





Tabla 35: Resultados de LPS

Toxina pertúsica purificada nativa						
Prueba	N.º de lote					
	FA109849	FA109850	FA109851	FA109852	FA109853	FA109854
LAL (UI/mL)	76,85	257,10	831,10	26,92	91,69	65,43
Pirógenos (°C)	+0,75	+0,25	+0,40	+0,70	+0,20	+0,60
FHA purificada nativa						
Prueba	N.º de lote					
	FA109856	FA109857	FA109858	FA109859	FA109860	FA109861
LAL (UI/mL)	10,48	6,67	4,90	9,83	1,64	1,63
Pirógenos (°C)	+0,10	+0,35	+0,35	+0,40	+0,20	+0,50

Se detectaron niveles bajos de endotoxina LPS con la prueba de LAL y no se detectaron sustancias pirógenas. Este estudio demuestra la eficacia del proceso de purificación con respecto a la eliminación de endotoxinas.

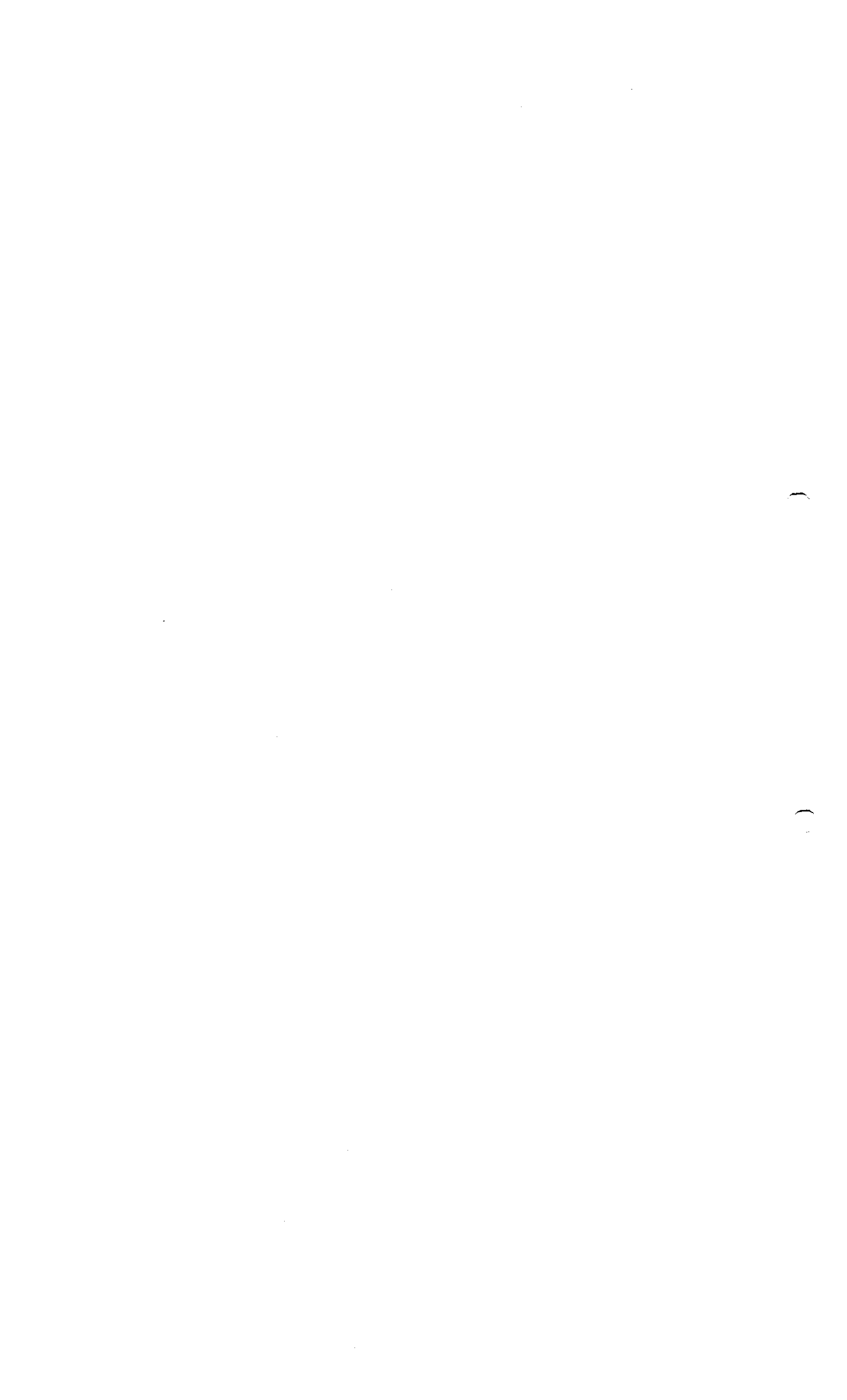
3.5.1.4 Toxina dermonecrótica

La actividad residual dermonecrótica se verifica de manera rutinaria en la etapa de FHA purificada adsorbida, según se describe en 3.2.S.4.1 Especificación.

En el marco del estudio de validación, la prueba de actividad dermonecrótica residual también se realizó en los 6 lotes de uniformidad de FHA purificada nativa, de PTxd purificado en solución y de FHA purificada en solución, con el fin de demostrar la eficacia del proceso de purificación con respecto a la eliminación de la toxina dermonecrótica termolábil.

Cada lote de prueba se inyectó en 4 grupos de 3 ratones lactantes (0,1 mL/ratón lactante) por vía intradérmica (piel del cuello) de la siguiente manera:

- Grupo 1: PTxd en solución, FHA purificada nativa o FHA purificada en solución (diluida a razón de 250 µg/mL con PBS).
- Grupo 2: PBS (controles negativos).
- Grupos 3 y 4: controles positivos: sobrenadante sonificado de *Bordetella pertussis*. 2 diluciones probadas: 1/64 y 1/128, o 1/128 y 1/256 (se ha comprobado que causan lesiones hemorrágicas y/o necróticas).





Los resultados relacionados con todos los lotes se presentan en la tabla 36. Los resultados se expresan como el número de ratones lactantes que muestran una lesión en el lugar de la inyección, de acuerdo con la siguiente escala:

- = sin lesión en el lugar de la inyección
- + = lesión hemorrágica leve (rosado pálido)
- ++ = lesión hemorrágica moderada (rosado oscuro a rojo)
- +++ = lesión hemorrágica marcada (púrpura)
- ++++ = Necrosis (negro)

Nota: debido a que se probaron varios lotes en el mismo experimento, los controles negativos y positivos fueron los mismos para diferentes lotes.

Tabla 36: Resultados de la prueba de actividad dermonecrótica residual

Producto probado		Resultados de la actividad de la toxina dermonecrótica residual (observación en diferentes intervalos de tiempo después de la inyección)			
		5 horas	24 horas	48 horas	72 horas
Control negativo (PBS)		18 -	18 -	18 -	18 -
Control positivo (sobrenadante del cultivo de <i>Bordetella pertussis</i>)	en dilución de 1/64 o 1/128	10 + 2 ++	11 +++ 1 +++++	2 +++ 10 +++++	2 +++ 10 +++++
	en dilución de 1/128 o 1/256	12 -	6 - 1 + 2 ++ 3 +++	6 - 3 ++ 3 +++	6 - 1 + 2 ++ 3 +++
Lotes de uniformidad de PTxd purificado en solución		18 -	18 -	18 -	18 -
Lotes de uniformidad de FHA purificada nativa		18 -	18 -	18 -	18 -
Lotes de uniformidad de FHA purificada en solución		18 -	18 -	18 -	18 -

No se detectó actividad dermonecrótica en los ratones lactantes en los 6 lotes de uniformidad del PTxd purificado en solución, FHA purificada nativa y FHA purificada en solución.

El estudio demostró la eficacia del proceso de purificación con respecto a la eliminación de la toxina termolábil.

3.5.2 Impurezas relacionadas con el proceso

- β -ciclodextrina

Se descubrió que el nivel de β -ciclodextrina, evaluado en 3 lotes históricos de PT purificada nativa y de FHA purificada nativa y en los 6 lotes de uniformidad de PT purificada nativa y de FHA purificada nativa, es menor que el límite de cuantificación (0,005 mg/mL).

El método y los resultados se presentan en 3.2.S.3.2 Impurezas.





- Asialofetuina

El proceso de purificación de la PT incluye un paso de cromatografía de afinidad que utiliza asialofetuina (ASF) como ligando. La detección de posibles rastros de asialofetuina mediante el análisis de Western Blot se realizó en los 6 lotes de uniformidad de PT purificada nativa. Para todos los lotes probados, los resultados fueron menores que el límite de detección (<0,05 µg/muestra).

El método y los resultados se presentan en 3.2.S.3.2 Impurezas.

- Glutaraldehído

El contenido de glutaraldehído residual se realiza de manera rutinaria en la etapa de PTxd purificado en solución, según se describe en 3.2.S.2.4 Controles de los pasos críticos e intermedios.

Los resultados obtenidos en los 6 lotes de uniformidad del PTxd purificado en solución se presentan en el capítulo 3.4 (vea la tabla 27). Todos los resultados fueron menores al límite de detección 2,0 µg/mL.

- Timerosal

El nivel de contenido timerosal se evaluó en los 6 lotes de uniformidad de PT purificada nativa y de FHA purificada nativa. Todos los resultados obtenidos fueron menores que el límite de detección de 0,24 µg de timerosal/mL, lo que corresponde a menos de 18 ng de timerosal por dosis de vacuna.

El método y los resultados se presentan en 3.2.S.3.2 Impurezas.

3.5.3 Pruebas adicionales (varios)

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

Se aplicó el método ELISA en los sobrenadantes de adsorción para verificar que el PTxd por un lado y la FHA por el otro se hayan adsorbido completamente en el gel de hidróxido de aluminio.

El porcentaje de antígenos no adsorbidos en el gel de hidróxido de aluminio se calculó teniendo en cuenta lo siguiente:

- Después de la decantación, un máximo del 97 % del toxoide pertúsico es eliminado para los 6 lotes de uniformidad (sobrenadante eliminado).
- Después de la decantación, un máximo del 57 % de la FHA es eliminado para los 6 lotes de uniformidad (sobrenadante eliminado).
- Los antígenos en solución se diluyen a razón de 1:2,15 para ser adsorbidos en gel de hidróxido de aluminio.

Los resultados se muestran en la tabla 37 y tabla 38.

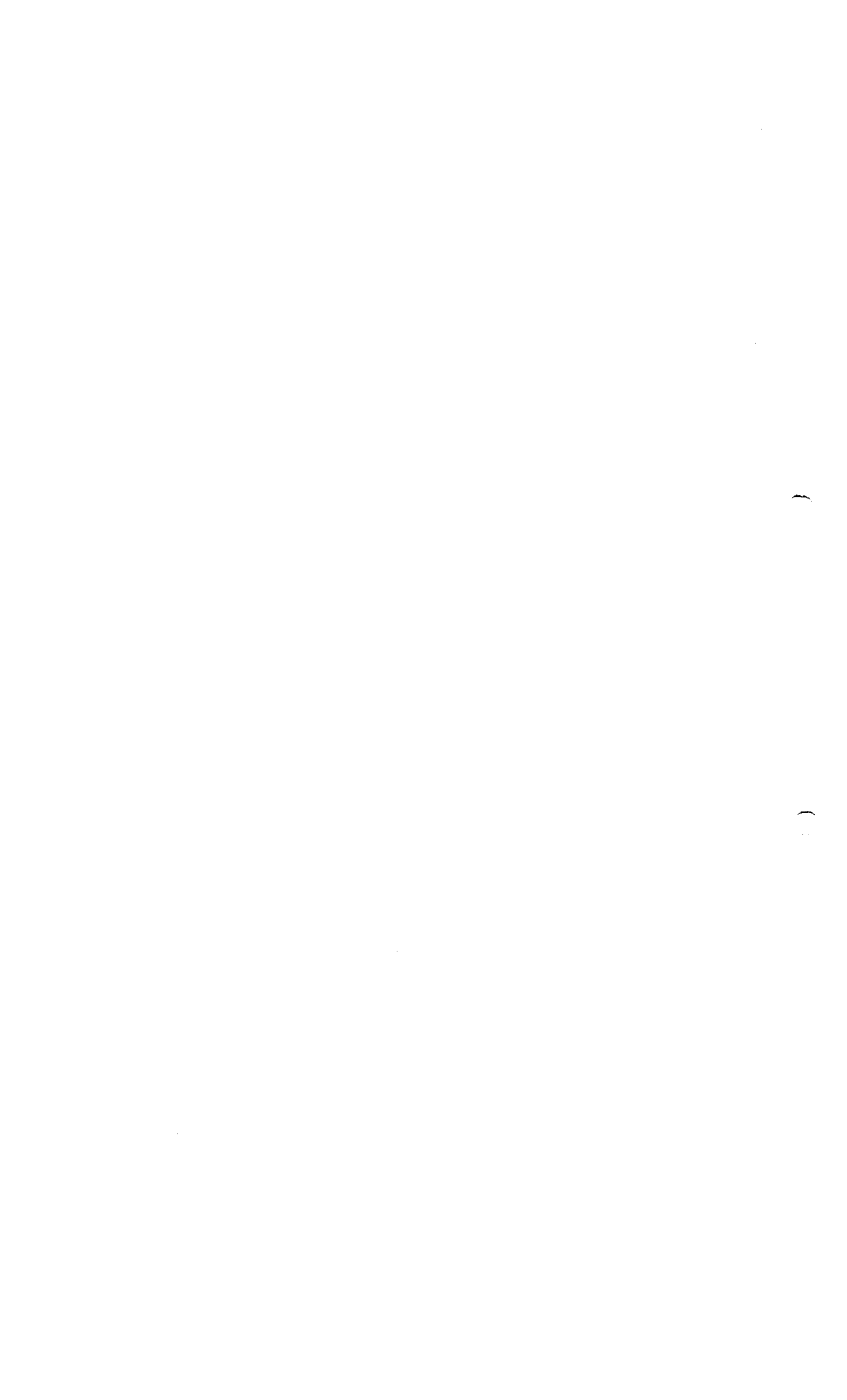




Tabla 37: Porcentaje de PTxd no adsorbido en el gel de hidróxido de aluminio

Número de lote	FA109869	FA109870	FA109871	FA109872	FA109873	FA109874
Resultado del método ELISA en el sobrenadante de la decantación	<11 ng/mL	<11 ng/mL	<2,5 µg/mL*	<2,5 µg/mL*	<2,5 µg/mL*	<2,5 µg/mL*
Concentración proteica en el PTxd en solución (µg/mL)	87,55	50,99	90,14	89,49	97,74	107,90
Porcentaje no adsorbido de PTxd	<0,03 %	<0,04 %	<5,6 %*	<5,6 %*	<5,3 %*	<4,73 %*

* 2,5 µg/mL es el límite de detección en el laboratorio donde se realizó el ensayo de los lotes

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

Número de lote	FA109869	FA109870	FA109871	FA109872	FA109873	FA109874
Resultado del método ELISA en el sobrenadante de la decantación (µg/mL)	1,75	0,83	0,83	1,04	0,52	0,42
Concentración proteica en la FHA en solución (µg/mL)	934,19	938,98	1173,16	1004,82	1256,55	681,96
Porcentaje no adsorbido de FHA	0,23 %	0,1 %	0,09 %	0,13 %	0,05 %	0,07 %

Un pequeño porcentaje (máximo de 0,23 %) de los dos antígenos (PTxd y FHA) no se adsorbió en el gel de hidróxido de aluminio y fue eliminado de los sobrenadantes de la decantación. Por lo tanto, la adsorción en el gel de hidróxido de aluminio se encuentra bajo control.



3.5.3.2 Cinética de la detoxificación del PTxd

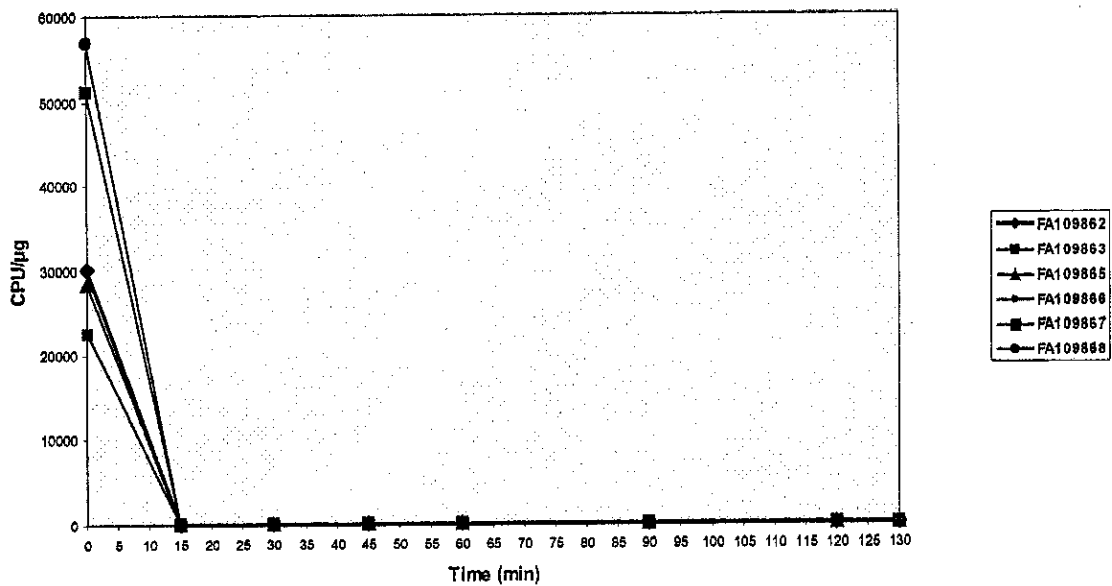
Además de la prueba de rutina de agrupamiento en células CHO realizada en el PTxd purificado en solución (resultados dentro de los criterios de aceptación para los 6 lotes de uniformidad, vea tabla 27), se estudió la cinética de la detoxificación en los 6 lotes de uniformidad, con el fin de asegurar que el PTxd fue detoxificado completamente después de una incubación de 50 minutos (un límite impuesto), debido a que la duración total de la detoxificación es de 130 minutos.

El siguiente gráfico muestra los resultados de los seis estudios de cinética en los seis lotes de uniformidad.

El gráfico permite llegar a la siguiente conclusión:

- El PTxd fue detoxificado después de 15 minutos de incubación,
- Los 6 lotes reaccionaron de manera similar (reproducibilidad).

Consistency of the detoxification : 6 batches from V12



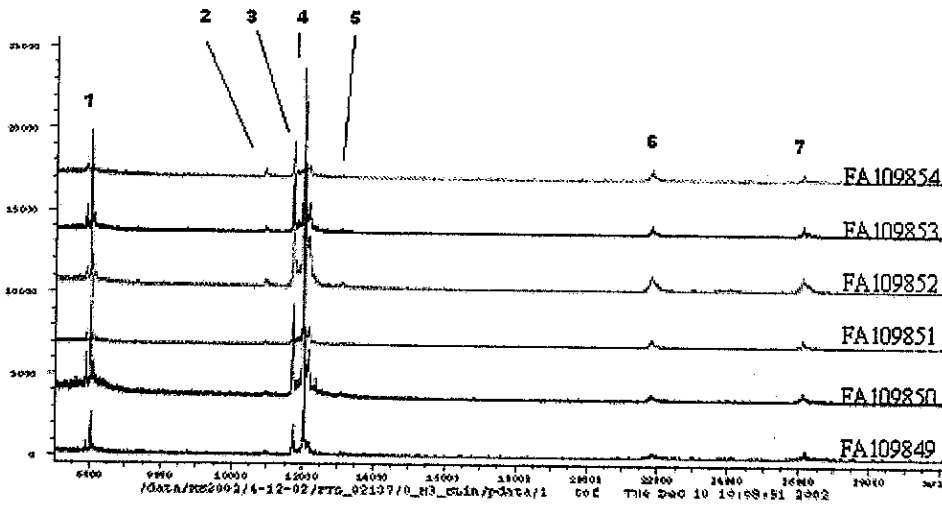
3.5.4 Espectrometría de masa en la PT purificada nativa

La figura 8 muestra espectros superpuestos para la PT nativa, obtenidos por espectrometría MALDI-TOF (ionización deserción láser asistida por matriz-tiempo de vuelo) para los seis lotes de uniformidad de PT purificada nativa. Este método permite medir con precisión la masa de las subunidades de la PT. Las cinco subunidades de la toxina pertúsica S1 a S5 se detectaron como formas cargadas simples (+1) o dobles (2+).





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



a

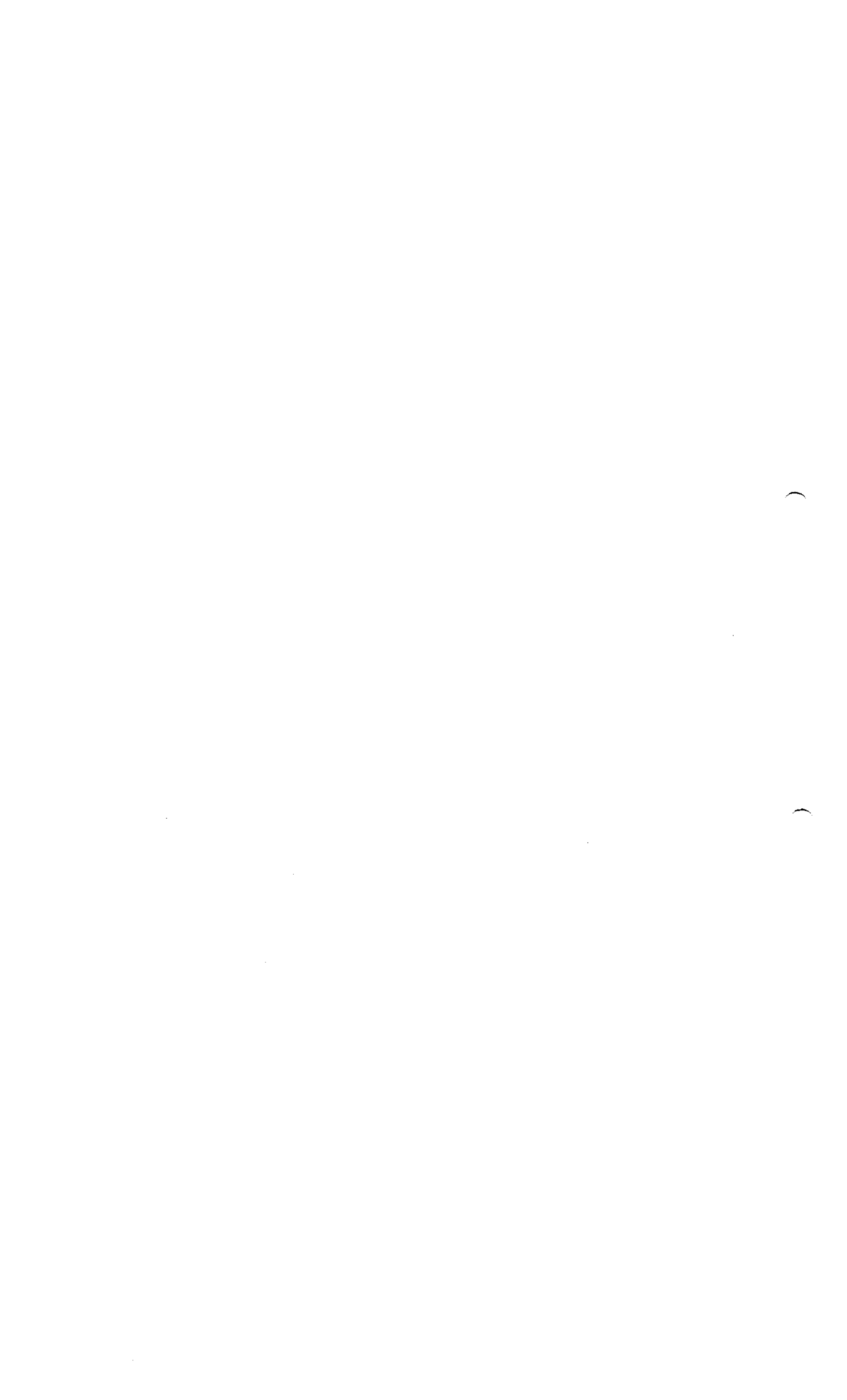
- 1: S4 (+2)
- 2: S2 (+2) y S3 (+2)
- 3: S5 (+1)
- 4: S4 (+1)
- 5: S1 (+2)
- 6: S3 (+1) y S2 (+1)
- 7: S1 (+1)

RA_0301918

Información confidencial/proprietaria
Página 66 de 72

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

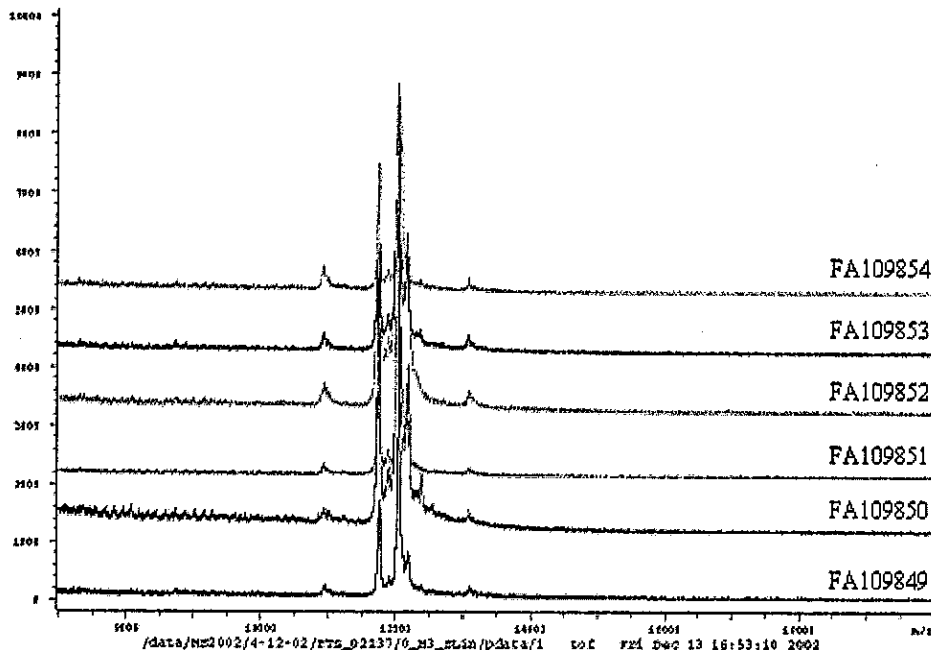
CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.





La figura 9 proporciona una vista detallada del grupo de picos alrededor de las subunidades

Figura 9: Grupo de picos alrededor de la subunidad S5



La figura 8 y la figura 9 muestran lo siguiente:

- la estructura de la PT descubierta corresponde a la estructura esperada con la presencia de 5 subunidades
- la PT es pura,
- los lotes de producción se pueden reproducir.

No fue posible realizar este tipo de análisis en los lotes de FHA purificada nativa debido a que el peso molecular de la FHA es muy alto (220 kDa).

3.5.5 Calorimetría de barrido diferencial

La calorimetría de barrido diferencial permite la comparación de la conformación de las proteínas mediante una medición de los parámetros termodinámicos de la desnaturalización térmica.

Análisis de DSC de los lotes de PT purificada nativa

La figura 10 muestra los termogramas superpuestos para la PT purificada nativa en 3 lotes históricos y en 6 lotes de uniformidad. El análisis de los datos y las interpretaciones se concentraron en la comparación de los puntos medios de la transición de proteínas desplegadas a

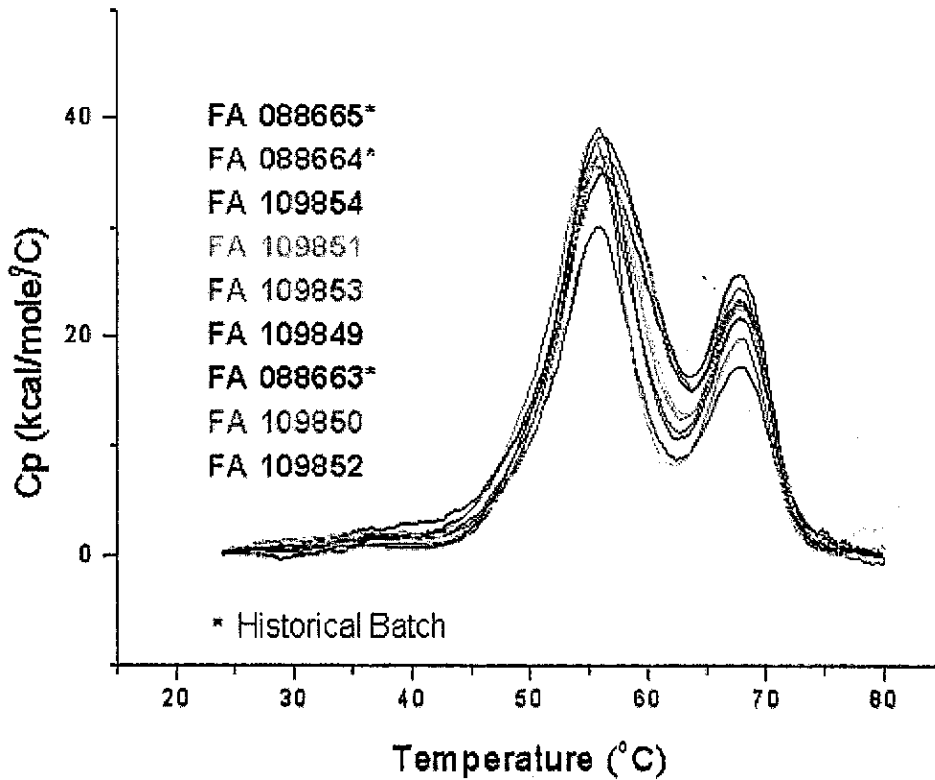




diferentes temperaturas, ya que se descubrió que este parámetro es un marcador acertado de la conformación proteica.

Este primer pico corresponde más probablemente a la desnaturalización del oligómero B (subunidades S1 a S5) y el segundo pico a la desnaturalización de la subunidad S1.

Figura 10: Termograma de DSC de los lotes de uniformidad de PT purificada nativa



La figura muestra que los perfiles de los 9 lotes analizados se pueden superponer. Por lo tanto, los lotes tienen comportamientos similares (reproducibilidad).

Análisis de DSC de la FHA purificada nativa

La figura 11 muestra los termogramas superpuestos obtenidos para la FHA nativa en 3 lotes históricos y en 6 lotes de uniformidad.

^a FA 088665, FA 088664 y FA088663 son tres lotes históricos

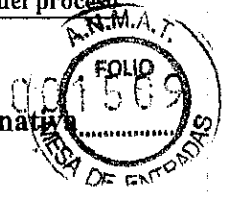
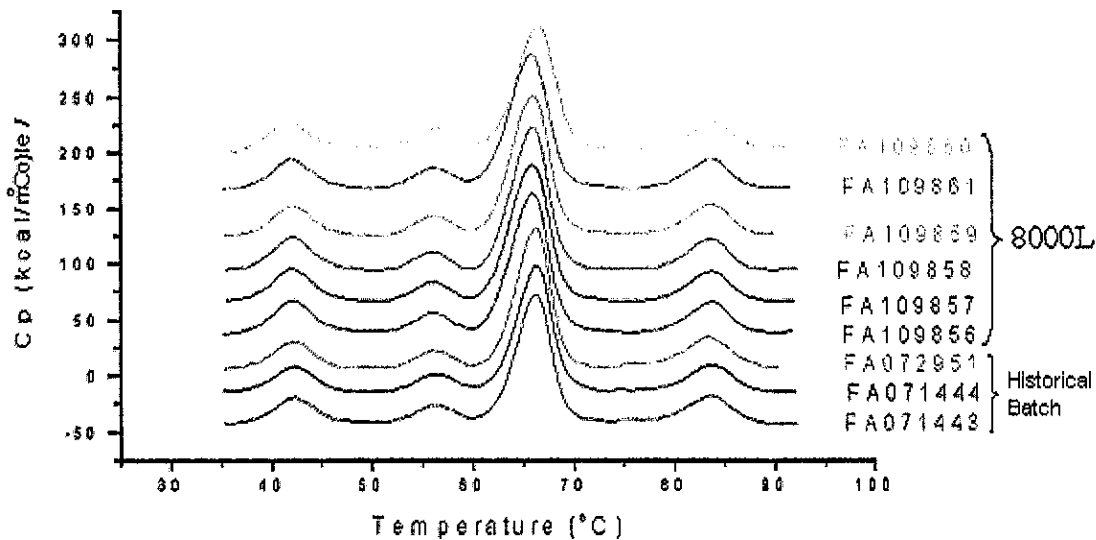


Figura 11: Termograma de DSC de los lotes de de uniformidad de FHA purificada nativa



Los cuatro eventos de despliegue termodinámico, característicos de la desnaturalización de la FHA, indican que la proteína contiene probablemente 4 dominios que se desnaturalizan de manera consecutiva.

La figura muestra que los perfiles de los 9 lotes analizados están superpuestos. Por lo tanto, los lotes tienen comportamientos similares (reproducibilidad).

3.5.6 Desafío intranasal

El desafío intranasal es una prueba funcional realizada para evaluar la capacidad de los antígenos adsorbidos (PTxd purificado adsorbido y FHA purificada adsorbida) de proteger a los ratones (Balb/c) de una infección pulmonar inducida por la *Bordetella pertussis* (Bp 1823, cepa OMS) por vía nasal. Los detalles del método y los resultados se encuentran en 3.2.S.3.1 Elucidación de la estructura y otras características.

Los lotes FA109872 y FA109886 se utilizaron para evaluar la funcionalidad del PTxd purificado adsorbido y de la FHA, respectivamente.

Los datos acerca de la colonización bacteriana de los pulmones, expresados en Log(UFC/mL), obtenidos 12 días (D12) después de la inmunización se muestran en la tabla 39.



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

Inyección	Ratones no inmunizados			PTxd adsorbido Lote FA109872			FHA adsorbida Lote FA 109886			FHA adsorbida + PTxd adsorbido		
	Resultados Log(UFC/mL)	Desviación estándar	Número de ratones	Resultados Log(UFC/mL)	Desviación estándar	Número de ratones	Resultados Log(UFC/mL)	Desviación estándar	Número de ratones	Resultados Log(UFC/mL)	Desviación estándar	Número de ratones
Día 0	5,31	0,15	5	5,25	0,09	5	5,27	0,14	5	5,43	0,04	5
Día 12	5,55	0,92	5	2,36	1,35	5	4,82	0,30	5	1,67	1,21	5

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.

RA_0301918







Estos ensayos demuestran que el PTxd purificado adsorbido y la FHA purificada adsorbida pueden proteger a los ratones Balb/c de una infección pulmonar causada por *Bordetella pertussis*.

3.6 Conclusión

Todos los valores registrados para los parámetros de producción durante el programa de validación de los pasos de purificación cumplen con los rangos de operación predefinidos (vea la tabla 6 a la tabla 9).

Todos los resultados de IPC y las pruebas de caracterización realizados como parte de la validación cumplen con los criterios de aceptación predefinidos, excepto algunos resultados que no cumplen con las especificaciones para el contenido de carga biológica que muestran que la contaminación microbiana no se controló completamente en las etapas iniciales del proceso de purificación (vea la tabla 10 a la tabla 12). Se identificaron las causas de la falla y se diseñó un plan de acción. Por lo tanto, se elaboraron cuatro lotes de validación complementarios y los resultados permiten demostrar que la contaminación microbiana se controla adecuadamente en el proceso de purificación descrito en 3.2.S.2.2 Descripción del proceso de elaboración y controles del proceso.

Todas las pruebas de control de calidad realizadas durante los pasos de purificación cumplen con las especificaciones de liberación descritas en 3.2.S.2.4 Controles de los pasos críticos e intermedios y 3.2.S.4.1 Especificación (vea la tabla 26 a la tabla 31).

Las pruebas de caracterización realizadas en los lotes de uniformidad demuestran que el proceso de purificación permite la producción de antígenos purificados adsorbidos de la calidad requerida.

En conclusión, el proceso de purificación de la *Bordetella pertussis* está validado, controlado y se puede reproducir, desde el primer cultivo previo hasta la etapa de antígenos purificados adsorbidos.

4 Vida de las columnas

4.1 Vida de la columna de ASF-4B sefarosa

La vida de la columna de ASF-4B sefarosa fue evaluada durante el desarrollo del producto. Los resultados muestran que después de 57 ciclos de purificación, la columna de ASF-4B sefarosa todavía puede purificar la PT sin disminuciones importantes de rendimiento. Con base en la producción histórica, la vida de las columnas se redujo a 25 ciclos de purificación. Además se realiza un seguimiento del desempeño del gel de manera rutinaria mediante la evaluación de la evolución de la longitud de los picos de elución y la realización de un seguimiento del rendimiento de la PT.

4.2 Vida de la columna de HXP

Se definió una vida de 15 ciclos para la columna de HXP, de acuerdo con estudios de regeneración.





Además del control de la actividad de hemaglutinación en HXP, se evalúa el sobrenadante de manera rutinaria (no se registra actividad de hemaglutinación en presencia de colesterol). En caso de que se inhiba la actividad de HA con colesterol, la prueba se debe confirmar en 2 ciclos posteriores antes de reemplazar el soporte.

5 Conclusión general

Todos los resultados obtenidos durante el programa de validación demuestran que el proceso de elaboración está validado y controlado, y se puede reproducir en todos los pasos: fermentación de *Bordetella pertussis*; cosecha, separación de los dos antígenos pertúsicos, purificación para obtener los antígenos pertúsicos purificados nativos, detoxificación de la PT purificada nativa para obtener el PTxd purificado en solución y adsorción en hidróxido de aluminio para obtener el PTxd purificado adsorbido y la FHA purificada adsorbida.

