



Las características de los antígenos adsorbidos (PTxd purificado adsorbido y FHA purificada adsorbida) se analizaron de acuerdo con las especificaciones de liberación descritas en la Especificación, con el fin de evaluar la calidad del principio activo obtenido.

Los resultados se presentan en la tabla 30 y tabla 31. Los 6 lotes de uniformidad cumplen con los criterios de aceptación para liberación.

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
ENCARGADO
SANOFI PASTEUR S.A.

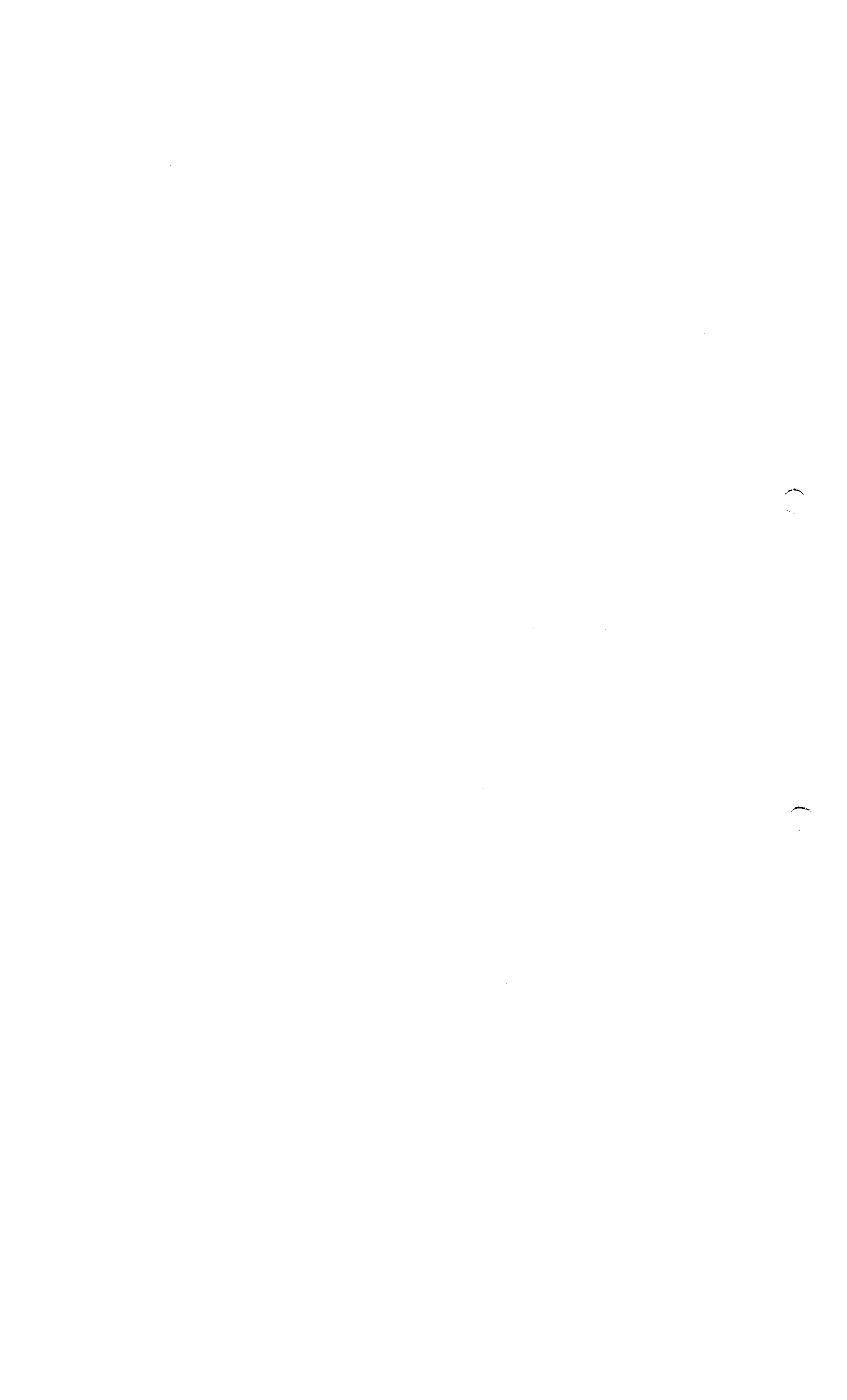

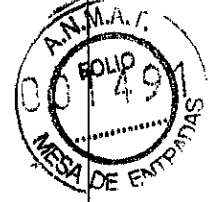


Tabla 30: Resultados del control de calidad del PTxd purificado adsorbido

Pruebas	Criterios de aceptación	N.º de lote FA109869	N.º de lote FA109870	N.º de lote FA109871	N.º de lote FA109872	N.º de lote FA109873	N.º de lote FA109874
Contenido de aluminio	0,6 a 1,4 mg Al/mg de proteínas	1,05	1,05	1,1	0,94	1,08	1,02
Medición de pH	6,2 a 8,2	6,66	6,96	6,69	6,97	6,76	6,83
Identificación del PTxd	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica	Sin crecimiento microbiano	Sin crecimiento microbiano	Sin crecimiento microbiano	Sin crecimiento microbiano	Sin crecimiento microbiano	Sin crecimiento microbiano	Sin crecimiento microbiano


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DOMINGUEZ
ENCARGADO
SANOFI PASTEUR S.A.



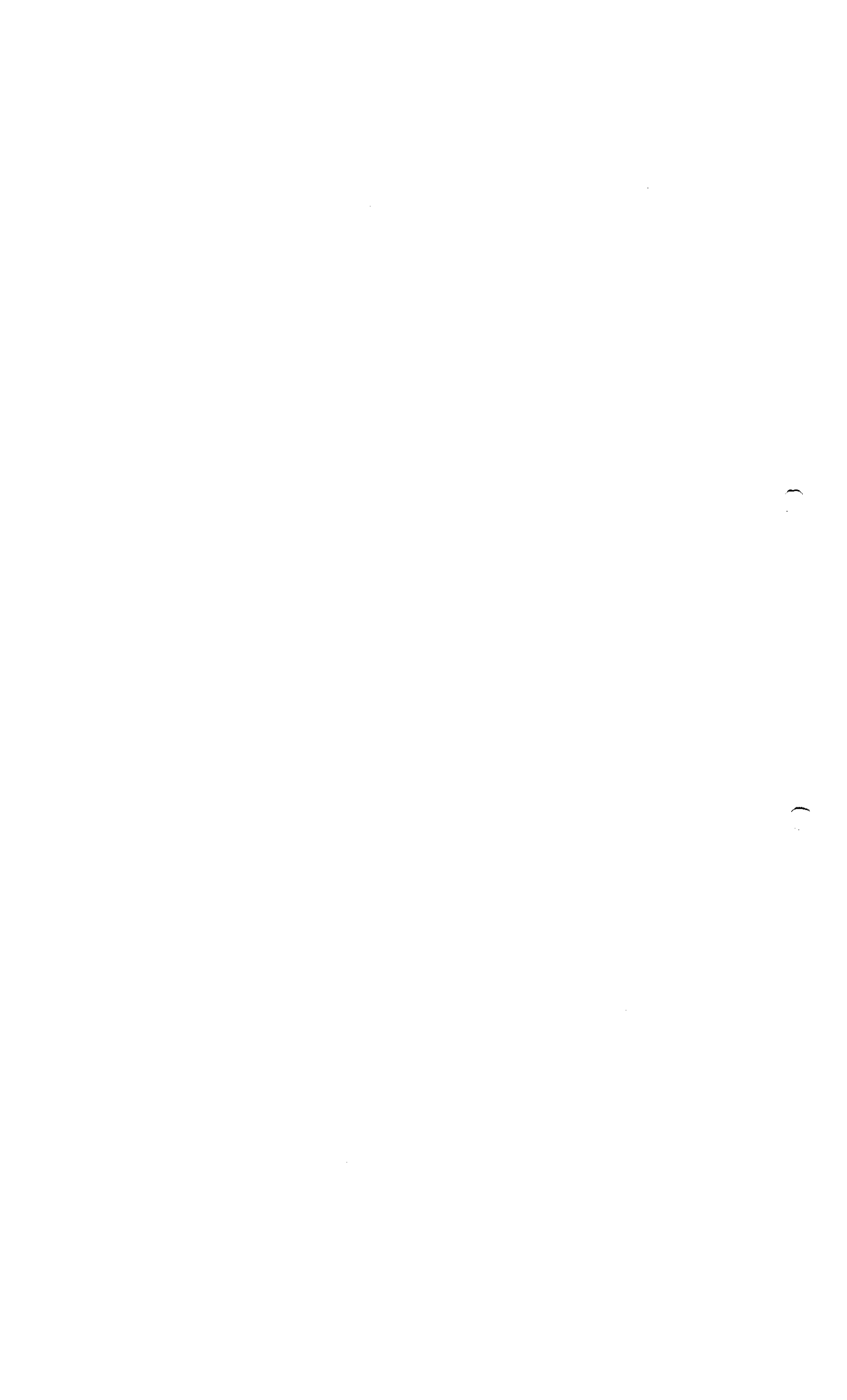
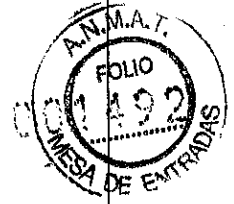


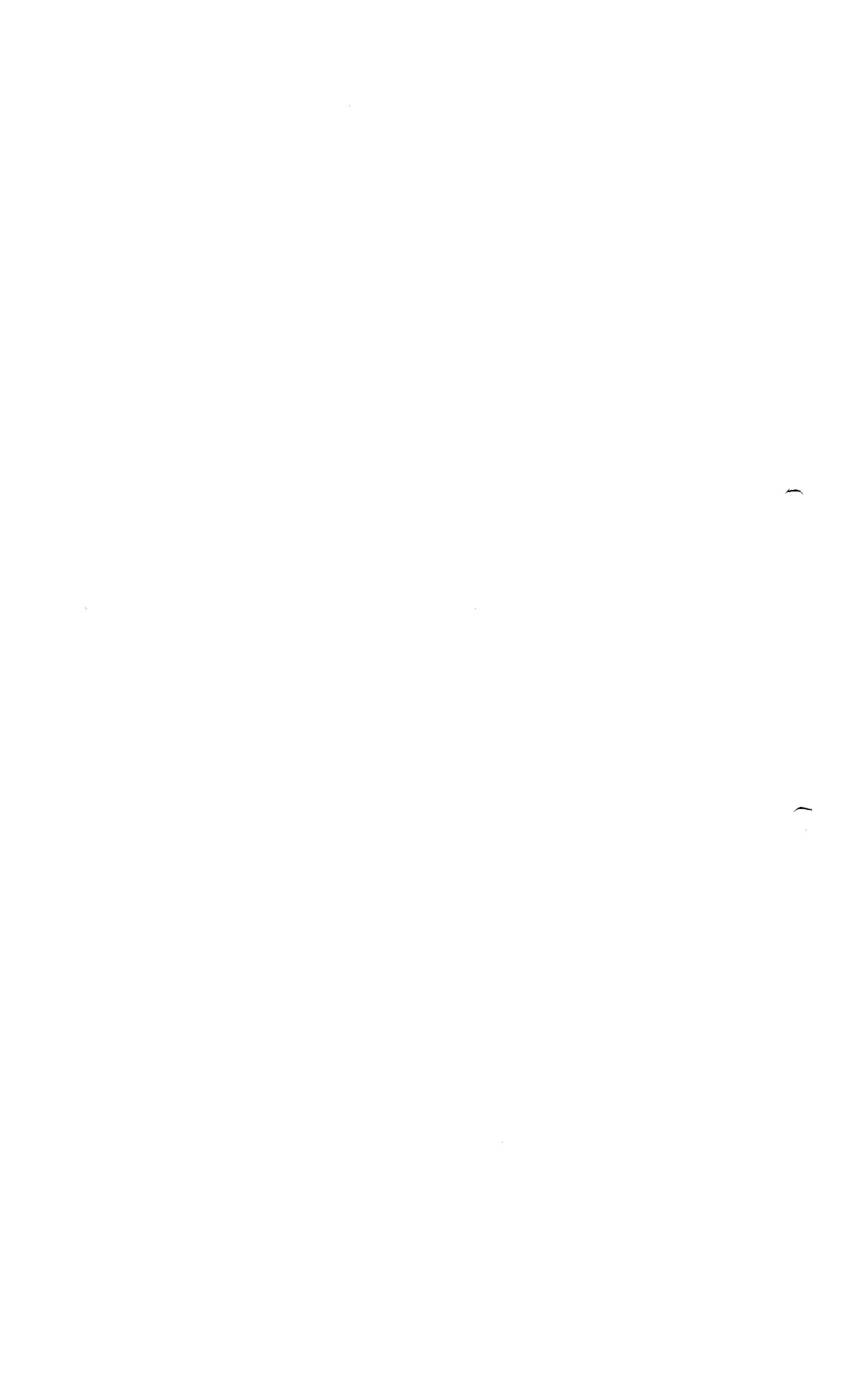
Tabla 31: Resultados del control de calidad de la FHA purificada adsorbida

Pruebas	Criterios de aceptación	N.º de lote FA109883	N.º de lote FA109884	N.º de lote FA109885	N.º de lote FA109886	N.º de lote FA109887	N.º de lote FA109888
Contenido de aluminio	0,6 a 1,4 mg Al/mg de proteínas	1,02	1,1	0,89	1,11	1,16	1,14
Medición de pH	6,2 a 8,2	6,27	6,51	6,84	6,43	6,78	7,24
Identificación de la FHA	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Actividad dermonecrótica residual	No se observó reacción necrótica (++++) o reacción hemorrágica marcada (+++) en ninguno de los ratones lactantes 72 h después de la inyección	3-	3-	3-	3-	3-	3-
Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica	Sin crecimiento microbiano	Sin crecimiento microbiano	Sin crecimiento microbiano	Sin crecimiento microbiano	Sin crecimiento microbiano	Sin crecimiento microbiano	Sin crecimiento microbiano

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.







3.5 Pruebas de caracterización

3.5.1 Factores de virulencia

Se sabe que la *Bordetella pertussis* produce una cantidad de determinantes de virulencia entre los cuales se encuentran la toxina adenilato ciclasa (ACT), la pertactina (proteína PRN de 69 kD), las fimbrias, la citotoxina traqueal (TCT), la endotoxina de lipopolisacáridos (LPS) y la toxina dermonecrótica (DNT), tal como se describe en el artículo de Wardlaw y Parton (Pharm. Ther. 19:1-53, 1983).

Para validar el proceso de purificación, se ha realizado un seguimiento de los contenidos de estas posibles proteínas contaminantes, con el fin de confirmar la eficacia de la purificación.

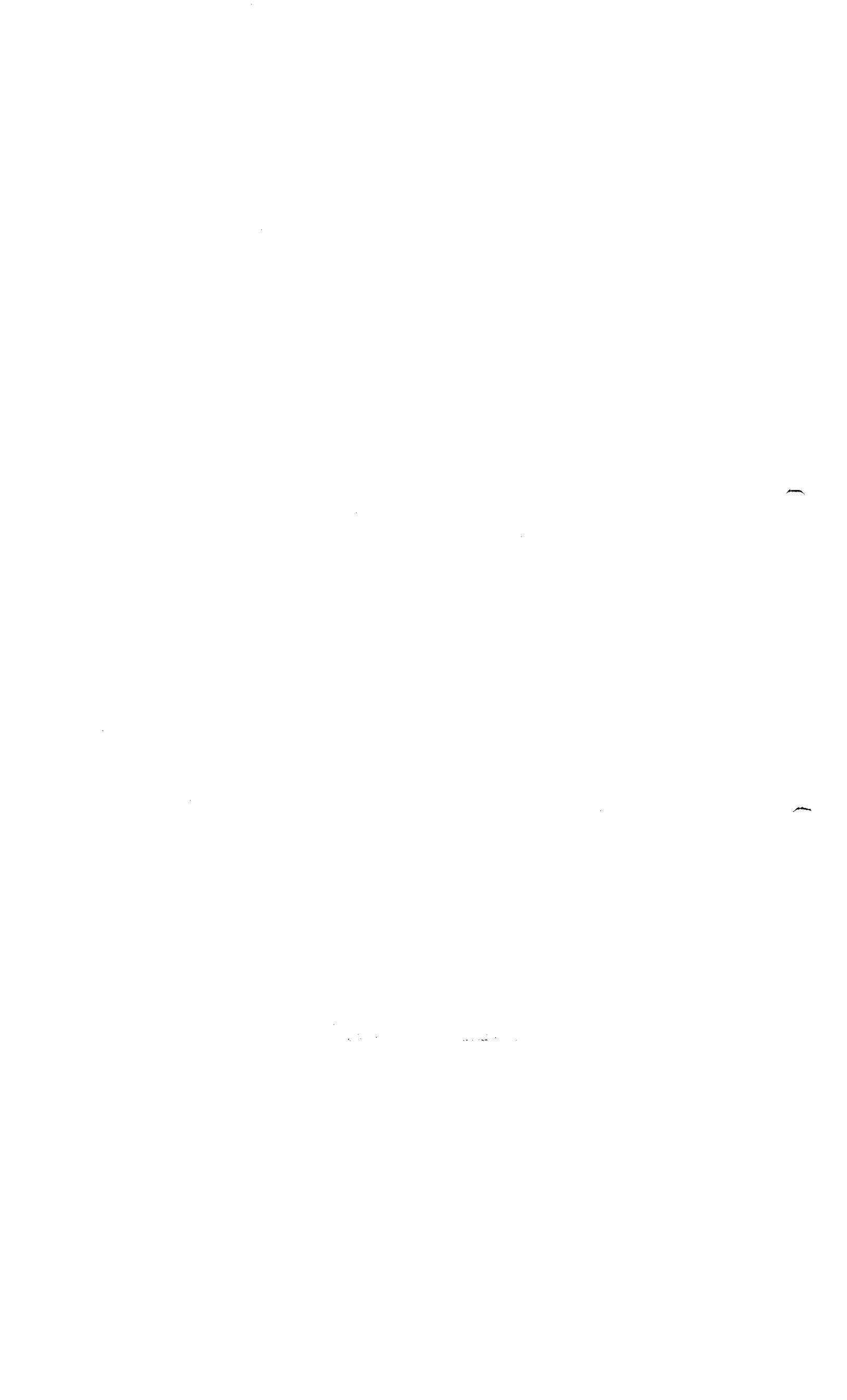
Los ensayos para ACT, PRN y fimbrias no se realizan de manera rutinaria, ya que la Farmacopea Europea considera estos ensayos sofisticados como pruebas de caracterización.

Los LPS se determinan de manera rutinaria en el PTxd purificado en solución y en la FHA purificada en solución, según se describe en 3.2.S.2.4 Controles de los pasos críticos e intermedios.

La prueba para DNT se realiza de manera rutinaria en la etapa de FHA purificada adsorbida, según se describe en 3.2.S.4.1 Especificación. Esta prueba no se realiza de manera rutinaria en la etapa de antígenos nativos, sólo se realiza en la validación del proceso de elaboración en caso de un cambio en el proceso principal, según lo exige la Farmacopea Europea (Ph. Eur.) y la OMS.

3.5.1.1 Adenilato ciclasa, pertactina y fimbrias

Las pruebas para el adenilato ciclasa, la pertactina y las fimbrias se realizan en los 6 lotes de uniformidad de PT purificada nativa y de FHA purificada nativa, y en 3 lotes históricos de PT purificada nativa y de FHA purificada nativa. Los lotes probados se presentan en la tabla 32.



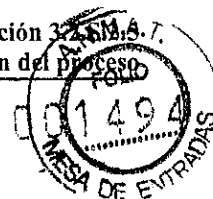


Tabla 32: Lotes probados para ACT, PRN, fimbrias y TCT

Producto	Lotes históricos	Lotes de uniformidad
PT purificada nativa	FA088663	FA109849
		FA109850
	FA088664	FA109851
		FA109852
	FA088665	FA109853
		FA109854
FHA purificada nativa	FA072951	FA109856
		FA109857
	FA071443	FA109858
		FA109859
	FA071444	FA109860
		FA109861

El análisis se realizó en un laboratorio de referencia en el Institut Pasteur (Dr GUIISO – Institut Pasteur, Laboratoires des Bordetella – 28, rue du Dr Roux – 75724 París – Francia).

Detección de AC-Hly, PRN y fimbrias

Los resultados se muestran en la figura 4 y figura 5 para la PT purificada nativa y en la figura 6 y figura 7 para la FHA purificada nativa.

No se detectó pertactina en ninguno de los lotes analizados.

Los anticuerpos monoclonales y policlonales no detectaron AC-Hly ni fragmentos de AC-Hly en ninguno de los lotes analizados.

La sensibilidad del método era demasiado baja como para determinar si existía contaminación con fimbrias (Fim 2 y Fim 3).

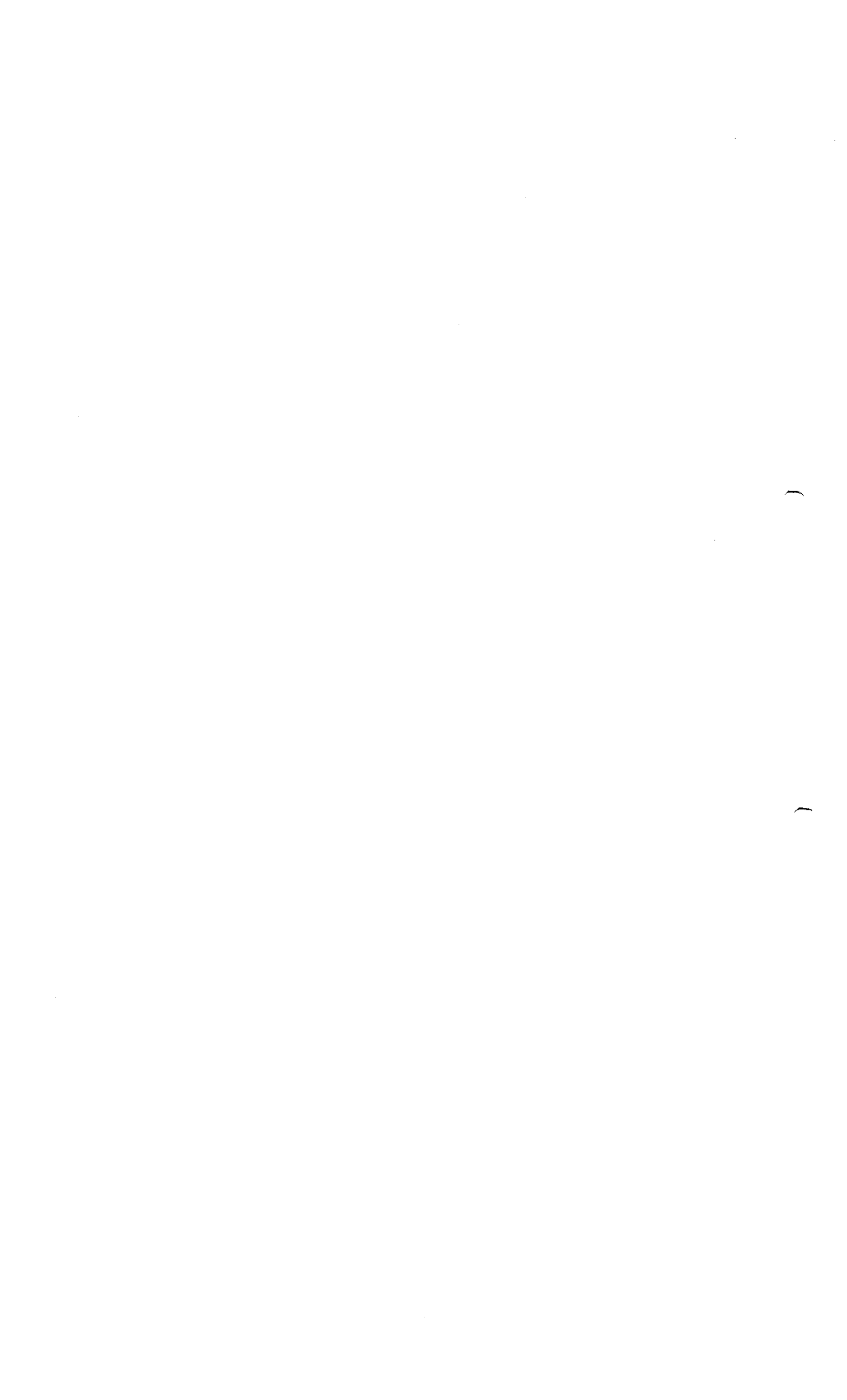




Figura 4: Resultados de ACT, PRN y fimbrias para los lotes de PT purificada nativa

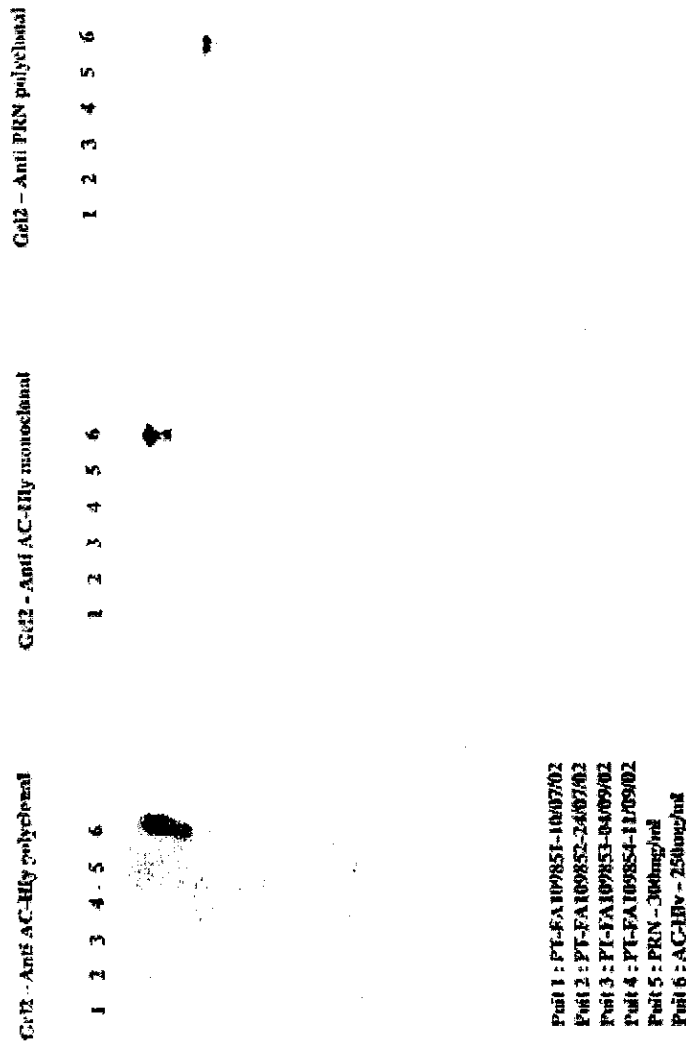






Figura 5: Resultados de ACT, PRN y fimbrias para los lotes de PT purificada nativa

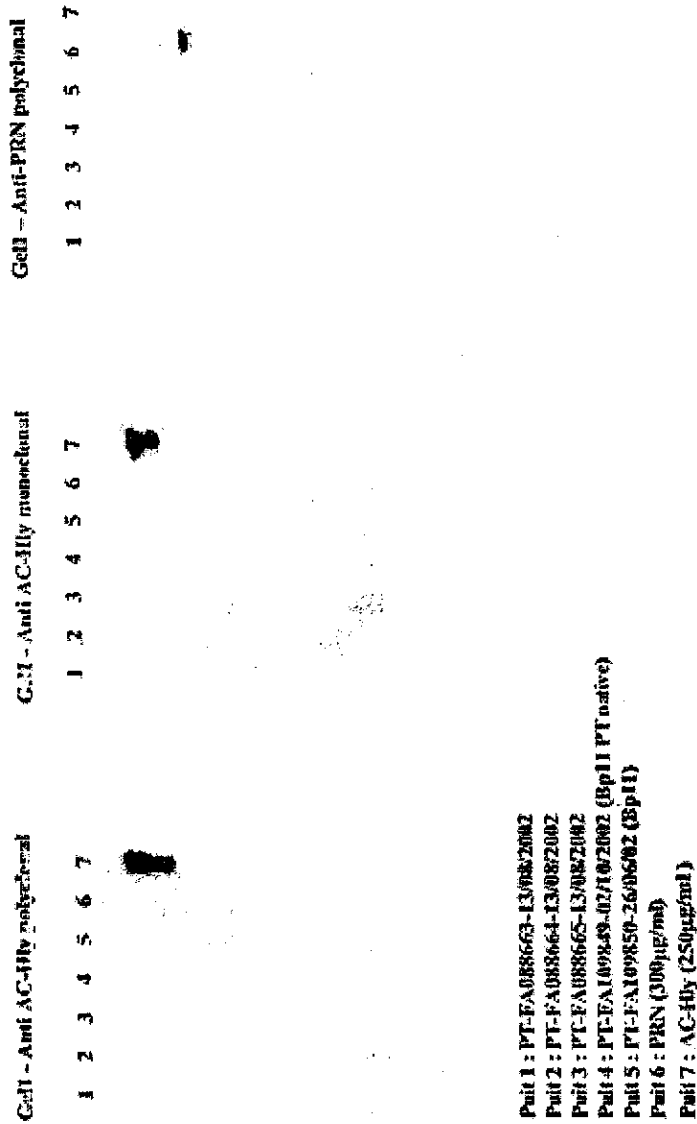


Figura 6: Resultados de ACT, PRN y fimbrias para los lotes de FHA purificada nativa

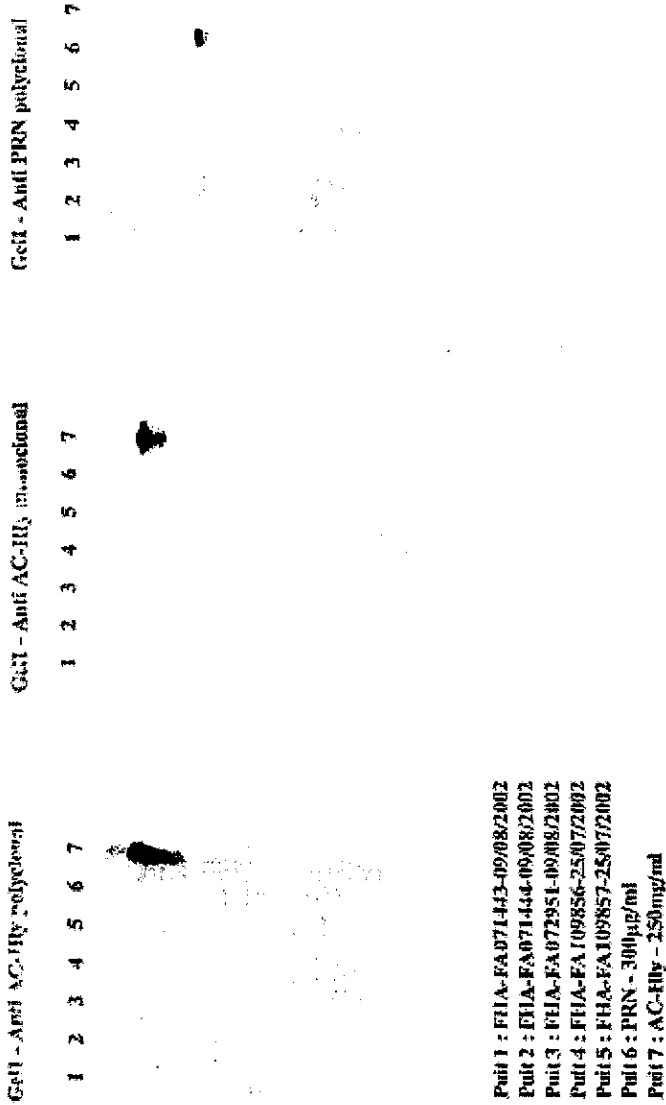
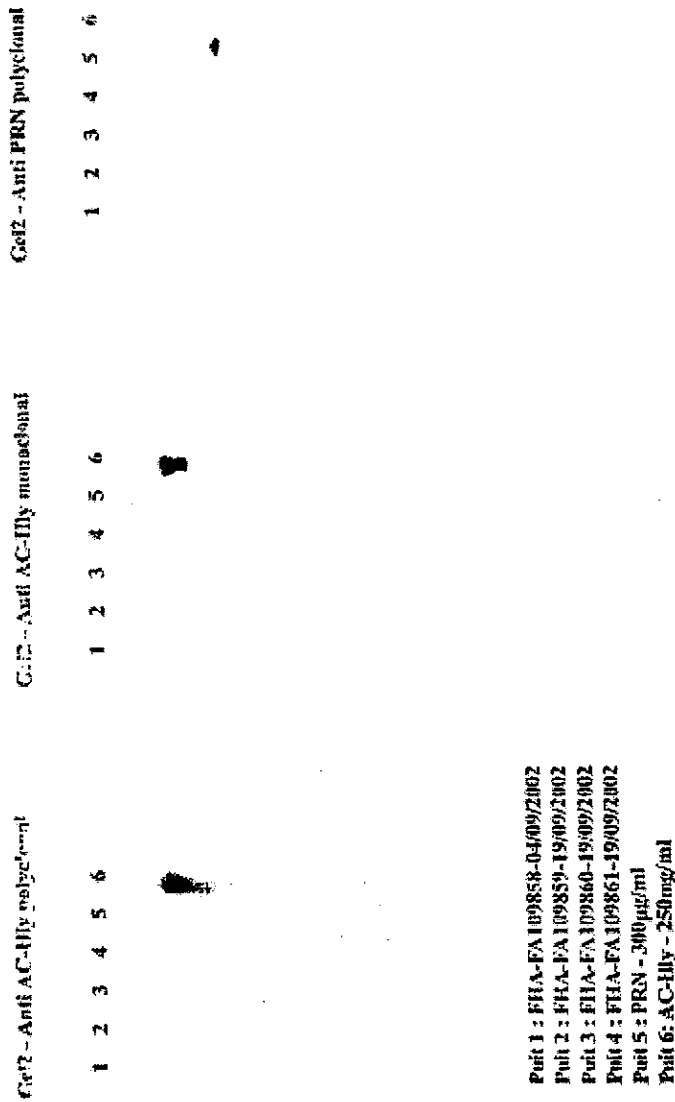




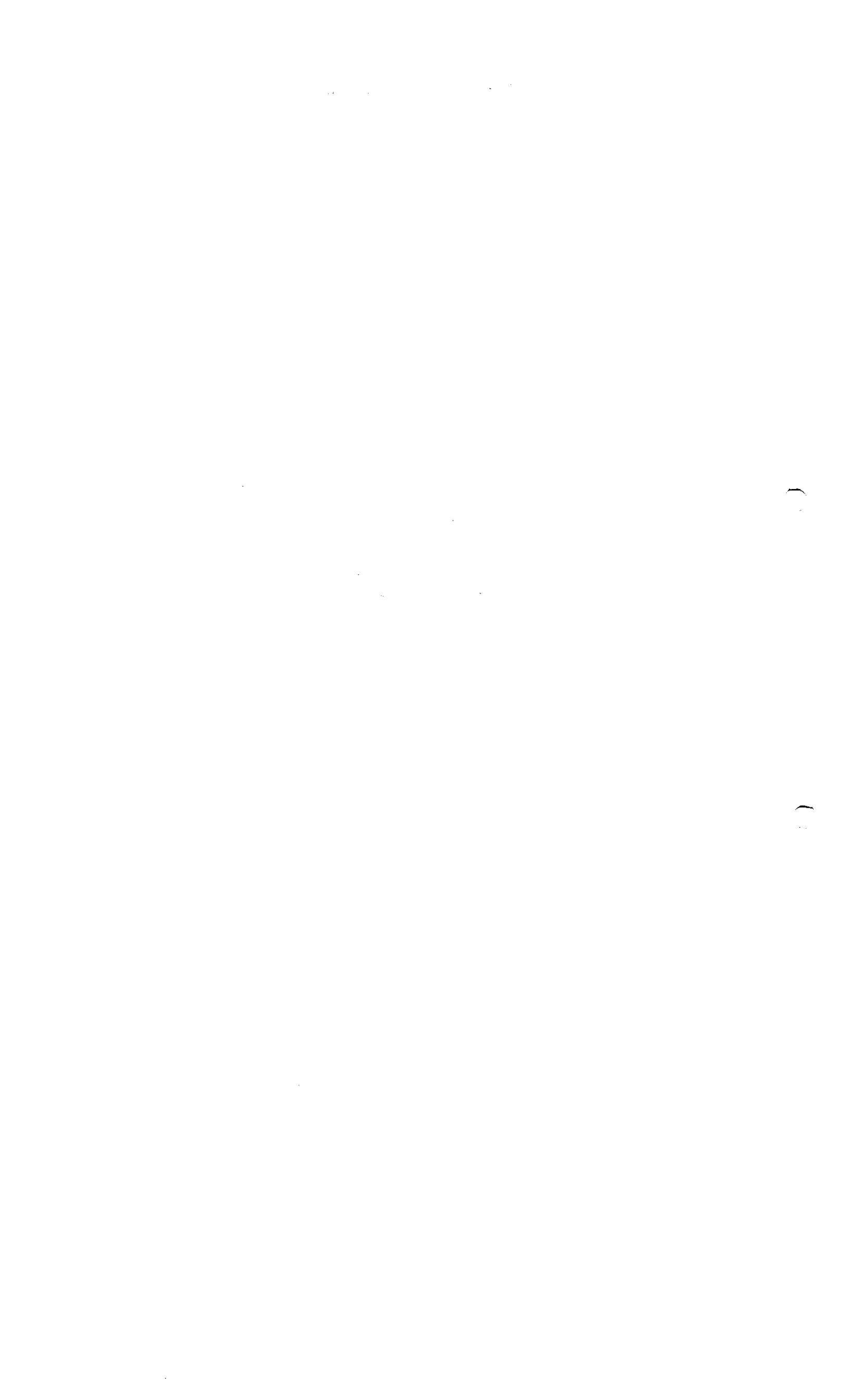


Figura 7: Resultados de ACT, PRN y fimbrias para los lotes de FHA purificada nativa



[Signature]
ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

[Signature]
CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
AUTORIZADO
SANOFI PASTEUR S.A.



**Determinación de la actividad de adenilato ciclasa**

Los resultados de la actividad de ACT se presentan en la tabla 33.

Tabla 33: Resultados del ensayo de la actividad de ACT

Números de lote			Ensayo de ACT	
PT purificada nativa	Lotes históricos	FA088663	0 a 0,15	0,3 a 0,17
		FA088664	0 a 0,28	0 a 0,07
		FA088665	0 a 0,4	0,1 a 0,07
	Lotes de uniformidad	FA109849	0 a 0,33	0,1 a 0,15
		FA109850	0,5 a 0,5	0,33 a 0,32
		FA109851	0,1 a 0,52	0,2 a 0,32
		FA109852	0 a 0,3	0,3 a 0,27
		FA109853	0 a 0,22	0,2 a 0,28
		FA109854	0,3 a 0,27	0,3 a 0,25
FHA purificada nativa	Lotes históricos	FA071443	1,1 a 1	1,1 a 1,02
		FA071444	8,7 a 8,7	8,03 a 9,13
		FA072951	0,5 a 0,75	0,9 a 0,87
	Lotes de uniformidad	FA109856	0,4 a 0,57	0,9 a 0,7
		FA109857	0,1 a 0,27	0,3 a 0,38
		FA109858	0 a 0,3	0,4 a 0,4
		FA109859	0,5 a 0,66	1,1 a 0,78
		FA109860	0 a 0,28	0,4 a 0,3
		FA109861	0,1 a 0,38	0,6 a 0,43

No se informó actividad de adenilato ciclasa, excepto en una muestra de FHA (de un lote histórico). La actividad observada, la cual corresponde probablemente a fragmentos de degradación fue menor que 1 ng/dosis, es decir, mucho menor a la especificación de la Farmacopea Europea de 500 ng/dosis.

Conclusión

El análisis de los 6 lotes de uniformidad demuestra que el proceso de purificación garantiza la eliminación de adenilato ciclasa y pertactina.

3.5.1.2 Citotoxina traqueal

Se realizó un ensayo de TCT en los 6 lotes de uniformidad de PT purificada nativa y de FHA purificada nativa, y en 3 lotes históricos de PT purificada nativa y de FHA purificada nativa, con el fin de detectar la posible presencia de TCT residual. Los números de los lotes probados se presentan en la tabla 32.

El análisis fue realizado por HPLC en un laboratorio de referencia (laboratorio de W. E. Goldman – Washington University School of Medicine).

Los resultados se presentan en la tabla 34.





Tabla 34: Resultados del contenido de TCT

Número de lote		Contenido de TCT (pmol)	
PT purificada nativa	Lotes históricos	FA088663	<10 pmol
		FA088664	<10 pmol
		FA088665	<10 pmol
	Lotes de uniformidad	FA109849	<10 pmol
		FA109850	<10 pmol
		FA109851	<10 pmol
		FA109852	<10 pmol
		FA109853	<10 pmol
		FA109854	<10 pmol
FHA purificada nativa	Lotes históricos	FA071443	<10 pmol
		FA071444	<10 pmol
		FA072951	<10 pmol
	Lotes de uniformidad	FA109856	<10 pmol
		FA109857	<10 pmol
		FA109858	<10 pmol
		FA109859	<10 pmol
		FA109860	<10 pmol
		FA109861	<10 pmol

Según el límite de detección del método (10 pmol) y la concentración de proteína de las muestras de prueba, el nivel de TCT fue menor que 0,2 pmol/25 µg de proteína (equivalente a la dosis humana) en los lotes analizados de PT purificada nativa y de FHA purificada nativa.

Conclusión

El análisis de los 6 lotes de uniformidad demuestra que el proceso de purificación garantiza la eliminación de la citotoxina traqueal.

3.5.1.3 Contenido de endotoxina lipopolisacárida

El contenido de endotoxina lipopolisacárida (LPS) se determinó por medio de la prueba de pirógenos en conejos y de la prueba de lisado de amebocitos de Limulus (LAL).

Nota: La prueba de LAL se realiza de manera rutinaria en el PTxd purificado en solución, en la FHA purificada en solución y en el producto finalizado (vea 3.2.S.2.4 Controles de los pasos críticos e intermedios).

Resultados

Los resultados obtenidos de los 6 lotes de uniformidad se resumen en la tabla 35.

