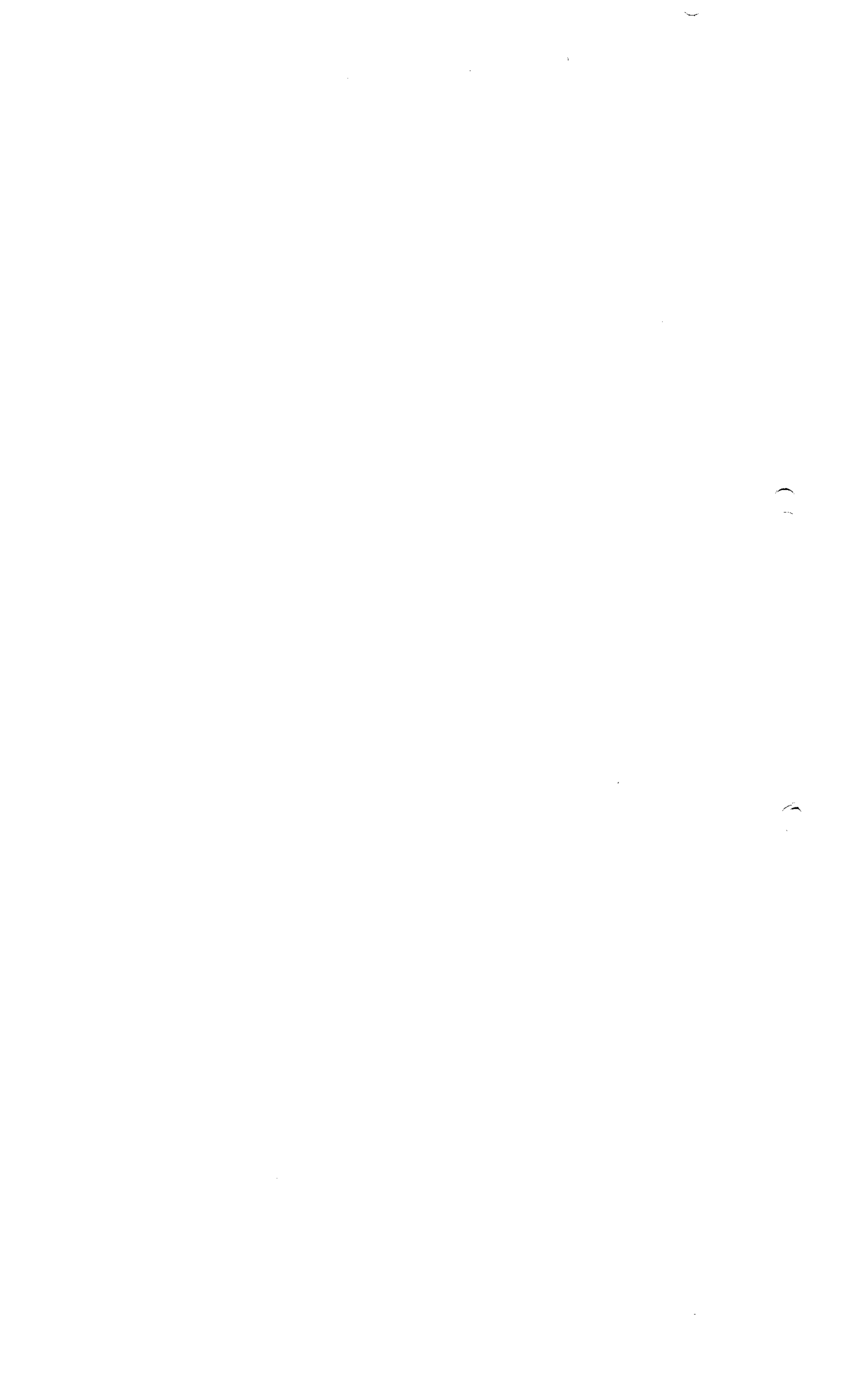
Donde:

- V = volumen de HCl 0,1 N usado para la solución de muestra digerida (en mL)
- V<sub>0</sub> = volumen medio de HCl 0,01 N usado para las soluciones testigo digeridas (en mL)
- V<sub>0'</sub> = volumen medio de HCl 0,01 N usado para el testigo del aparato (en mL)
- X = volumen de la muestra de prueba del producto (en mL)
- d = dilución

Calcular el contenido proteico de la CTP multiplicando el contenido de nitrógeno proteico, expresado en mg/mL, por 6,25.

**Criterios de validez**

La diferencia entre los valores de los 2 ensayos del control interno y la diferencia entre los valores de los 2 ensayos de soluciones de muestra (respectivamente, contenido de nitrógeno total y proteico) es inferior al 10 % (no es aplicable si VV<sub>0</sub> es bajo).





## 2.2 Densidad óptica a 280 nm y 260 nm

Se aplica el método utilizado para el PTP (vea la sección 3.2.S.2.4 Controles de los pasos críticos e intermedios, Intermedio PTP).

## 2.3 Contenido de fósforo

### Referencia

Chen P.S., Microdetermination of Phosphorus, Anal. Chem., 1956, 28, 1756-1758.

### Principio (método de Chen, después de la mineralización)

El fósforo se mineraliza a fosfatos en ácido caliente. El fosfato y el molibdato de amonio forman un complejo fosfo-molibdico que, cuando se reduce, desarrolla un color azul. Este color puede medirse por espectrofotometría a 825 nm.

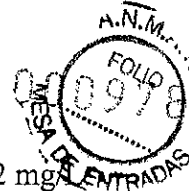
### Equipos y reactivos

- **Equipo:** equipo estándar de laboratorio y espectrofotómetro UV visible.
- **Reactivos:** agua purificada, agua para inyectables, ácido ascórbico a razón de 10 % p/v en agua purificada, HCL 1 N, ácido sulfúrico 6 N, molibdato de amonio 2,5 % p/v, ácido perclórico 0,5 M en agua purificada, solución estándar de fósforo NIST (Instituto Nacional de Estándares y Tecnologías) a razón de 10 mg/mL (para la solución de control).
- **Referencia:** dihidrogenofosfato de potasio (secado previamente a +100°C).

### Soluciones

- **Reactivo de coloración:** agua purificada/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 6N/molibdato de amonio al 2,5% p/v/ácido ascórbico al 10% p/v (2 volúmenes/1 volumen/1 volumen/1 volumen). Agregar estos cuatro reactivos en el orden dado. Esta solución se debe preparar en forma extemporánea y debe ser amarilla.
- **Soluciones estándar de referencia:** utilice KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> previamente secado a +100°C, agua purificada y una alícuota de ácido sulfúrico concentrado para disolución para preparar una solución madre de referencia a razón de 80 mg/L de fósforo. Diluya esta solución en agua purificada para preparar un estándar de referencia de trabajo de 2 mg/L de fósforo.
- **Solución de control interno de fósforo a razón de 50 µg/mL en HCl al 0,05 %:** utilice una solución NIST a razón de 10 mg/mL, HCl 1 N y agua purificada.
- **Solución de muestra de prueba:** antes del análisis, la proteína se debe precipitar con ácido perclórico 0,5 M, las condiciones típicas que se deben aplicar son: en el tubo de ensayo, analizar 2 mL de solución de CTP, agregar 2 mL de ácido perclórico 0,5 M, tapar, agitar y centrifugar a 4000 rpm durante 10 minutos. Dividir el sobrenadante en alícuotas de 2 mL para realizar el análisis.





**Procedimiento operativo**

Producir el rango de calibración usando el estándar referencia de trabajo a razón de 2 mg/L

Realizar 4 análisis para el control interno y 2 para cada muestra

Llevar a cabo las operaciones descritas en la tabla 2 con los tubos de ensayo.

**Tabla 2: Preparación de las muestras**

	Testigo	1	2	3	4	Pruebas	Control interno
Sobrenadante mL	-	-	-	-	-	TS* ≤ 4	-
Solución interna de fósforo de 50 µg/mL mL	-	-	-	-	-	-	0,1
Solución estándar de referencia de trabajo a 2 mg/L mL	-	0,5	1	2	4	-	-
Agua purificada mL	4	3,5	3	2	-	4 - TS	3,9
Reactivo de coloración mL	4	4	4	4	4	4	4
Agite. Deje los tubos en un baño de agua a 37 °C durante 2 horas.							
Microgramos de fósforo en la muestra de prueba	0	1	2	4	8	a	a†

\* Muestra de prueba

† Microgramos de fósforo en el control interno

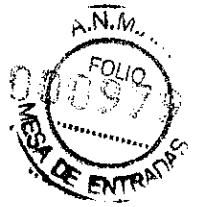
**Lectura, cálculo, resultados**

Medir la absorbancia de cada tubo a 825 nm en comparación con el testigo, en un trayecto óptico de 1 cm.

Establecer la regresión lineal de la curva de calibración y deducir el coeficiente de correlación.

Mediante la ecuación de línea, calcule la cantidad de fósforo (µg/TS) a partir de la DO de la muestra de prueba.





La concentración del producto que se evaluará se obtiene con la siguiente fórmula:

$$\mu\text{g de fósforo por mL} = \frac{a \times \text{dilución}}{\text{TS}}$$

Donde:

- a: cantidad de fósforo en la muestra de prueba expresada en  $\mu\text{g}$  por muestra de prueba (TS)
- dilución: dilución de la muestra de prueba
- TS: volumen de la muestra de prueba o del sobrenadante (mL)

Expresar el contenido de fósforo en  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteína usando la siguiente fórmula:

$$\text{Contenido de fósforo en } \mu\text{g}/\text{mg de proteína} = \frac{\text{contenido de fósforo en } \mu\text{g}/\text{mL}}{\text{contenido proteico (mg/mL)}}$$

Donde:

Contenido proteico (mg/mL) obtenido usando el contenido de nitrógeno proteico (vea el capítulo 2.1).

#### ***Criterios de validez***

El coeficiente de correlación de la curva de calibración debe ser, por lo menos, igual a 0,9990.

La desviación relativa entre los 4 análisis de la muestra interna de control debe ser menor o igual al 10 %.

La desviación relativa entre los 2 análisis de la misma muestra debe ser menor o igual al 10 %.

La concentración de fósforo en las muestras debe cumplir con las especificaciones de cada una de las muestras analizadas.

## **2.4 Contenido de formaldehído residual libre**

### ***Referencia***

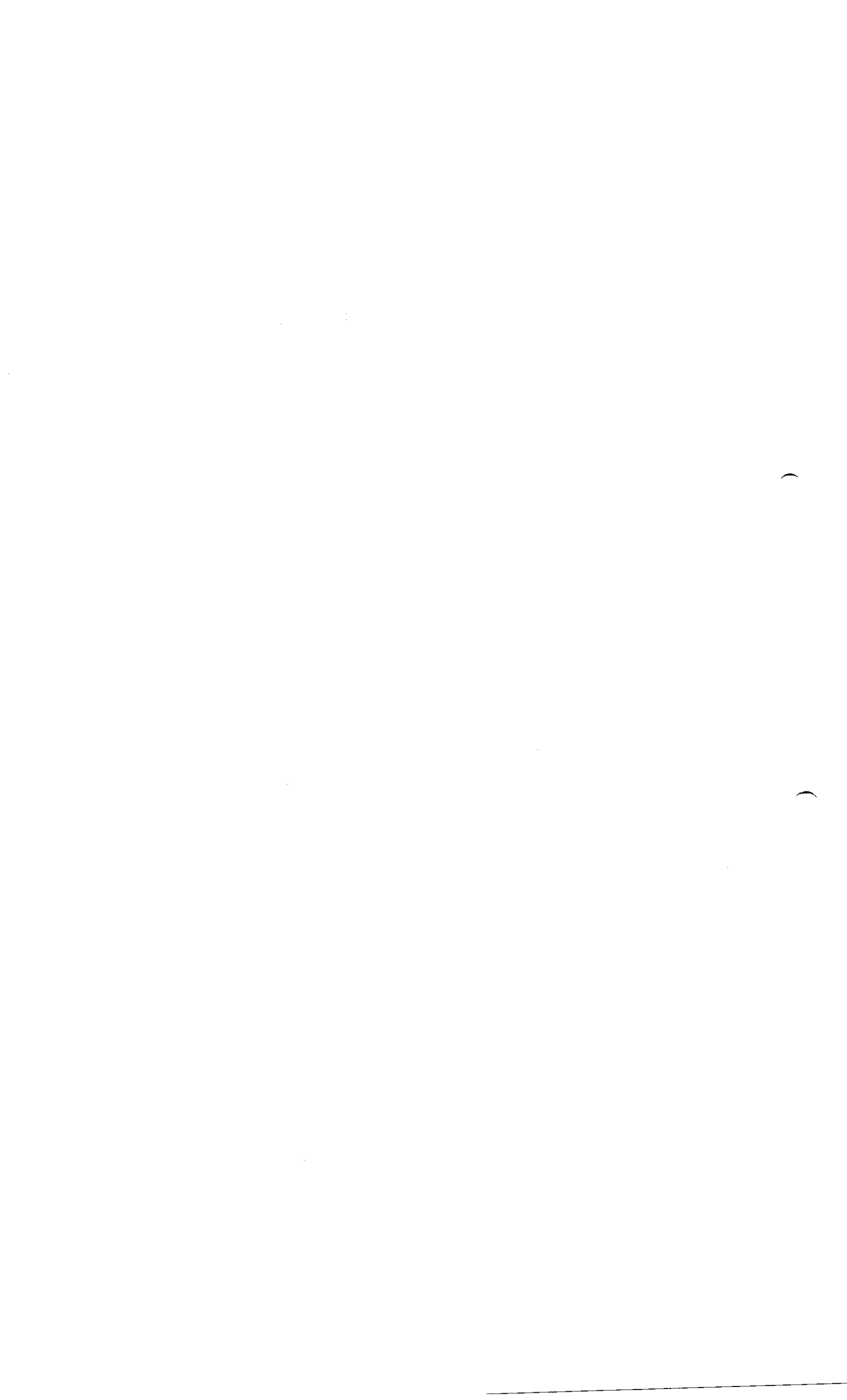
Esta prueba se basa en el método de Nash T., Biochem. J., The Colorimetric Estimation of Formaldehyde by means of the Hantzsch Reaction, 1953, 55 (416-421).

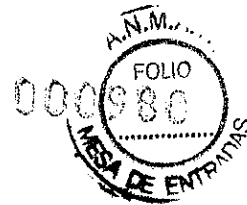
La prueba difiere del método 2.4.18 de la Ph. Eur. 2.4.18 "Free formaldehyde", ya que el método aplicado corresponde a un ensayo con un rango de calibración adaptado.

### ***Principio***

Con acetyl acetona y en presencia de un exceso de sales de amoníaco, el formaldehído produce un compuesto de color amarillo: 3,5-diacetyl 1,4-dihidrolutidina que se mide fotométricamente en el pico de absorción (413 nm).

La intensidad de la coloración es proporcional a la cantidad de formaldehído presente en la muestra.





**Equipos**

Equipo estándar de laboratorio

**Reactivos**

Las cantidades son indicativas y se pueden multiplicar o dividir por un factor determinado, si fuera necesario.

- Solución para el estándar madre de referencia (proveedor 1): formaldehído con un contenido de aproximadamente 40 % p/v
- Solución para el control interno (proveedor 2): formaldehído con un contenido de aproximadamente 40 % p/v
- Tampón de acetato:

Acetato de amonio ..... 150 g  
Ácido acético glacial ..... 3 mL  
Acetil acetona incolora ..... 2 mL  
Agua para inyectables (WFI)..... hasta 1000 mL

Esta solución debe desecharse tan pronto como presente un color amarillo intenso.  
Almacenamiento a +5 °C ± 3 °C

- Tampón de acetato sin acetil acetona:

Acetato de amonio ..... 75 g  
Ácido acético glacial ..... 1,5 mL  
WFI..... hasta 500 mL  
Almacenamiento a +5 °C ± 3 °C

- Preparación de la solución estándar de referencia madre de 10 mg/L:

Utilice una solución comercial al 40 % p/v con título controlado.

Filtre la solución.

Diluya la solución estándar madre a razón de 1/100 como sigue: esto produce la solución (1)

Solución de formaldehído..... 1 mL  
WFI..... hasta 100 mL

Luego diluya a razón de 1/400 como sigue:

Solución de formaldehído (1)..... 5 mL  
Metanol..... 200 mL  
WFI..... hasta 2000 mL

Almacenamiento a +5 °C ± 3 °C

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

