



Lista de tablas

Tabla 1: Parámetros de producción registrados durante la validación de la fermentación de *Clostridium tetani* 8

Tabla 2: Control durante el proceso realizado durante la validación de la fermentación de *Clostridium tetani* 10

Tabla 3: Parámetros de producción registrados durante la validación de la cosecha, tratamiento y detoxificación de la toxina tetánica 13

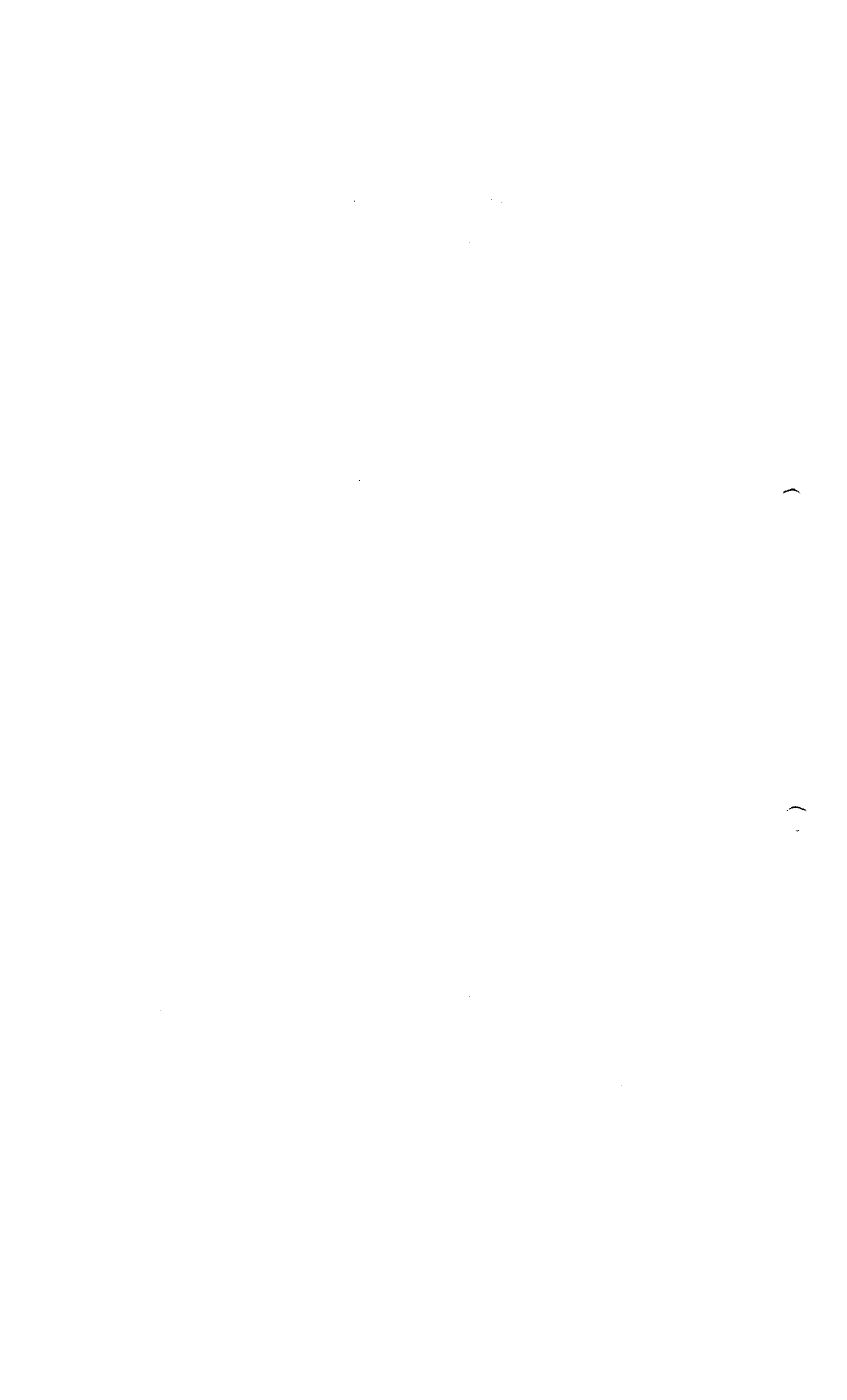
Tabla 4: Control durante el proceso realizado sobre el toxoide tetánico crudo para validar la cosecha, el tratamiento y la detoxificación..... 15

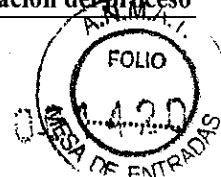
Tabla 5: Datos de los parámetros de producción registrados durante el paso crítico 9 = detoxificación 17

Tabla 6: Parámetros de producción registrados durante la validación de la purificación del toxoide tetánico crudo 19

Tabla 7: Controles durante el proceso realizados durante la validación de la purificación del toxoide tetánico crudo 20

Tabla 8: Resultados de control de calidad para el toxoide tetánico purificado 22





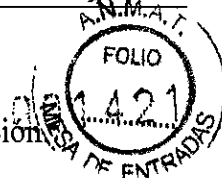
Lista de figuras

Figura 1: Afiliación de los 5 lotes de uniformidad de toxina tetánica cruda elaborados7


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.





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

1 Introducción

La producción del toxoide tetánico purificado (PTT) está dividida en tres pasos de producción principales:

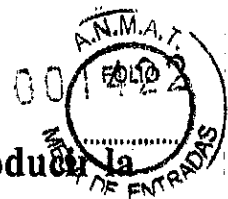
- Fermentación de *Clostridium tetani* para producir la toxina tetánica cruda, con un tamaño de lote de fermentación industrial de 2400 litros.
- Cosecha, tratamiento y detoxificación para obtener el toxoide tetánico crudo (CTT).
- Purificación para obtener el toxoide tetánico purificado (PTT).

Cada parte del proceso de elaboración se ha validado mediante la producción y el análisis de lotes industriales y consistió en la evaluación de:

- Parámetros de producción: los definidos en 3.2.S.2.2 Cultivo y cosecha celular y en 3.2.S.2.2 Reacciones de purificación y modificación (consulte las diferentes tablas de esta sección).
- Controles durante el proceso (IPC): los definidos en 3.2.S.2.2 Cultivo y cosecha celular y en 3.2.S.2.2 Reacciones de purificación y modificación (consultar las diferentes tablas de esta sección).
- Pruebas de control de calidad del principio activo: las definidas en 3.2.S.4.1 Especificaciones.
- Pasos críticos: los definidos y presentados en 3.2.S.2.4 Control de los pasos críticos e intermedios.
- Estudios adicionales de caracterización cuando corresponde.

Cada paso de la producción se validó para demostrar que el proceso de elaboración permite producir PTT de manera uniforme y con la calidad requerida (descrita en 3.2.S.4.1 Especificaciones).

En las siguientes secciones se describen los resultados de validación obtenidos para cada paso del proceso de elaboración, e incluyen una discusión de los resultados y su conclusión.



2 Validación de la fermentación de *Clostridium tetani* para producción de la toxina tetánica cruda

2.1 Introducción

En esta sección se cubre la validación del proceso de fermentación de *Clostridium tetani*, desde la preparación del inóculo hasta la lisis celular para obtener la toxina tetánica cruda.

Se produjeron nueve lotes consecutivos de toxina tetánica cruda según el proceso de fermentación descrito en 3.2.S.2.2 Cultivo y cosecha celular y en 3.2.S.2.2 Reacciones de purificación y modificación.

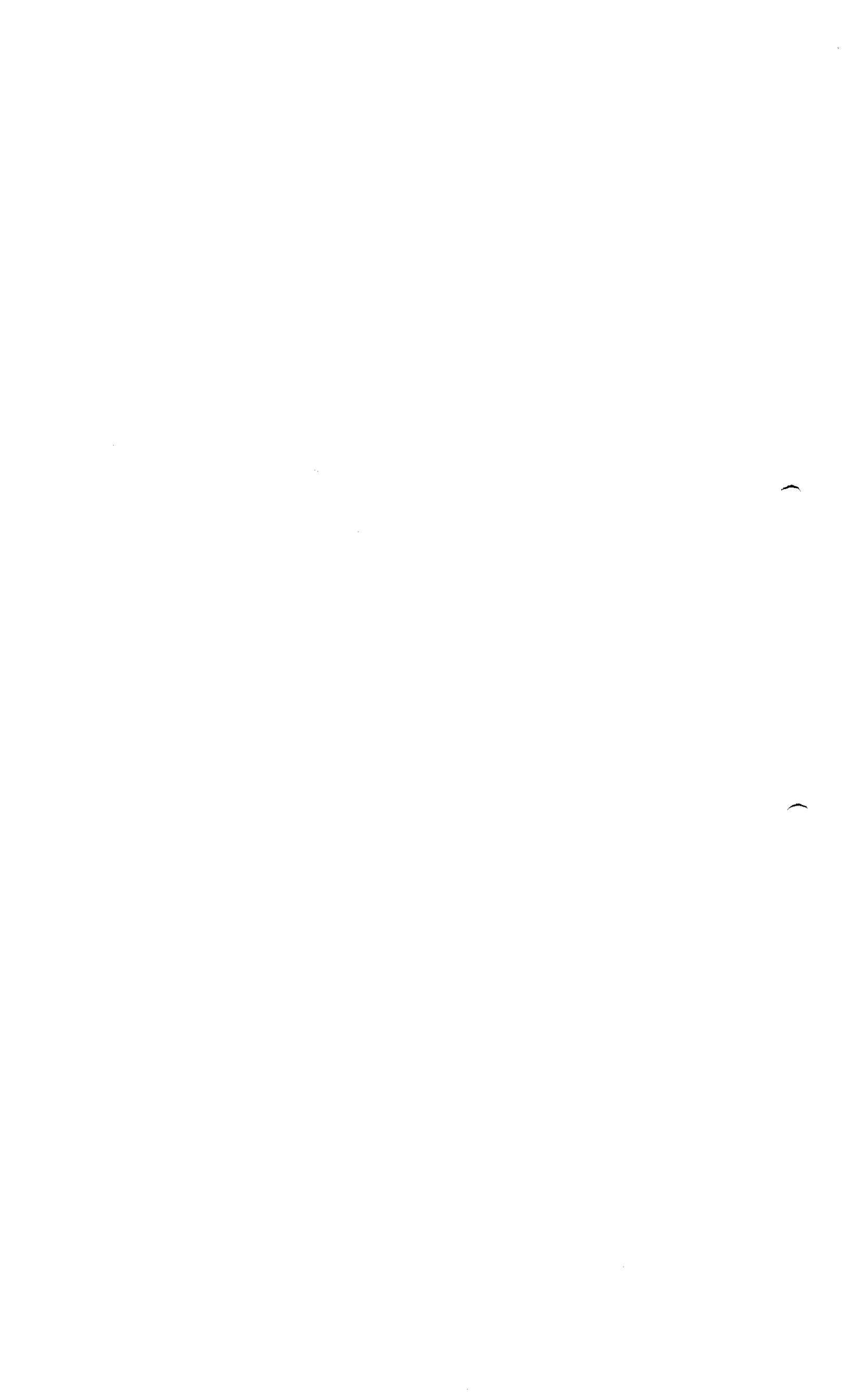
Nota: cinco de esos nueve lotes se emplearon para elaborar lotes de toxoide tetánico crudo, cuyos resultados analíticos se presentan en la sección 3. Otros cuatro lotes de toxina tetánica cruda se emplearon para otro producto (proteína portadora del polisacárido de Haemophilus influenzae tipo b) que utiliza el mismo intermedio de toxina tetánica; sus resultados analíticos, por tanto, no se presentan aquí.

Durante los programas de validación, todos los parámetros de producción se ajustaron a los rangos operativos y los IPC cumplieron los criterios de aceptación descritos en 3.2.S.2.4 Control de los pasos críticos e intermedios.

Las características de la toxina tetánica cruda obtenida al final de la etapa de lisis fueron analizadas según los IPC.

2.2 Principio

En los siguientes capítulos se presentan, en primer lugar, los resultados obtenidos para los parámetros de producción y para las pruebas de control durante el proceso que se registraron para el proceso de fermentación.

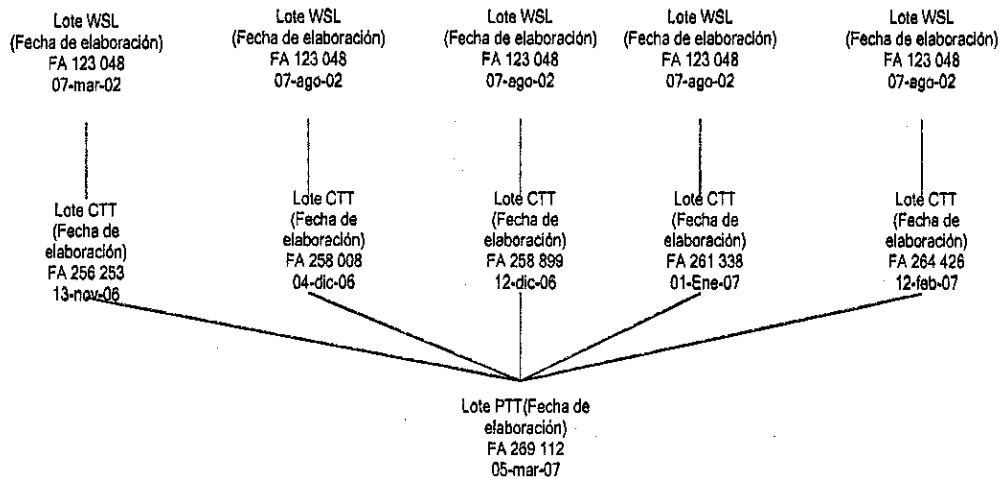




2.3 Resultados para el proceso de fermentación

La afiliación de los cinco lotes de toxina tetánica cruda producidos según el proceso de fermentación se presenta en la figura 1. La numeración de los lotes corresponde al lote de toxoide tetánico crudo obtenido a partir de los lotes de toxina tetánica.

Figura 1: Afiliación de los 5 lotes de uniformidad de toxina tetánica cruda elaborados



2.3.1 Parámetros de producción

Los parámetros de producción estudiados durante la fermentación de *Clostridium tetani* (presentados en 3.2.S.2.2 Cultivo y cosecha celular), desde la preparación del inóculo (etapa 1) hasta la lisis celular (etapa 6), se presentan en la tabla 1.

Todos los resultados cumplen con los rangos operativos definidos.

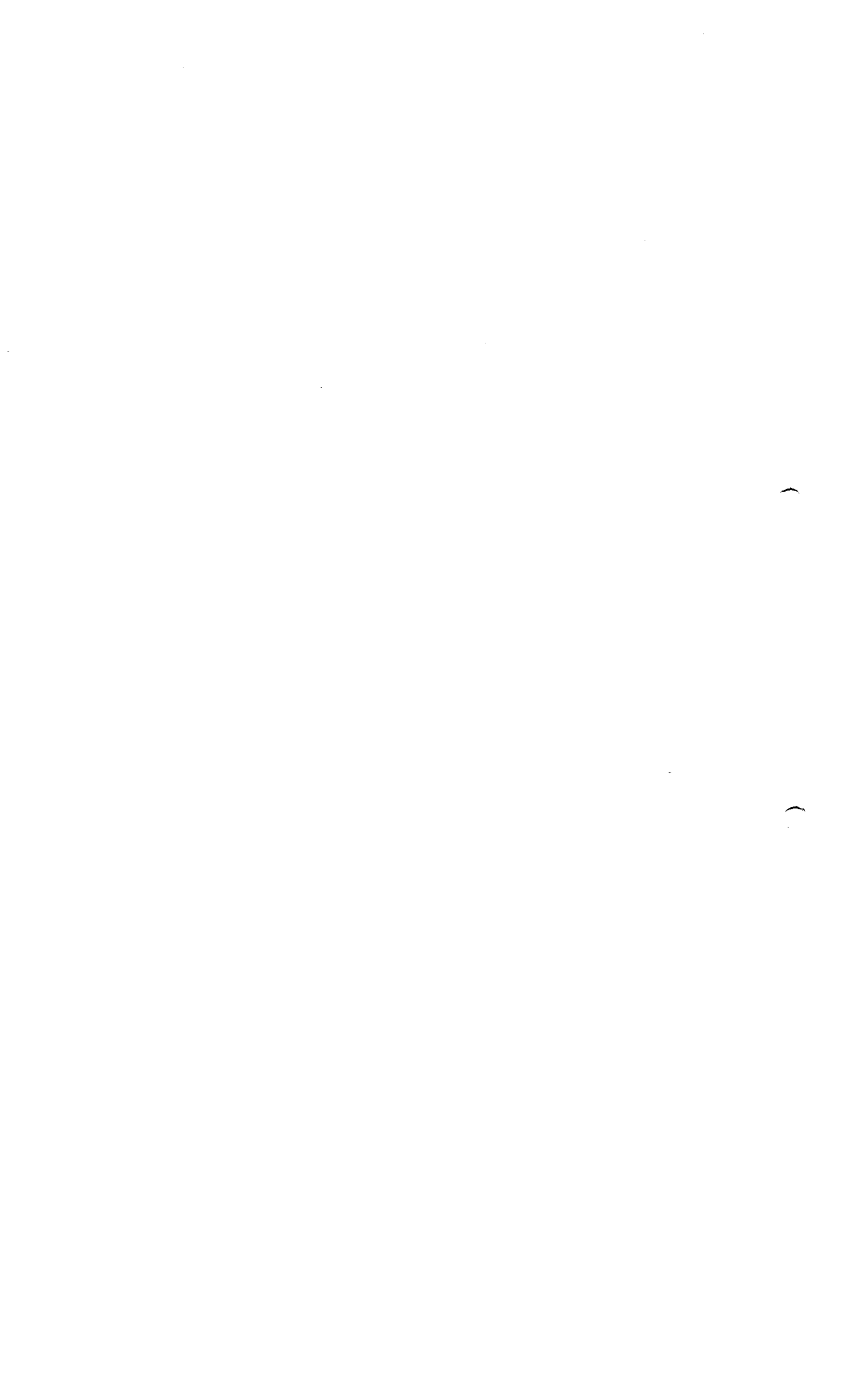
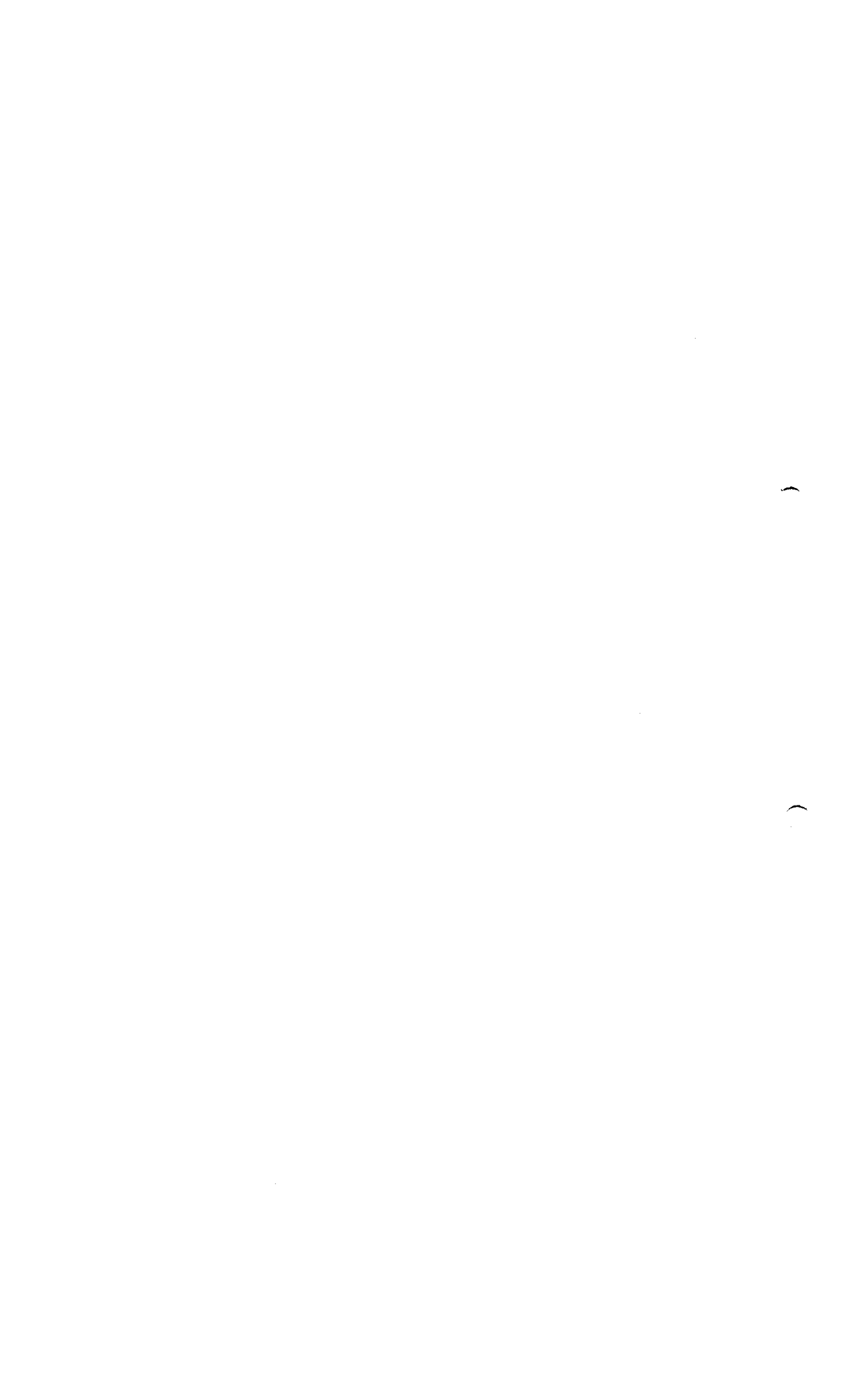




Tabla 1: Parámetros de producción registrados durante la validación de la fermentación de *Clostridium tetani*

	Parámetros de producción	Rangos operativos
Etapa 1: preparación del inóculo	Temperatura	+ 34 °C a + 36 °C
	Duración	24 a 72 h
Etapa 2: 1 ^{er} precultivo	Temperatura	+ 34 °C a + 36 °C
	Duración	6 a 10 h
Etapa 3: 2 ^o precultivo	Temperatura	+ 34 °C a + 36 °C
	Duración	12 a 20 h
Etapa 4: 3 ^{er} precultivo	Temperatura	+ 34 °C a + 36 °C
	Duración	6 a 10 h
Etapa 5: cultivo industrial	Temperatura	+ 34 °C a + 36 °C
	Duración	138 a 146 h
Etapa 6.b: lisis (adición de NaCl y citrato de Na)	Duración del contacto con las sales	12 a 20 h





2.3.2 Controles durante el proceso

Los resultados de los IPC realizados durante la fermentación de *Clostridium tetani* se presentan en la tabla 2.

Todos los resultados cumplen con los criterios de aceptación definidos.

2.3.3 Pasos críticos

No se identifica ningún paso crítico durante la fermentación de *Clostridium tetani*.

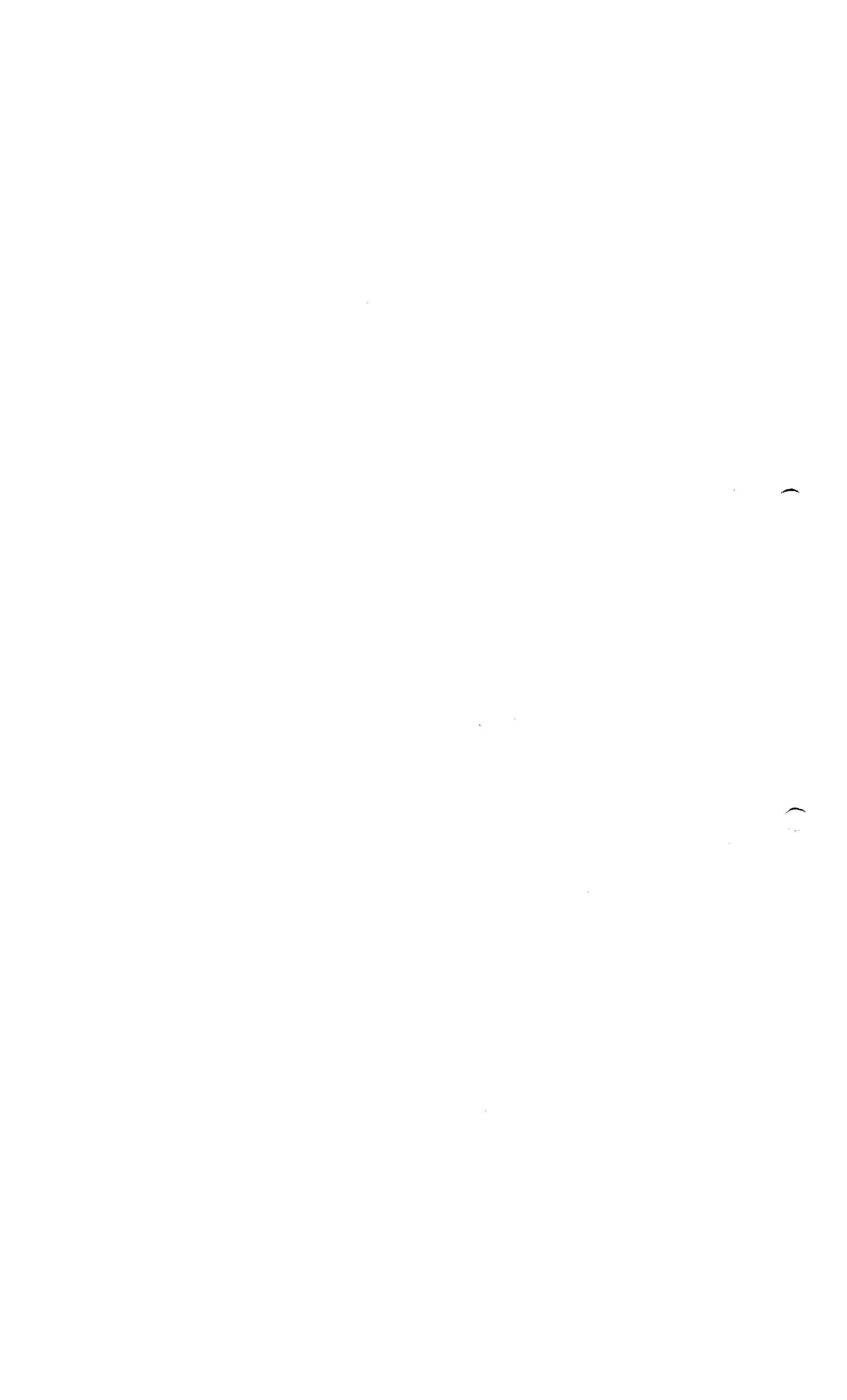


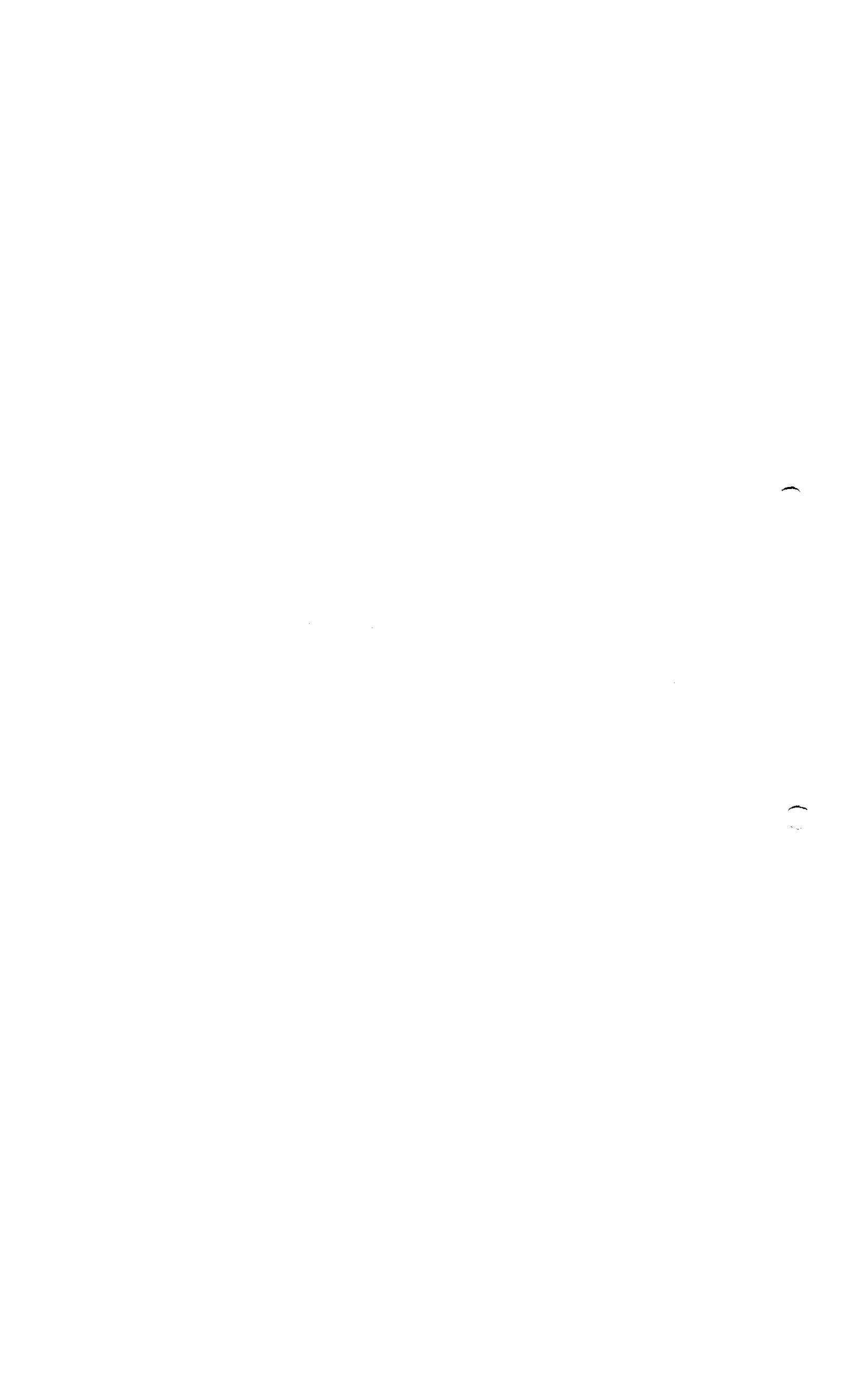
Tabla 2: Control durante el proceso realizado durante la validación de la fermentación de *Clostridium tetani*

Etapa	IPC	Justificación	Criterios de aceptación	FA258008	FA258899	FA261338	FA264426
1: preparación del inóculo	Tinción de Gram	Identificar la cepa	Bacilo gram positivo	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
	Pureza	Controlar la pureza del cultivo	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
4: 3 ^{er} pre-cultivo	Tinción de Gram	Controlar la pureza del cultivo	Bacilo gram positivo	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
	Pureza	Controlar la pureza del cultivo	Conforme	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
5: cultivo industrial	Tinción de Gram	Controlar la pureza del cultivo	Bacilo gram positivo	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
	Título de flocculación (Lf/ml)	Estimar el rendimiento de la toxina	≥ 40	60	75	60	50
6b: lisis (adición de NaCl y citrato de Na)	Título de flocculación (Lf/ml)	Cuantificar el título de la toxina	> 36	60	80	70	55

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A

CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A







2.4 Conclusión

Todos los valores registrados para los parámetros de producción durante la fermentación de *Clostridium tetani*, desde la preparación del inóculo hasta la lisis celular de la toxina tetánica, cumplen con los rangos operativos definidos anteriormente.

Todos los controles durante el proceso medidos para la toxina tetánica cumplen los criterios de aceptación.

En conclusión, el proceso de elaboración para la fermentación de *Clostridium tetani* se considera validado.

3 Validación del toxoide tetánico crudo (CTT)

3.1 Introducción

En esta sección se cubre la validación de los pasos de cosecha, tratamiento y detoxificación de la toxina tetánica cruda para obtener el toxoide tetánico crudo (CTT).

Se utilizaron cinco de los nueve lotes de toxina tetánica cruda (consulte la sección 2.1) producidos según el proceso de fermentación (tamaño del lote de fermentación industrial de 2400 L) descrito en 3.2.S.2.2 Cultivo y cosecha celular para elaborar 5 lotes de CTT (FA256253, FA258008, FA258899, FA261338 y FA264426).

Todos los resultados registrados para los parámetros de producción durante el proceso cumplieron con los rangos operativos, en especial para los parámetros de producción de control del paso crítico (detoxificación) que se describe en 3.2.S.2.4 Control de los pasos críticos e intermedios.

También se registraron los controles durante el proceso en el curso de los programas de validación y se los comparó con los criterios de aceptación.

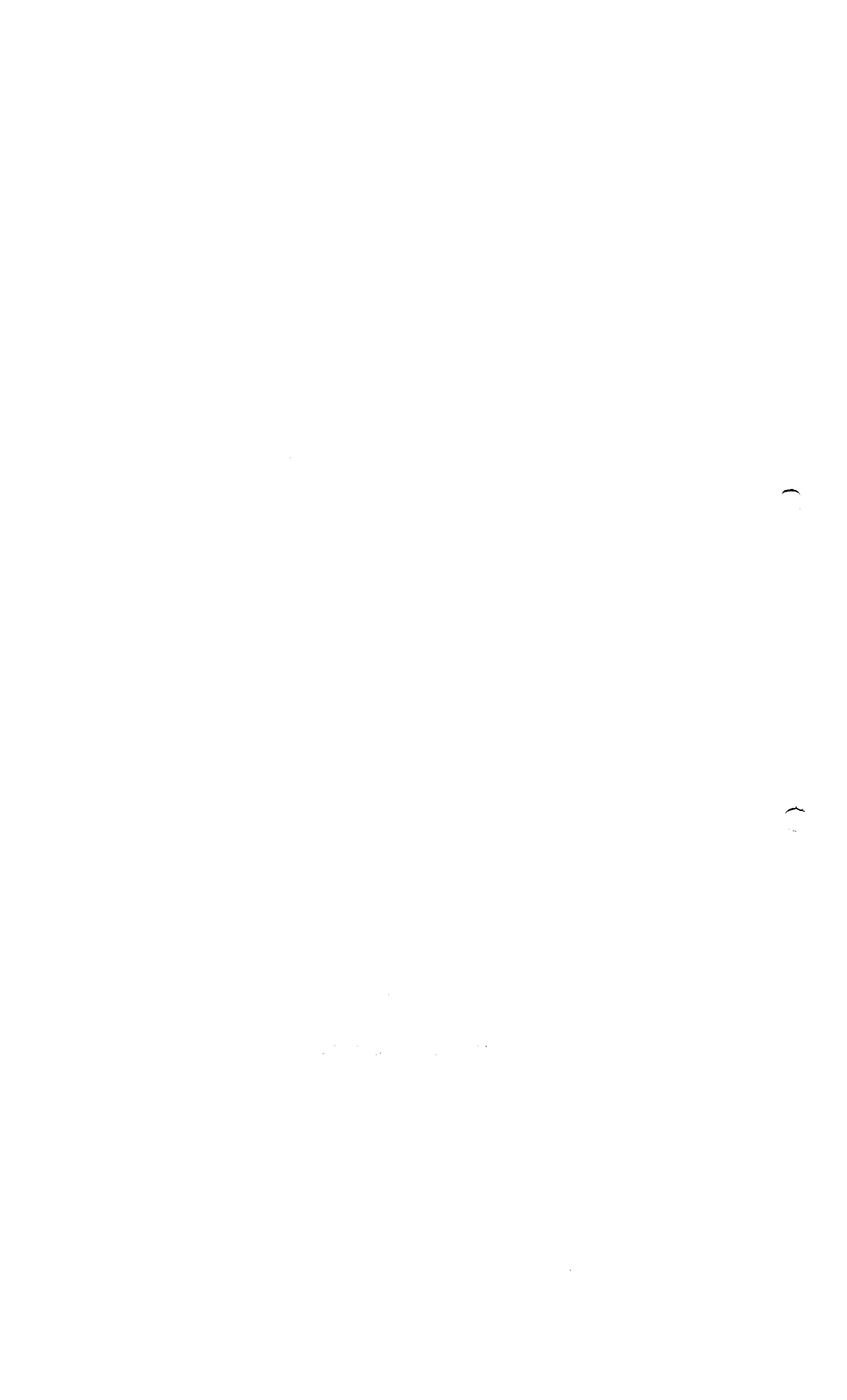
Las características del toxoide tetánico crudo obtenido al final de la etapa de detoxificación fueron analizadas según los IPC y los controles complementarios.

3.2 Principio

En los siguientes capítulos se presentan, en primer lugar, los resultados obtenidos para los parámetros de producción y para los controles durante el proceso, entre ellos los resultados obtenidos para el paso crítico registrado para el proceso.

3.3 Resultados para el proceso

La afiliación entre los cinco lotes de CTT obtenidos a partir de los lotes de toxina tetánica cruda producidos según el proceso de fermentación se presenta en la figura 1.






3.3.1 Parámetros de producción

Los parámetros de producción, o valores objetivo, estudiados durante la cosecha, tratamiento y detoxificación de la toxina tetánica cruda que conducen al CTT (presentados en 3.2.S.2.2 Cultivo y cosecha celular y en 3.2.S.2.2 Reacciones de purificación y modificación) se presentan en la tabla 3.

Todos los resultados cumplen con los rangos operativos definidos.


JULIANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.

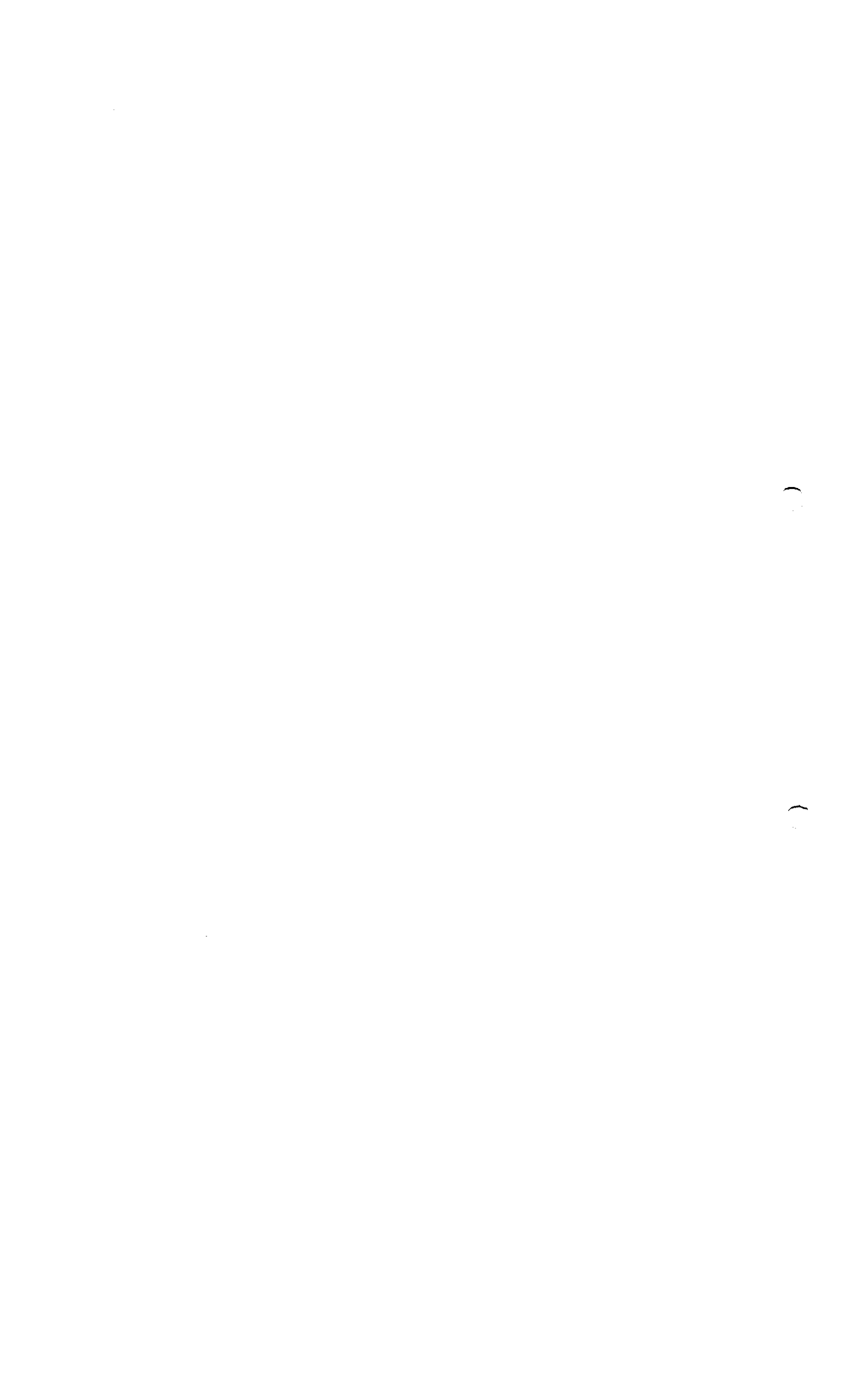
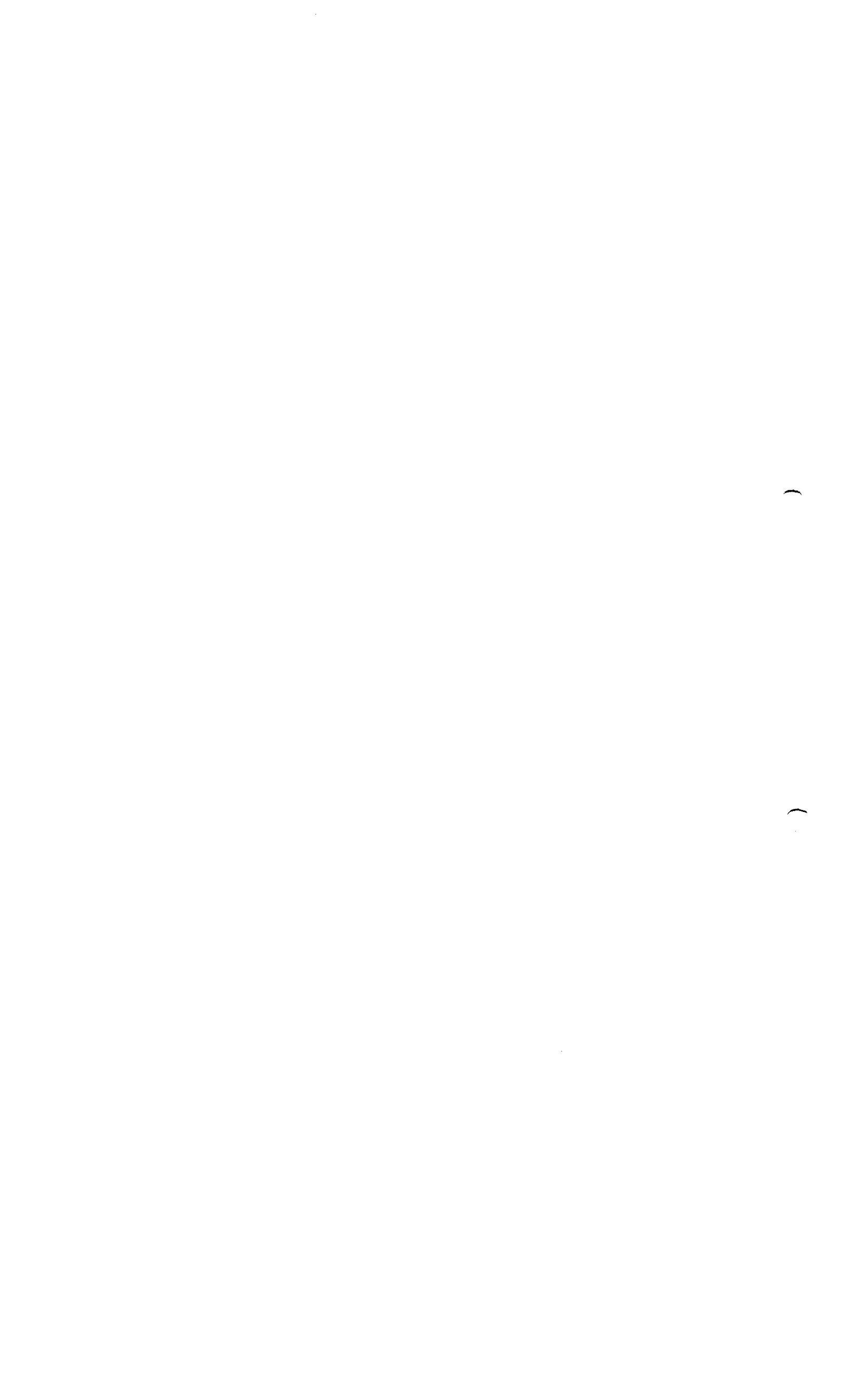




Tabla 3: Parámetros de producción registrados durante la validación de la cosecha, tratamiento y detoxificación de la toxina tetánica

Pasos de elaboración		Parámetros de producción	Rangos operativos
Etapa 9: detoxificación	Adición de formaldehído	Volumen de formaldehído	$V = (5,5 \times V500) \pm 10 \text{ mL}^*$
	Tratamiento de detoxificación, paso 1	Temperatura (°C)	16 - 20
		Duración del tratamiento de detoxificación	60 a 115 horas (2,5 a 4,8 días)
	Tratamiento de detoxificación, paso 2	Temperatura (°C)	34 - 36
		Duración del tratamiento de detoxificación	360 - 368 horas (15 a 15,3 días)

* 5,5 mL por litro de toxina tetánica a 500 Lf/mL.





3.3.2 Controles durante el proceso

Los resultados de los IPC se presentan en la tabla 4.

Todos los resultados cumplen con los criterios de aceptación definidos.

Las pruebas adicionales de toxicidad específica e irreversibilidad del toxoide realizadas en los cinco lotes permiten documentar que no se observa toxicidad ni reversibilidad a la toxina para el producto analizado.

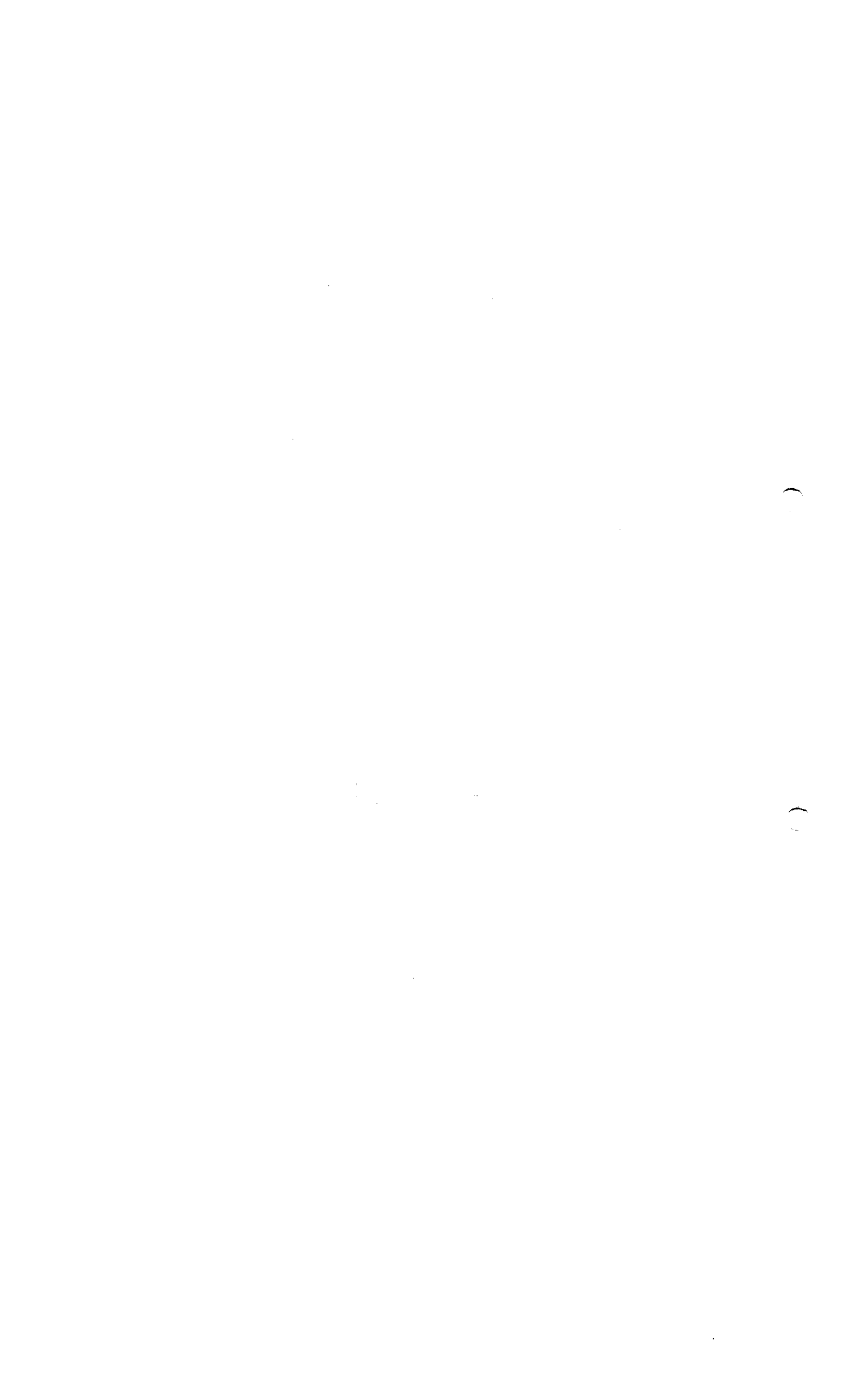


Tabla 4: Control durante el proceso realizado sobre el toxoide tetánico crudo para validar la cosecha, el tratamiento y la detoxificación

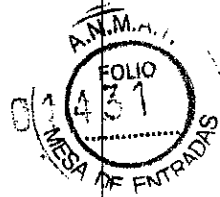
	IPC	Justificación	Criterios de aceptación	FA256253	FA258008	FA258899	FA261338	FA264426
Etapa 7: cosecha	Concentración - diafiltración							
	Título de floculación después de la diafiltración	Determinar la concentración para ajustar el título al principio del paso de detoxificación	Para información, para determinar la cantidad de agua purificada se debe utilizar para el ajuste a 500 Lf/mL	800	750	850	800	850
Etapa 9: detoxificación	pH*	/	6,0 - 8,5	7,1	7,1	7,2	7,3	7,2
	Contenido de nitrógeno proteínico (g/L)*	/	≤ 1,64	0,93	0,90	0,72	0,83	1,14
	Título de floculación (Lf/mL)	Verificar la cantidad de toxoide	400 - 600 Lf/mL	450	450	450	500	500
	Contenido de nitrógeno proteínico (g/L)	Verificar la cantidad de proteínas	0,3 - 1,3	0,61	0,54	0,55	0,66	0,78
	Contenido de formaldehído (µg/mL)	Seguir el proceso de detoxificación	≥ 290	1392	1174	1385	1383	1349
	pH	Seguir el proceso de detoxificación	6,8 - 8,3	7,7	7,9	7,8	7,8	7,9
	Toxicidad específica*	/	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Prueba de irreversibilidad*	/	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	

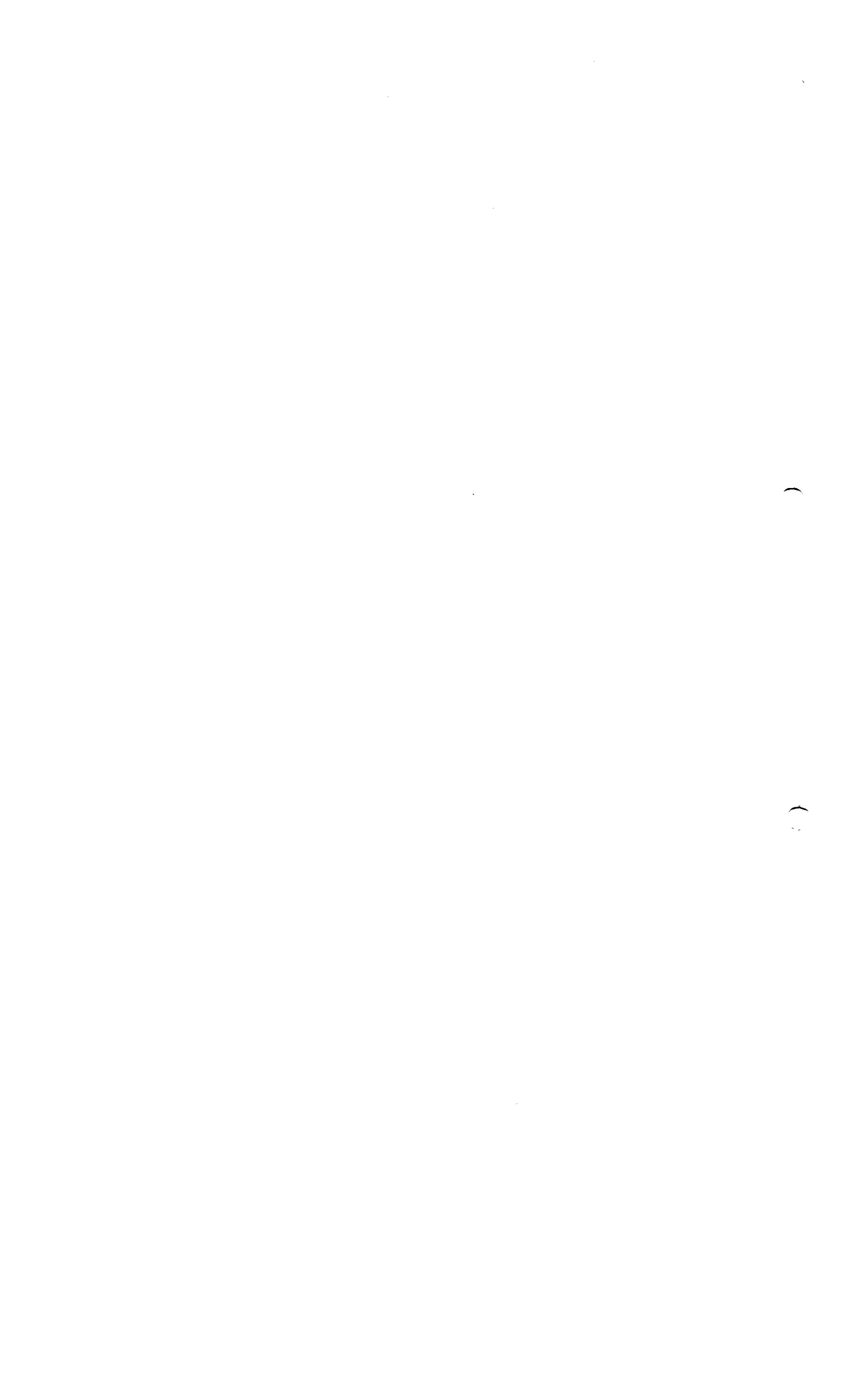
Estas pruebas adicionales (pruebas de caracterización e IPC adicionales) se llevaron a cabo solo para el programa de validación.

RA_0302116

JOXANA MUNTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A

CHRISTIAN DUMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A








3.3.3 Pasos críticos

Los datos registrados para los parámetros de producción que controlan el paso crítico de detoxificación (paso 9) se presentan en la tabla 5, a continuación.

Estos datos cumplen con los rangos operativos y confirman que este paso crítico está bajo control para el proceso.


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.



CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.



Tabla 5: Datos de los parámetros de producción registrados durante el paso crítico 9 = detoxificación

Pasos de elaboración		Parámetros de producción			Rangos operativos	FA256253	FA258008	FA258899	FA261338	FA264426			
Etapa 9: detoxificación	Adición de formaldehído	Volumen de formaldehído (solución al 37 %)			V = (5,5 x V500) ± 10 mL* Valor objetivo = 400 rpm	1,100	1,100	1,680	1,573	1,237			
		Velocidad de agitación durante la adición de formaldehído	Min.	400							400	400	400
			Promedio	400							401	401	401
Tratamiento de detoxificación, paso 1	Temperatura	Temperatura			16 – 20 °C	17,3	16,7	16,1	16,8	17,0			
		Duración del tratamiento de detoxificación	Min.	18,0							18,0	18,0	18,0
			Promedio	18,5							18,7	18,7	18,5
Tratamiento de detoxificación, paso 2	Temperatura	Duración del tratamiento de detoxificación			60 a 115 horas (2,5 a 4,8 días)	72,4	73,6	75,5	73,7	73,6			
		Temperatura	Min.	34,2							34,0	34,0	34,0
			Promedio	35,0							35,0	35,0	35,0
		Duración del tratamiento de detoxificación			360 – 368 horas (15 a 15,3 días)	361,0	363,0	361,0	362,3	361,1			

* 5,5 mL por litro de toxina tetánica a 500 Lf/mL.

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.

RA_0302116

Información confidencial/proprietaria
Página 17 de 23







3.4 Conclusión

Todos los valores registrados para los parámetros de producción durante las etapas de cosecha, tratamiento y detoxificación de la toxina tetánica, desde la toxina tetánica cruda hasta el toxoide tetánico crudo, cumplen con los rangos operativos definidos anteriormente.

El control durante el proceso y las pruebas adicionales cumplen con los criterios de aceptación y demuestran la calidad del proceso de elaboración del toxoide tetánico crudo.

En conclusión, el proceso de elaboración para la producción del toxoide tetánico crudo está validado hasta la etapa de detoxificación.

4 Validación del toxoide tetánico purificado (PTT)

4.1 Introducción

Para la validación de la purificación del toxoide tetánico crudo CTT (etapas 10 a 17), se produjeron 2 lotes de toxoide tetánico purificado PTT (FA269112 y FA276217) según el proceso de elaboración descrito en 3.2.S.2.2 Reacciones de purificación y modificación. El lote de PTT (FA269112) se obtuvo tras la agrupación de los siguientes lotes de CTT: FA256253, FA258008, FA258899, FA261338 y FA264426, presentados anteriormente en 3.2.S.2.4 Control de los pasos críticos e intermedios. Se añadió un segundo lote de PTT (FA276217) para completar la validación.

Los lotes de toxoide tetánico purificado (fin de la etapa 17) se analizaron de acuerdo con las especificaciones de liberación (consultar 3.2.S.4.1 Especificaciones).

4.2 Principio

En los siguientes capítulos se presentan, en primer lugar, los resultados obtenidos para los parámetros de producción, para las pruebas de control durante el proceso y para los controles de calidad registrados para el PTT.

4.3 Parámetros de producción

Los parámetros de producción registrados durante los pasos de purificación del toxoide tetánico crudo se presentan en la tabla 6.

Todos los resultados cumplen con los rangos operativos del PTT elaborado con CTT producido por el proceso.



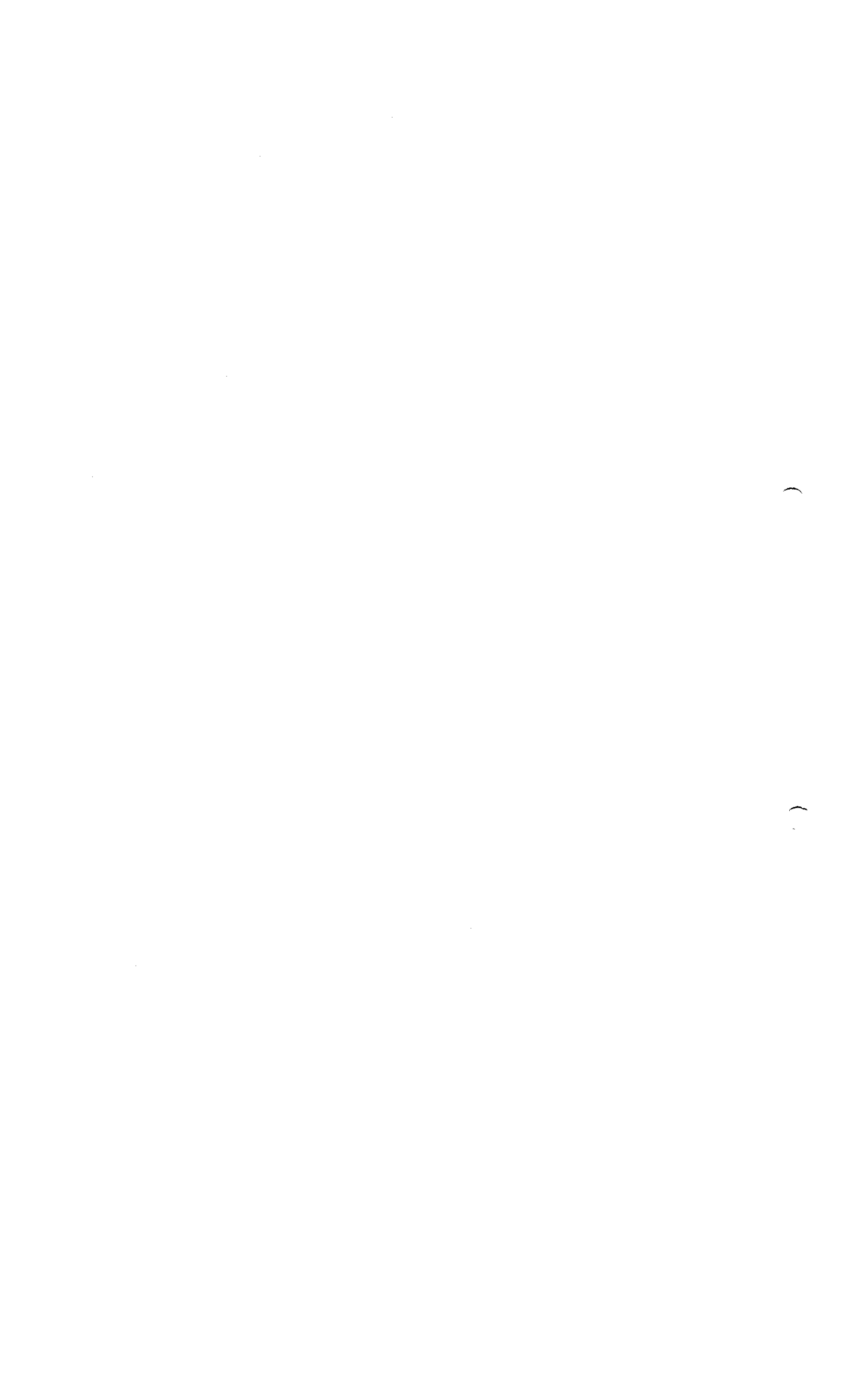


Tabla 6: Parámetros de producción registrados durante la validación de la purificación del toxoide tetánico crudo

Pasos de elaboración	Parámetros de producción	Rangos operativos
Etapa 14: primera precipitación	Cantidad de sulfato de amonio añadido	Valor objetivo: $Q = 55 * V1500 \text{ Lf/mL}^*$
Etapa 15: segunda precipitación	Cantidad de sulfato de amonio añadido	Valor objetivo: $Q = 130 * V1500 \text{ Lf/mL}^\dagger$
Etapa 16: diálisis	Duración	≥ 48 horas
	Temperatura	2 °C - 8 °C
Etapa 17c: ajustes de pH y volumen	pH	6,7 - 7,1

* 55 g por litro de toxoide a 1500 Lf/mL.

† 130 g por litro de toxoide a 1500 Lf/mL.





4.4 Controles durante el proceso

Los resultados de los IPC realizados durante la purificación de *Clostridium tetani* se presentan en la tabla 7. Todos los resultados cumplen con los criterios de aceptación definidos.

Tabla 7: Controles durante el proceso realizados durante la validación de la purificación del toxoide tetánico crudo

Pasos de elaboración	IPC	Justificación	Criterios de aceptación	FA269112	FA276217
Etapa 13: ajuste del volumen	Título de floculación	Determinar la pureza antigénica	1250 - 1750 Lf/mL	1425 Lf/ml	1425 Lf/mL
	Contenido de nitrógeno proteico	Determinar la pureza antigénica	≤ 4 g/L	2,22 g/L	2,03 g/L
	Contenido de formaldehído libre	Dar seguimiento a la eliminación de formaldehído	≤ 250 µg/mL	91,88 µg/mL	92,28 µg/mL
Etapa 14: primera precipitación con sulfato de amonio	Título de floculación	Controlar el proceso (pureza antigénica)	Sin criterio de aceptación	1120 Lf/ml	1100 Lf/ml
	Contenido de nitrógeno proteico	Controlar el proceso (pureza antigénica)	≤ 4 g/L	1,00 g/L	1,44 g/L
Etapa 16: diálisis	Prueba del cloruro de bario	Verificar la ausencia de sulfato de amonio después de la diálisis	No se detecta sulfato de amonio	Cumple	Cumple
	Título de floculación	Sin criterio de aceptación	Calcular el volumen teórico de toxoide en unos 5000 Lf/mL	12750 Lf/ml	9100 Lf/ml
Etapa 17d: filtración	Carga biológica	Controlar el nivel de contaminación biológica	≤ 50 UFC/mL	0 UFC/mL	0 UFC/mL





4.5 Pasos críticos

No se han identificado pasos críticos en la purificación del toxoide tetánico crudo.

4.6 Pruebas de control de calidad

Se analizaron las características del toxoide tetánico purificado de acuerdo con las especificaciones de liberación (consultar 3.2.S.4.1 Especificaciones) para evaluar la calidad del principio activo obtenido. Todos los resultados cumplen con los criterios de aceptación.

Se analizaron las características de dos lotes del toxoide tetánico purificado de acuerdo con las especificaciones de liberación (consultar la tabla 8).

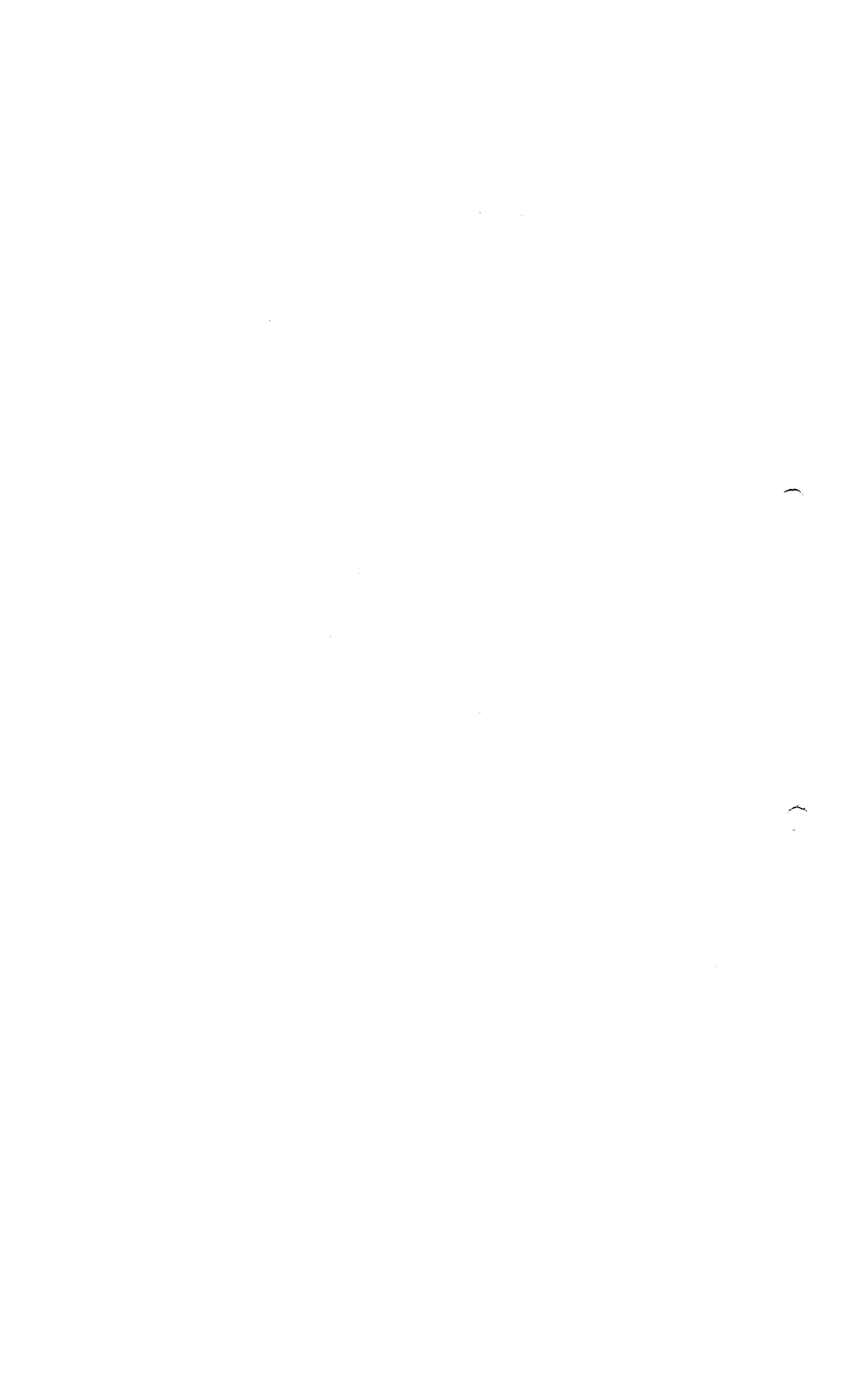


Tabla 8: Resultados de control de calidad para el toxoide tetánico purificado

Pruebas	Criterios de aceptación	FA269112	FA276217
Contenido de nitrógeno proteico	Para información (cálculo de la pureza antigénica)	4,11 mg/mL	4,91 mg/mL
Contenido de formaldehído libre	Para información	58,19 µg/mL	62,62 µg/mL
Título de floculación	Para información (cálculo de la pureza antigénica)	5000 Lf/ml	5000 Lf/ml
Pureza antigénica	≥ 1000 Lf/mg de nitrógeno proteico	1217	1018
Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica	Ausencia de crecimiento microbiano	Cumple	Cumple
Prueba de toxicidad específica*	Negativo	Negativo	Negativo
Irreversibilidad del toxoide tetánico*	Ausencia de síntomas tetánicos y un mínimo de 80 % de supervivencia	Cumple	Cumple

* Cuando se controlaron estos lotes, ambas pruebas estaban separadas. Actualmente, como se indica en 3.2.S.4.1 Especificaciones, se han reunido ambas pruebas. Consulte 3.2.S.4.5 Justificación de las especificaciones, para conocer la justificación.


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DUMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.

GRA_0302116







4.7 Conclusión

Todos los valores registrados para los parámetros de producción durante la etapa de purificación del toxoide tetánico crudo cumplen con los rangos operativos definidos anteriormente.

Los controles durante el proceso cumplen con los criterios de aceptación y demuestran la calidad del proceso de elaboración del PTT.

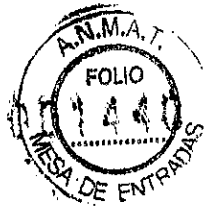
En conclusión, el proceso de elaboración propuesto para la etapa de purificación del toxoide tetánico crudo queda validado.

5 Conclusión

Los resultados presentados en esta sección demuestran que el proceso de elaboración está validado en todos los pasos: fermentación de *Clostridium tetani*, cosecha, tratamiento y detoxificación de la toxina tetánica para obtener toxoide tetánico crudo (CTT), y purificación del CTT para obtener toxoide tetánico purificado.


Los resultados de los estudios de validación presentados para las etapas de la toxina tetánica, CTT y PTT demuestran que el proceso permitió obtener de manera uniforme toxina tetánica, CTT y PTT.





3.2.S.2.5

Validación y/o Evaluación del Proceso - FHA PTxd


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

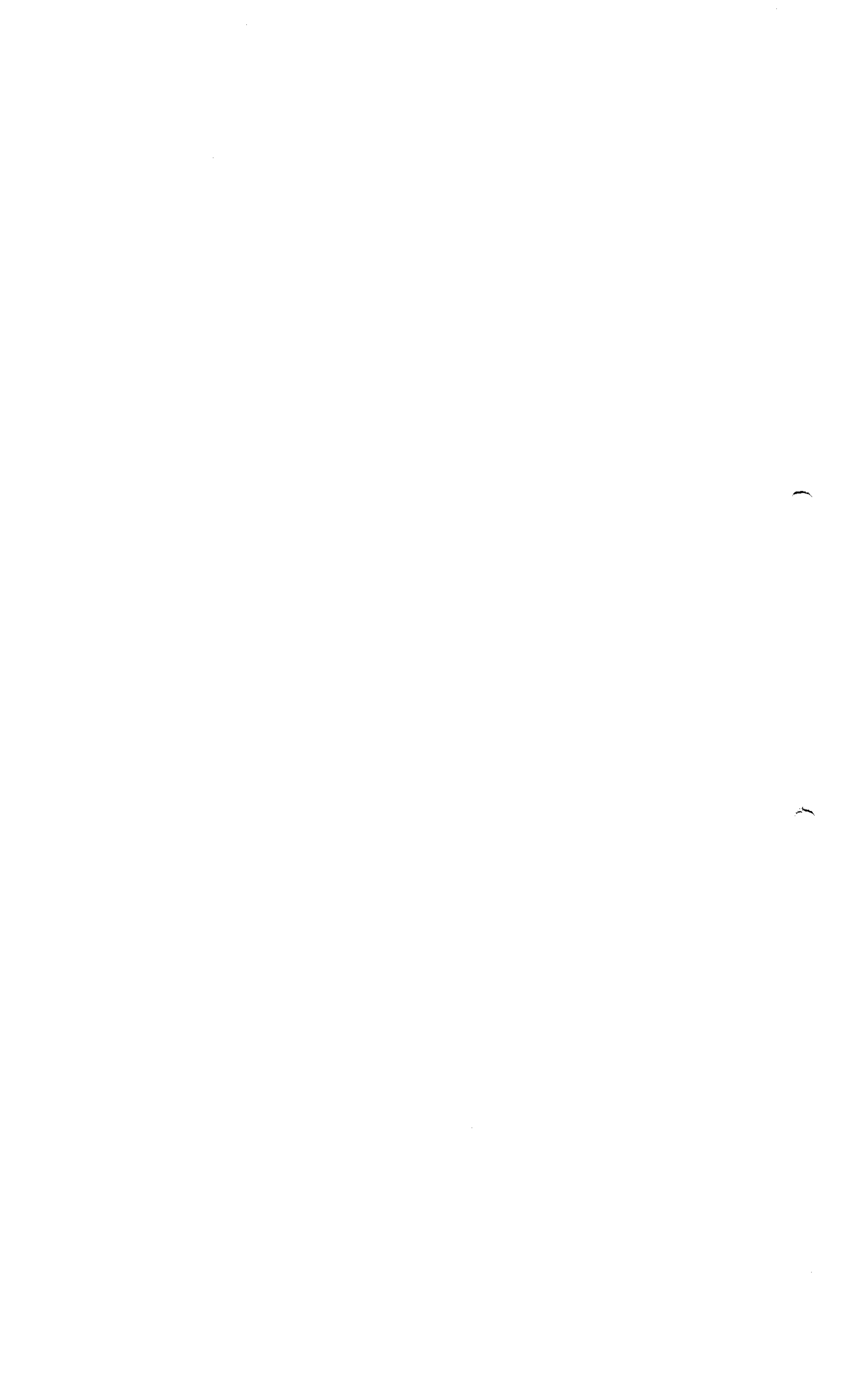

CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.

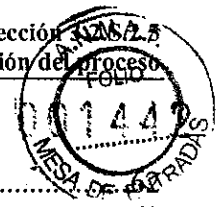


Sección 3.2.S.2.5 Validación y/o evaluación del proceso

Índice

Lista de tablas	3
Lista de figuras	5
1 Introducción.....	6
2 Validación del proceso de fermentación de la Bordetella pertussis.....	7
2.1 Introducción	7
2.2 Parámetros de producción.....	7
2.3 Controles del proceso y pruebas adicionales	9
2.4 Pruebas de control de calidad realizadas durante el primer paso de purificación	13
2.5 Discusión y conclusiones.....	13
3 Validación del proceso de purificación de la Bordetella pertussis.....	14
3.1 Introducción	14
3.2 Parámetros de producción.....	18
3.3 Controles durante el proceso y pruebas adicionales	23
3.3.1 Controles durante el proceso	23
3.3.2 Pruebas adicionales.....	27
3.3.3 Control de la contaminación microbiana.....	33
3.3.3.1 Resumen de los resultados	33
3.3.3.2 Acciones correctivas	37
3.3.3.3 Estudio de validación complementario	37
3.4 Pruebas de control de calidad	43
3.5 Pruebas de caracterización	53
3.5.1 Factores de virulencia.....	53
3.5.1.1 Adenilato ciclasa, pertactina y fimbrias	53
3.5.1.2 Citotoxina traqueal.....	59
3.5.1.3 Contenido de endotoxina lipopolisacárida.....	60
3.5.1.4 Toxina dermonecrótica.....	61





3.5.2 Impurezas relacionadas con el proceso 63

3.5.3 Pruebas adicionales (varios) 63

3.5.3.1 Adsorción de los antígenos en gel de hidróxido de aluminio: ELISA en sobrenadantes de adsorción 63

3.5.3.2 Cinética de la detoxificación del PTxd 65

3.5.4 Espectrometría de masa en la PT purificada nativa 65

3.5.5 Calorimetría de barrido diferencial 67

3.5.6 Desafío intranasal 69


3.6 Conclusión 71


4 Vida de las columnas 71

4.1 Vida de la columna de ASF-4B sefarosa 71

4.2 Vida de la columna de HXP 71

5 Conclusión general 72

 ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

 CHRISTIAN DOMINGUEZ
MODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.





Lista de tablas

Tabla 1: Descripción de los lotes de uniformidad del filtrado de cultivo concentrado	7
Tabla 2: Parámetros de producción registrados durante el proceso de fermentación de la Bordetella pertussis	8
Tabla 3: Resultados de los controles obtenidos durante el proceso de fermentación de la Bordetella pertussis	10
Tabla 4: PTxd purificado adsorbido: Números de lote de los intermedios	16
Tabla 5: FHA purificada adsorbida: Números de lote de los intermedios	17
Tabla 6: Parámetros de producción registrados durante el paso de purificación de la PT	19
Tabla 7: Parámetros de producción registrados durante el paso de purificación de la FHA.....	20
Tabla 8: Parámetros de producción registrados durante los pasos de detoxificación de la PT y adsorción del PTxd	21
Tabla 9: Parámetros de producción registrados durante el paso de adsorción de la FHA	22
Tabla 10: Resultados de los IPC obtenidos durante el paso de purificación de la PT: Lotes FA109849, FA109850 y FA109851	24
Tabla 11: Resultados de los IPC obtenidos durante el paso de purificación de la PT: Lotes FA109852, FA109853 y FA109854.....	25
Tabla 12: Resultados de los IPC obtenidos durante el paso de purificación de la FHA	26
Tabla 13: Resultados de las pruebas adicionales realizadas como parte de la validación durante el paso de purificación de la PT: Lotes FA109849, FA109850 y FA109851	28
Tabla 14: Resultados de las pruebas adicionales realizadas como parte de la validación durante el paso de purificación de la PT: Lotes FA109852, FA109853 y FA109854	30
Tabla 15: Resultados de las pruebas adicionales realizadas como parte de la validación durante el paso de purificación de la FHA	32
Tabla 16: Resultados de la carga biológica obtenidos durante la validación del proceso de purificación de la PT	34
Tabla 17: Resultados de la carga biológica obtenidos durante la validación del proceso de purificación de la FHA	36
Tabla 18: PTxd purificado adsorbido: Filiación de los lotes de validación complementarios.....	38
Tabla 19: FHA purificada adsorbida: Filiación de los lotes de validación complementarios.....	38
Tabla 20: PT purificada nativa: Resultados de la carga biológica (UFC/mL)	39
Tabla 21: PTxd purificado nativo en solución Resultados de la carga biológica (UFC/mL o UFC/10 mL)	40



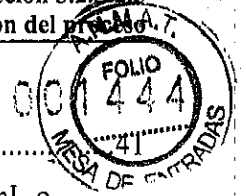


Tabla 22: FHA purificada nativa: Resultados de la carga biológica (UFC/mL).....42

Tabla 23: FHA purificada nativa en solución: Resultados de la carga biológica (UFC/mL o UFC/10 mL)42

Tabla 24: Resultados del contenido de endotoxinas de aprobación y pruebas de esterilidad para los 3 lotes de validación complementarios durante la purificación de la PT.....43

Tabla 25: Resultados del contenido de endotoxinas de aprobación y pruebas de esterilidad para los 3 lotes de validación complementarios durante la purificación de la FHA.....43

Tabla 26: Resultados del control de calidad de la PT purificada nativa45

Tabla 27: Resultados del control de calidad del PTxd purificado en solución46

Tabla 28: Resultados del control de calidad de la FHA purificada nativa47

Tabla 29: Resultados del control de calidad de la FHA purificada en solución.....47

Tabla 30: Resultados del control de calidad de la PTxd purificado adsorbido51

Tabla 31: Resultados del control de calidad de la FHA purificada adsorbida52

Tabla 32: Lotes probados para ACT, PRN, fimbrias y TCT.....54

Tabla 33: Resultados del ensayo de la actividad de ACT59

Tabla 34: Resultados del contenido de TCT60

Tabla 35: Resultados de LPS.....61

Tabla 36: Resultados de la prueba de actividad dermonecrótica residual.....62

Tabla 37: Porcentaje de PTxd no adsorbido en el gel de hidróxido de aluminio64

Tabla 38: Porcentaje de FHA no adsorbido en el gel de hidróxido de aluminio.....64

Tabla 39: Colonización pulmonar con Bordetella pertussis Bp18323, 12 días después de la inmunización70





Lista de figuras

Figura 1: Filiación de seis lotes de uniformidad15

Figura 2: SDS-PAGE para la toxina pertúsica purificada nativa48

Figura 3: SDS-PAGE para la FHA purificada nativa.....49

Figura 4: Resultados de la ACT, PRN y fimbrias para los lotes de PT purificada nativa.....55

Figura 5: Resultados de la ACT, PRN y fimbrias para los lotes de PT purificada nativa.....56

Figura 6: Resultados de la ACT, PRN y fimbrias para los lotes de FHA purificada nativa57


Figura 7: Resultados de la ACT, PRN y fimbrias para los lotes de FHA purificada nativa58


Figura 8: Espectros de masa de los lotes de PT purificada nativa.....66

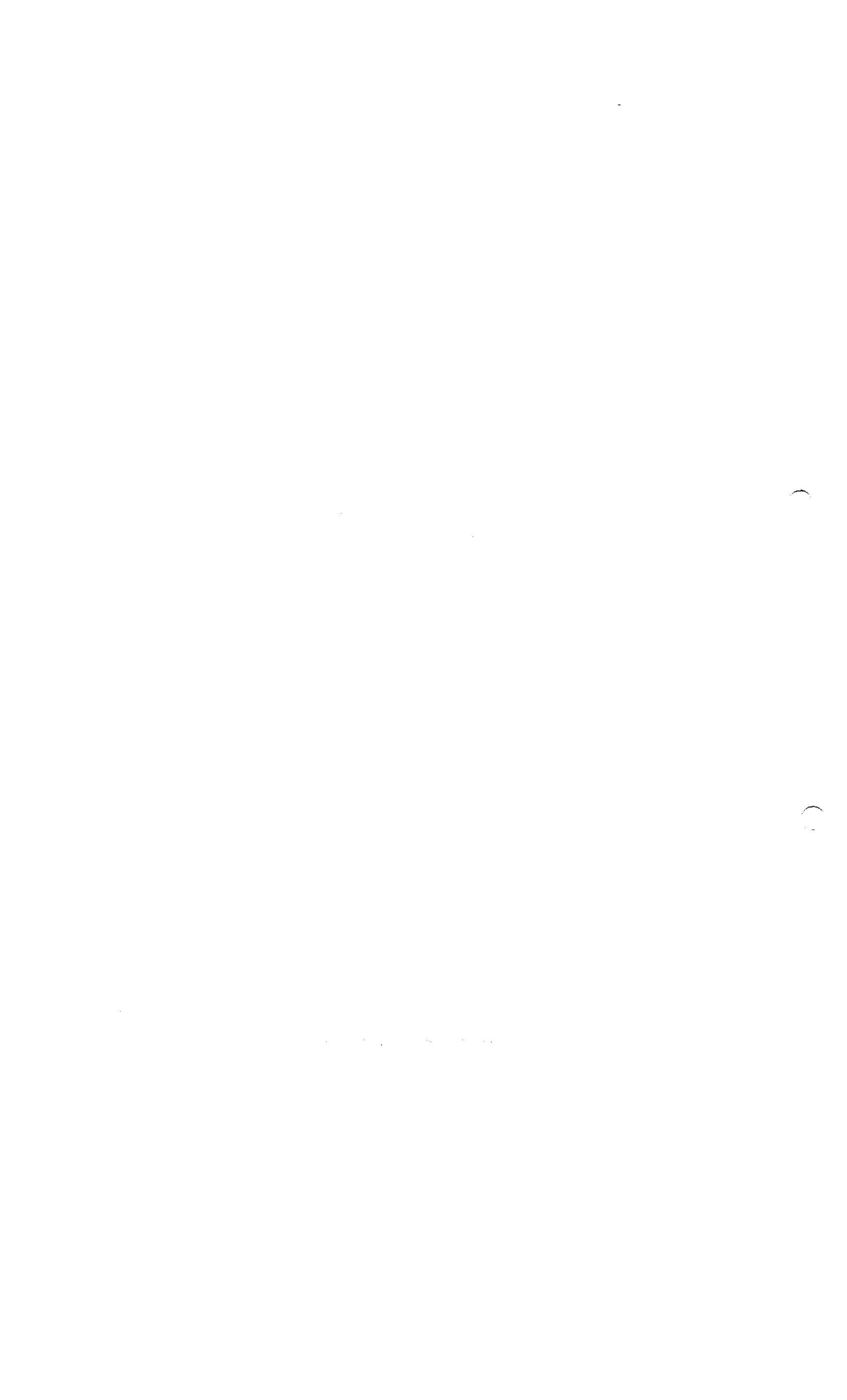
Figura 9: Grupo de picos alrededor de la subunidad S5.....67

Figura 10: Termograma de DSC de los lotes de PT purificada nativa.....68

Figura 11: Termograma de DSC de los lotes de FHA purificada nativa.....69


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DOMINGUEZ
PRODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.





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

1 Introducción

El proceso de elaboración de la vacuna contra la tos ferina, acelular, de dos componentes (toxoides pertúsicos [PTxd] purificado adsorbido y FHA purificada adsorbida) descrito en 3.2.S.2.2 Cultivo celular y cosecha y 3.2.S.2.2 Reacciones de purificación y modificación se subdivide en los siguientes pasos:

- Fermentación de la *Bordetella pertussis*, incluidos los cultivos previos y el cultivo industrial para producir el filtrado del cultivo concentrado.
- Separación de los dos antígenos pertúsicos por medio de cromatografía de adsorción y cromatografía de afinidad.
- Purificación de los dos antígenos pertúsicos de manera independiente, con el fin de obtener la toxina pertúsica (PT) purificada nativa y la FHA purificada nativa.
- Detoxificación de la PT purificada nativa para obtener el toxoide pertúsico (PTxd) purificado en solución.
- Adsorción del hidróxido de aluminio de cada proteína purificada para obtener el PTxd purificado adsorbido y la FHA purificada adsorbida.

El estudio de validación que se describe de aquí en adelante se realizó especialmente para demostrar lo siguiente:

- El control de los procesos de fermentación y purificación mediante el cumplimiento de los parámetros del proceso.
- La reproducibilidad de los procesos de fermentación y purificación mediante el cumplimiento de las pruebas de control de calidad, tales como las pruebas de liberación/controles durante el proceso (IPC) y las pruebas de caracterización adicionales.

Las siguientes secciones describen los resultados de validación obtenidos para cada paso del proceso de elaboración, incluida la discusión de los resultados y la conclusión.





2 Validación del proceso de fermentación de la *Bordetella pertussis*

2.1 Introducción

Esta sección cubre la validación del proceso de fermentación de la *Bordetella pertussis*, desde el primer cultivo previo hasta la concentración del sobrenadante del cultivo para obtener el filtrado de cultivo concentrado.

Se produjeron seis lotes consecutivos de filtrado de cultivo concentrado, de acuerdo con el proceso de elaboración que se describe en 3.2.S.2.2 Cultivo celular y cosecha.

Los números de lote del filtrado de cultivo concentrado se encuentran en la tabla 1.

Tabla 1: Descripción de los lotes de uniformidad del filtrado de cultivo concentrado

Número de lote	FA112315	FA113959	FA115581	FA117434	FA119089	FA121010
Datos de elaboración*	10 de mayo de 2002	24 de mayo de 2002	7 de junio de 2002	21 de junio de 2002	5 de julio de 2002	19 de julio de 2002
Tamaño del lote industrial (L)	8000	8000	8000	8000	8000	8000

* Corresponden a las fechas en que comienza el proceso de elaboración

2.2 Parámetros de producción

Se siguieron los parámetros de producción en cada etapa del proceso de fermentación desde el primer cultivo previo hasta el filtrado de cultivo concentrado.

Los resultados se presentan en la tabla 2.

Todos los parámetros de producción registrados durante el paso de fermentación cumplen con los rangos de operación predefinidos.

Tabla 2: Parámetros de producción registrados durante el proceso de fermentación de la *Bordetella pertussis*

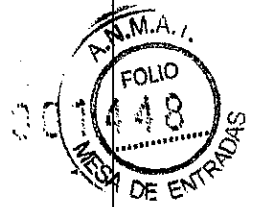
Paso de elaboración	Parámetros de producción	Rangos de operación	Números de lote del filtrado de cultivo concentrado					
			FA112315	FA113959	FA115581	FA117434	FA119089	FA121010
Primer cultivo previo (etapa 1)	Temperatura	+36 °C ± 1 °C	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Segundo cultivo previo (10 L) (etapa 2)	Volumen de inoculación	4 matraces	4 matraces	4 matraces	4 matraces	4 matraces	4 matraces	4 matraces
	Temperatura	+36 °C ± 1 °C	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Tercer cultivo previo (100 L) (etapa 3)	Temperatura	+36 °C ± 1 °C	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Cuarto cultivo previo (1000 L) (etapa 4)	Temperatura	+36 °C ± 1 °C	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Cultivo industrial (8000 L) (etapa 5)	Temperatura	+36 °C ± 1 °C	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.

RA_0301918

Información confidencial/proprietaria
Página 8 de 72





2.3 Controles durante el proceso y pruebas adicionales

Los controles durante proceso se realizaron en diferentes etapas del proceso de fermentación de la *Bordetella pertussis*, de acuerdo con las pruebas que se presentan en 3.2.S.2.2 Cultivo celular y cosecha. Los resultados se presentan en la tabla 3.

Todos los resultados cumplen con los criterios de aceptación definidos.

Las pruebas adicionales, como la concentración de PT y FHA por ELISA y ensayo proteico también se realizaron como parte del estudio de validación.

Los resultados obtenidos para estas pruebas adicionales se proporcionan en la tabla 3.

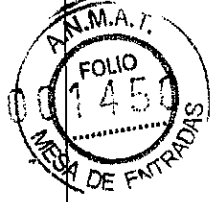
Todos los resultados de las pruebas adicionales realizadas en diferentes etapas del proceso de fermentación cumplen con los criterios de aceptación definidos.

Tabla 3: Resultados de los controles obtenidos durante el proceso de fermentación de la *Bordetella pertussis*

Paso de elaboración	Pruebas	IPC	Prueba adicional	Criterios de aceptación	Números de lote del filtrado de cultivo concentrado					
					FAI1231 5	FAI13959	FAI15581	FAI17434	FAI19089	FAI21010
Primer cultivo previo (etapa 1)	Control macroscópico	X		Ausencia de contaminación Homogeneidad de la capa celular	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Segundo cultivo previo (10 L) (etapa 2)	Pureza (tinción de Gram)	X		Bacilos Gram-negativos	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
	DO _{650nm}	X		0,4 a 1,2	0,86	0,83	0,79	0,80	0,63	0,63
	pH	X		7,2 a 7,8	7,48	7,40	7,45	7,63	7,60	7,51
Tercer cultivo previo (100 L) (etapa 3)	Pureza (tinción de Gram)	X		Bacilos Gram-negativos	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
	DO _{650nm}	X		0,4 a 1,2	0,98	0,74	0,85	0,81	0,63	0,66
	pH	X		7,2 a 7,8	7,50	7,34	7,50	7,38	7,39	7,45
Cuarto cultivo previo (1000 L) (Etapa 4)	Pureza (tinción de Gram)	X		Bacilos Gram-negativos	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
	DO _{650nm}	X		0,4 a 1,2	0,90	1,0	0,75	0,93	0,62	0,61
	pH	X		7,2 a 7,8	7,44	7,51	7,49	7,56	7,49	7,46

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.



sanofi pasteur

Vacuna contra la tos ferina, acelular, de dos componentes (FHA-PTxd)

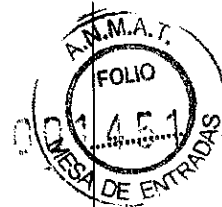
Sección 3.2.S.2.5
Validación y/o evaluación del proceso

Paso de elaboración	Pruebas	IPC	Prueba adicional	Criterios de aceptación	Números de lote del filtrado de cultivo concentrado					
					FAI1231 5	FAI13959	FAI15581	FAI17434	FAI19089	FAI21010
Cultivo industrial (8000 L) (Etapa 5)	Pureza (tinción de Gram)	X		Bacilos Gram-negativos	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
	DO _{650nm}	X		≥ 3,1	5,0	4,6	5,1	5,1	5,1	5,2
	Título de HA* en presencia de colesterol (UHA/mL)		X	≥ 80 UHA/mL †	1280	1280	640	640	320	640
	Título de HA en ausencia de colesterol (UHA/mL)		X	≥ 160 UHA/mL*	10240	1280	2560	2560	5120	20480
	Concentración de PT por medio de ELISA (UE/mL)		X	≥ 1,1 UE/mL*	2,04	1,94	1,90	1,90	2,51	2,13
	Concentración de FHA por medio de ELISA (UE/mL)		X	≥ 2,2 UE/mL*	5,77	6,04	3,87	3,87	6,25	5,52
	Concentración proteica (mg/mL)		X	0,02 a 0,11 mg/mL*	0,06	0,04	0,05	0,05	0,05	0,06
	Endotoxina (x10 ⁵ UI/mL)		X	≤ 15x10 ⁵ UI/mL*	8,5	2,2	14	14	0,98	15
	Carga biológica (UFC/mL)		X	< 900 UFC/mL	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
	Título HA en presencia de colesterol (UHA/mL)		X	≥ 640 UHA/mL	10240	10240	10240	10240	5120	10240
Cosecha (Etapa 6a a 6d)	Título HA en ausencia de colesterol (UHA/mL)		X	≥ 1280 UHA/mL	81920	10240	40960	40960	81920	163840
	Concentración de PT por medio de ELISA (UE/mL)		X	≥ 5,1 UE/mL	12,7	13,8	13,0	13,0	13,6	11,4
	Concentración de FHA por medio de ELISA (UE/mL)		X	≥ 23,1 UE/mL	39,6	41,7	36,3	36,3	39,1	33,4
	Concentración proteica (mg/mL)		X	0,4 a 0,7 mg/mL	0,4	0,6	0,6	0,6	0,7	0,5
	Endotoxina (UI/mL)		X	≤ 5x10 ⁶ UI/mL	3,3x10 ²	2,2x10 ⁵	1,9x10 ³	5,4x10 ²	1,6x10 ²	7,4x10 ³

HA: Prueba de hemaglutinación

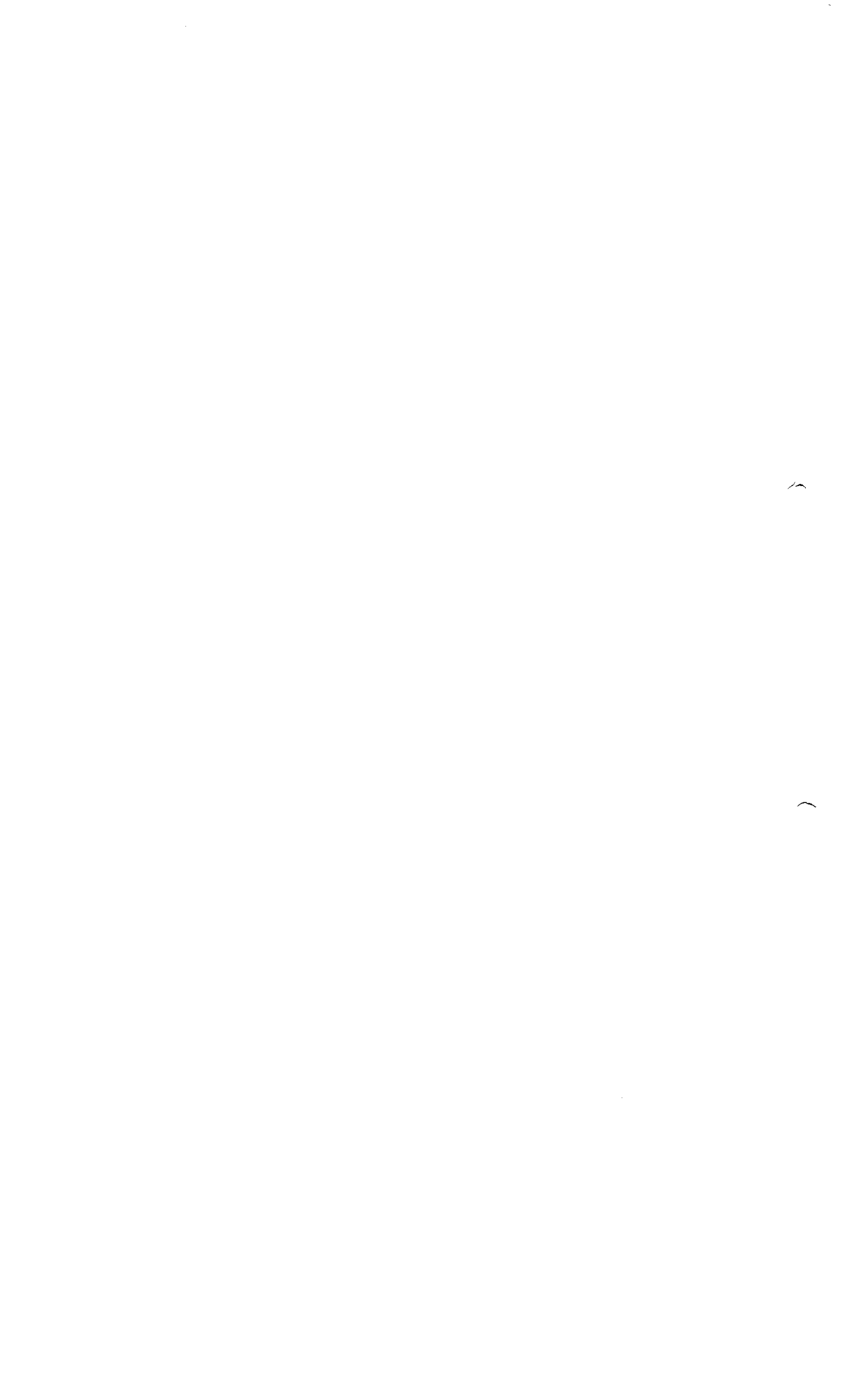
RA_0301918

Información confidencial/propietaria
Página 11 de 72



ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.



sanofi pasteur
Vacuna contra la tos ferina, acelular, de dos componentes (FHA-PTxd)

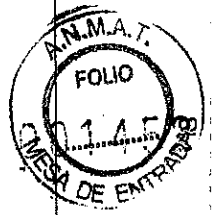
† Se determinaron los criterios de aceptación por medio del cálculo del intervalo de tolerancia a 95 %, en 22 lotes históricos

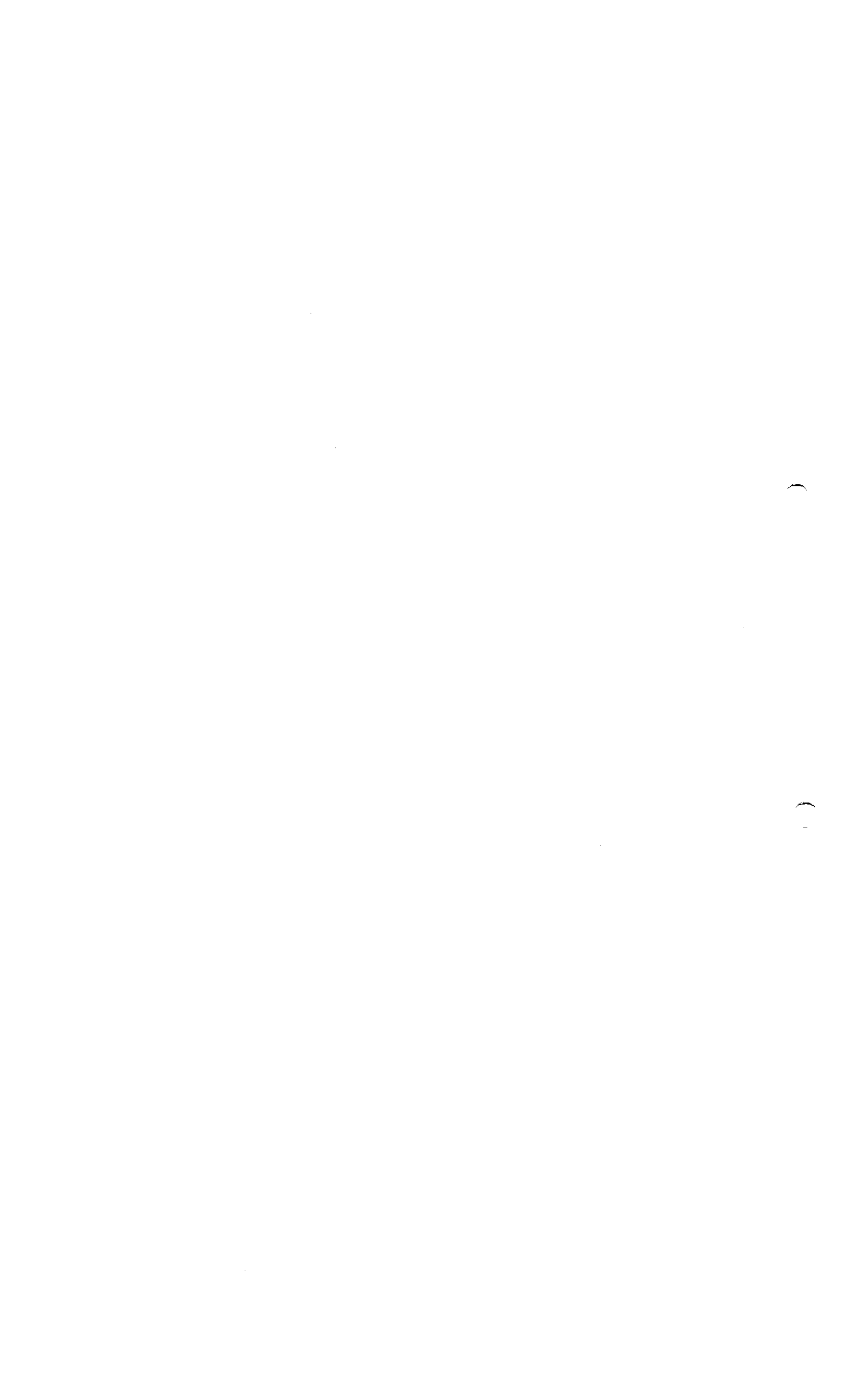

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.

RA_0301918

Información confidencial/proprietaria
Página 12 de 72







2.4 Pruebas de control de calidad realizadas durante el primer paso de purificación

Las pruebas de control de calidad se realizaron en la primera etapa de purificación para liberación (PT purificada nativa y FHA purificada nativa), de acuerdo con las especificaciones descritas en 3.2.S.2.4 Controles de los pasos críticos e intermedios (vea los resultados en la tabla 26 y Tabla 28 de esta sección).

Todos los resultados obtenidos con los seis lotes de uniformidad cumplen con los criterios de aceptación. El proceso de fermentación permite, de este modo, la generación de antígenos purificados con la calidad requerida.

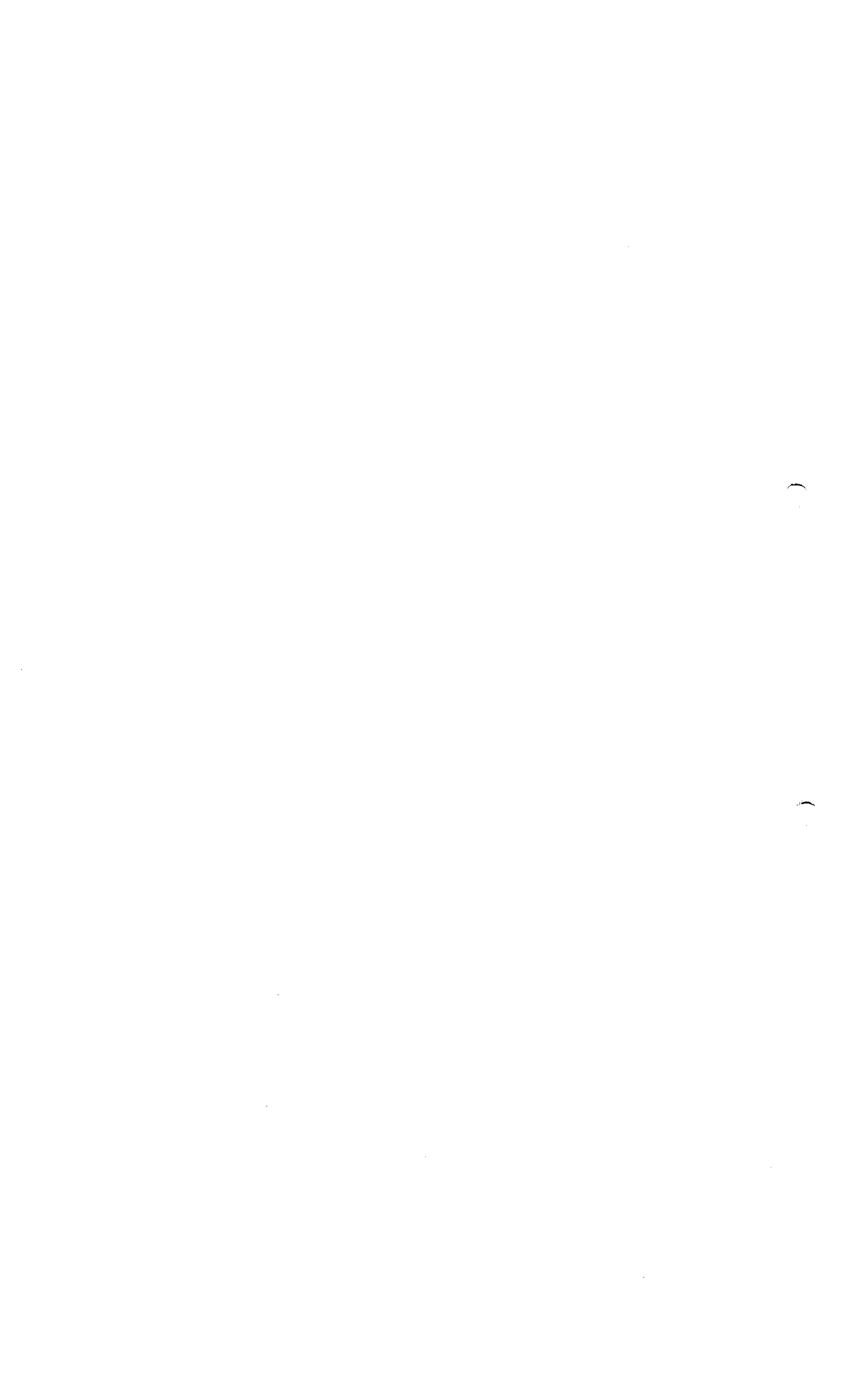
2.5 Discusión y conclusiones

Todos los datos registrados para los parámetros de producción durante el estudio de validación del proceso de fermentación de la *Bordetella pertussis* cumplen con los rangos de operación (vea la tabla 2).

Todos los resultados de los controles durante el proceso y de las pruebas adicionales realizadas como parte de la validación también cumplen con los criterios de aceptación definidos para los seis lotes de uniformidad (vea tabla 3).

Todos los resultados de las pruebas realizadas en la primera etapa de liberación de los pasos de purificación también cumplen con los criterios de aceptación (vea la tabla 26 y tabla 28).

En conclusión, el proceso de fermentación de la *Bordetella pertussis* se encuentra validado y controlado, desde el primer cultivo previo hasta el filtrado de cultivo concentrado.





3 Validación del proceso de purificación de la *Bordetella pertussis*

3.1 Introducción

Esta sección cubre la validación de lo siguiente:

- las dos etapas de purificación de los antígenos de pertussis, con el fin de obtener la PT purificada nativa y la FHA purificada nativa.
- la etapa de detoxificación de la PT purificada nativa, con el fin de obtener el toxoide pertúsico purificado en solución.
- la adsorción de los antígenos en hidróxido de aluminio para obtener el PTxd purificado adsorbido y la FHA purificada adsorbida.

Se produjeron seis lotes industriales consecutivos de PTxd purificado adsorbido y de FHA purificada adsorbida, de acuerdo con el proceso de elaboración descrito en 3.2.S.2.2 Reacciones de purificación y modificación.

Los números de los lotes de uniformidad de PTxd purificado adsorbido y de FHA purificada adsorbida se presentan en la tabla 4 y tabla 5, respectivamente.

Nota: En las primeras etapas de purificación, los antígenos nativos purificados se obtienen en forma de precipitado de sulfato de amonio de un lote de filtrado de cultivo concentrado. En las etapas subsiguientes de purificación, como se describe en 3.2.S.2.2 Definición de lotes y escala, los antígenos adsorbidos purificados se obtienen de una cantidad definida de proteínas, de uno o varios lotes de antígenos nativos disueltos para obtener los antígenos en solución. De manera similar, un lote de antígenos nativos puede producir varios lotes diferentes de antígenos en solución.

La filiación de los lotes de uniformidad de PTxd purificado adsorbido y de FHA purificada adsorbida se encuentra en la figura 1.

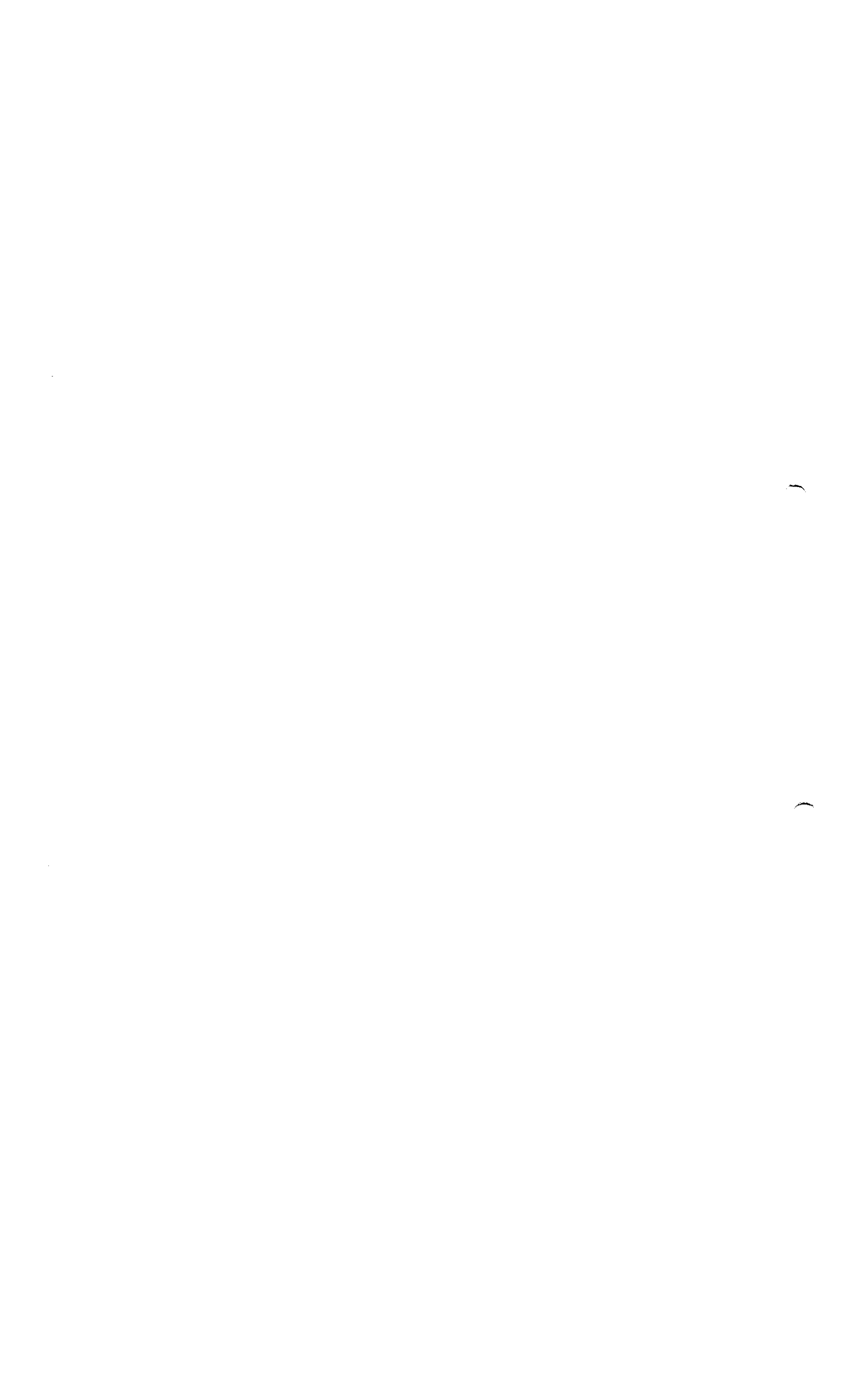
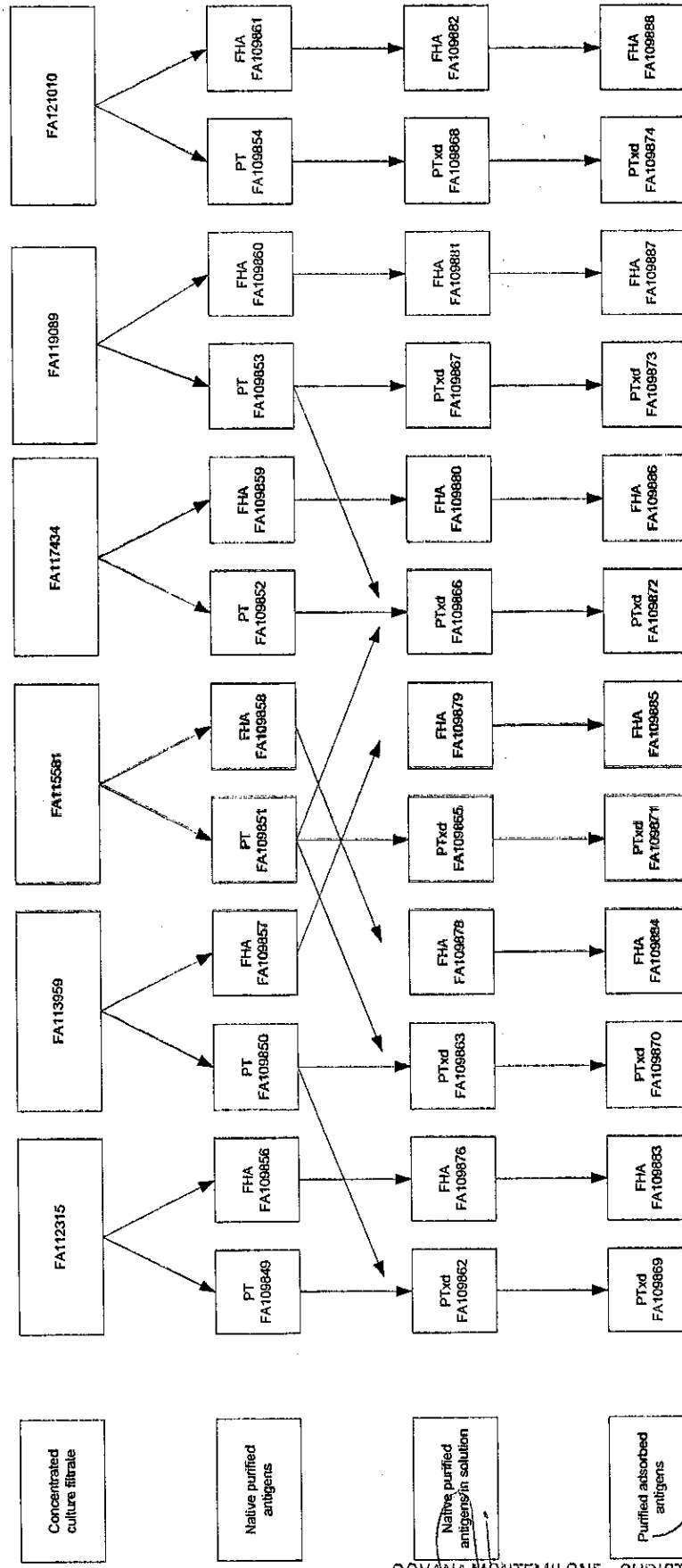


Figura 1: Filiación de seis lotes de uniformidad



ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.

RA_0301918



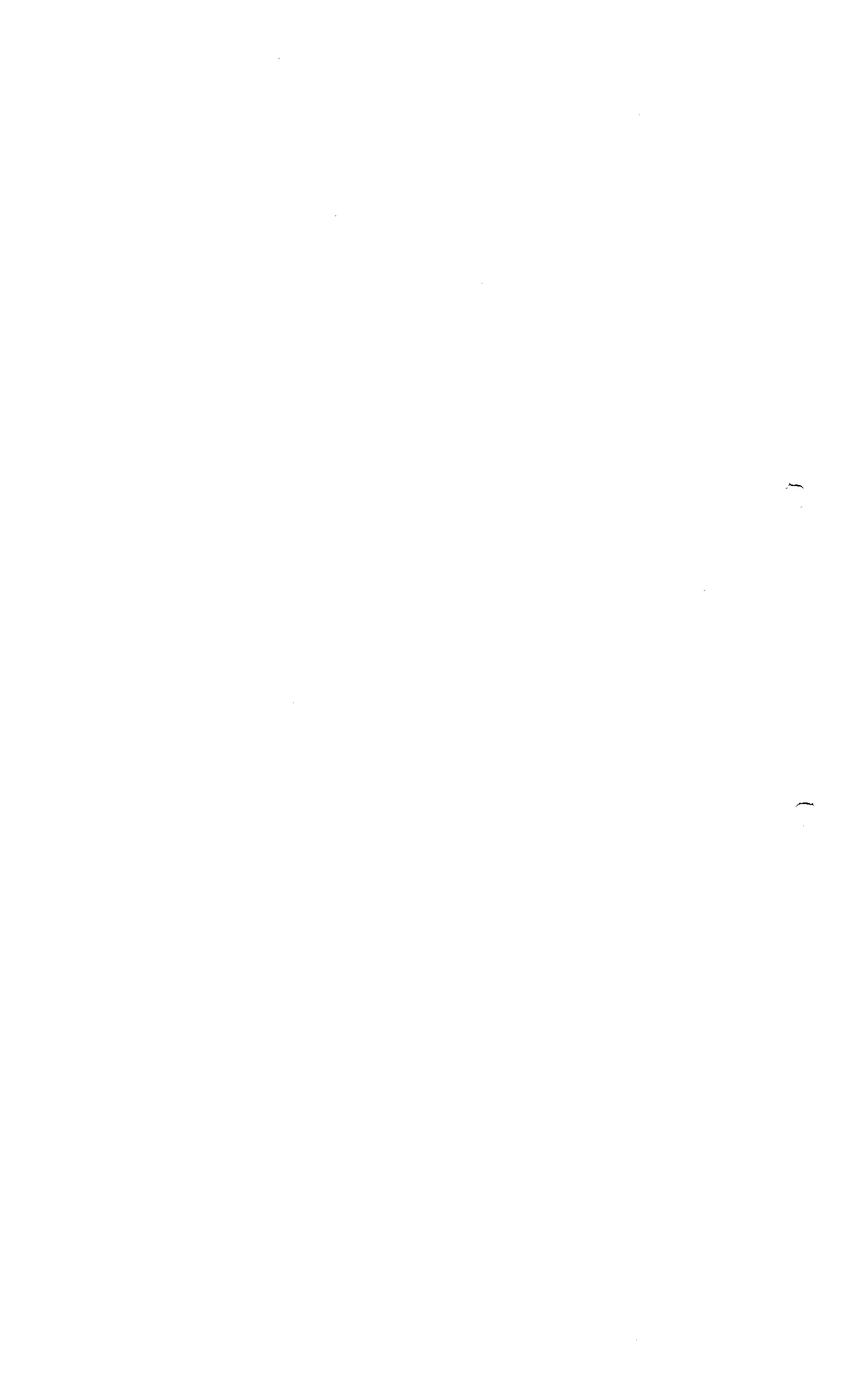


Tabla 4: PTxd purificado adsorbido: Números de lote de los intermedios

Filtrado de cultivo concentrado	FAI12315	FAI13959	FAI15581	FAI17434	FAI19089	FAI21010
Fecha de elaboración*	10 de mayo de 2002	24 de mayo de 2002	7 de junio de 2002	21 de junio de 2002	5 de julio de 2002	19 de julio de 2002
Tamaño del lote (L)	8000	8000	8000	8000	8000	8000
PT purificada nativa	FAI09849 y FAI09850	FAI09850 y FAI09851	FAI09851	FAI09851 FAI09852 FAI09853	FAI09853	FAI09854
Fecha de elaboración*	17 de mayo de 2002 y 31 de mayo de 2002	31 de mayo de 2002 y 14 de junio de 2002	14 de junio de 2002	14 de junio de 2002 28 de junio de 2002 31 de julio de 2002	13 de julio de 2002	26 de julio de 2002
PTxd correspondiente en solución	FAI09862	FAI09863	FAI09865	FAI09866	FAI09867	FAI09868
Tamaño del lote (masa de la proteína solubilizada)	40 g	40 g	20 g	44,93 g	32,67 g	40 g
PTxd purificado adsorbido	FAI09869	FAI09870	FAI09871	FAI09872	FAI09873	FAI09874
Fecha de elaboración*	8 de julio de 2002	22 de julio de 2002	26 de agosto de 2002	23 de septiembre de 2002	30 de septiembre de 2002	21 de octubre de 2002
Tamaño del lote (número de dosis)	962 282	377 936	424 684	948 547	907 150	1 074 256

* Corresponden a las fechas en que comienza la elaboración.

DOXANA MONTIELONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINQUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.



