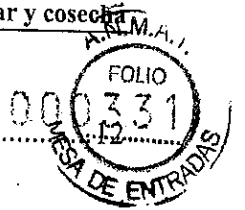

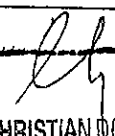
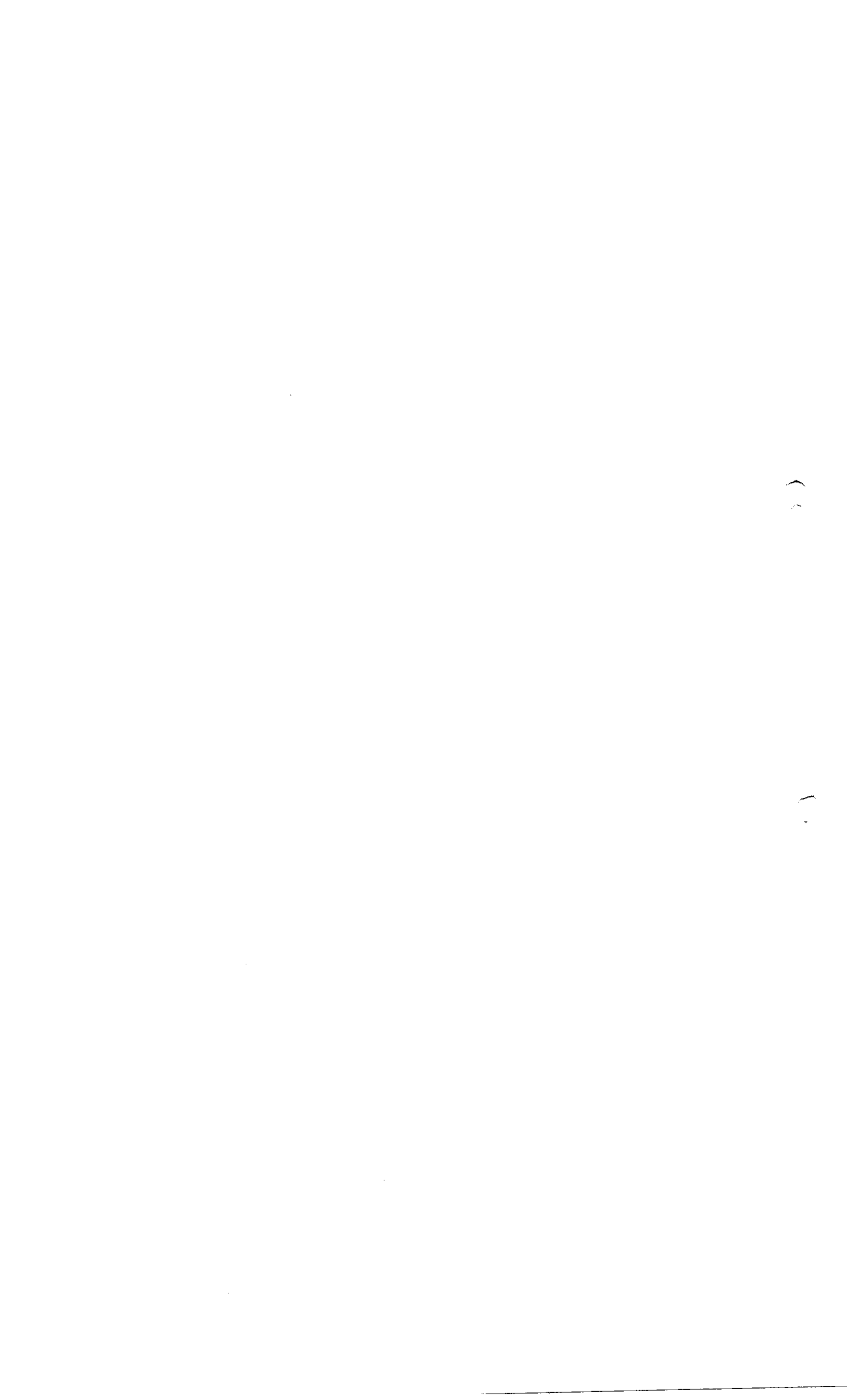


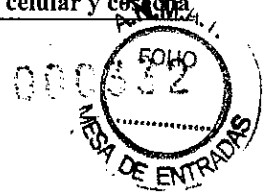
3.6 Otros aditivos.....




ROXANA MONTEMILONE DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.



CHRISTIAN DOMINGUEZ APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.






Lista de tablas

Tabla 1: Controles durante el proceso aplicados en la fermentación de *Corynebacterium diphtheriae* y en la cosecha de la toxina concentrada9


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

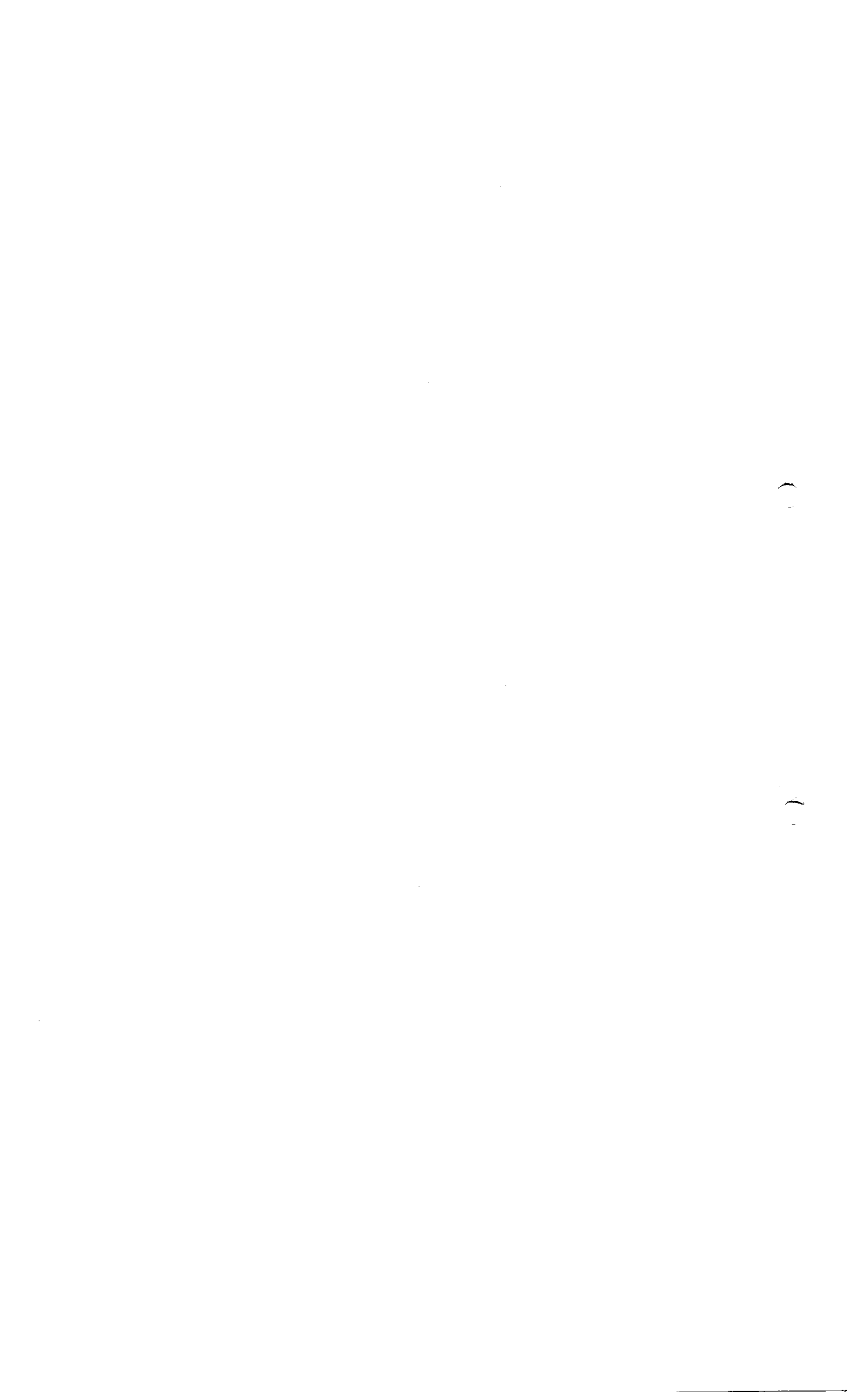

CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.





Lista de figuras

Figura 1: Preparación de la toxina diftérica concentrada y diafiltrada.....6





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

1 Fermentación de *Corynebacterium diphtheriae* y cosecha de la toxina diftérica

El esquema del proceso para la fermentación del *Corynebacterium diphtheriae* y la cosecha de la toxina diftérica se presenta en la Figura 1.


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTOR
SANOFI PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.

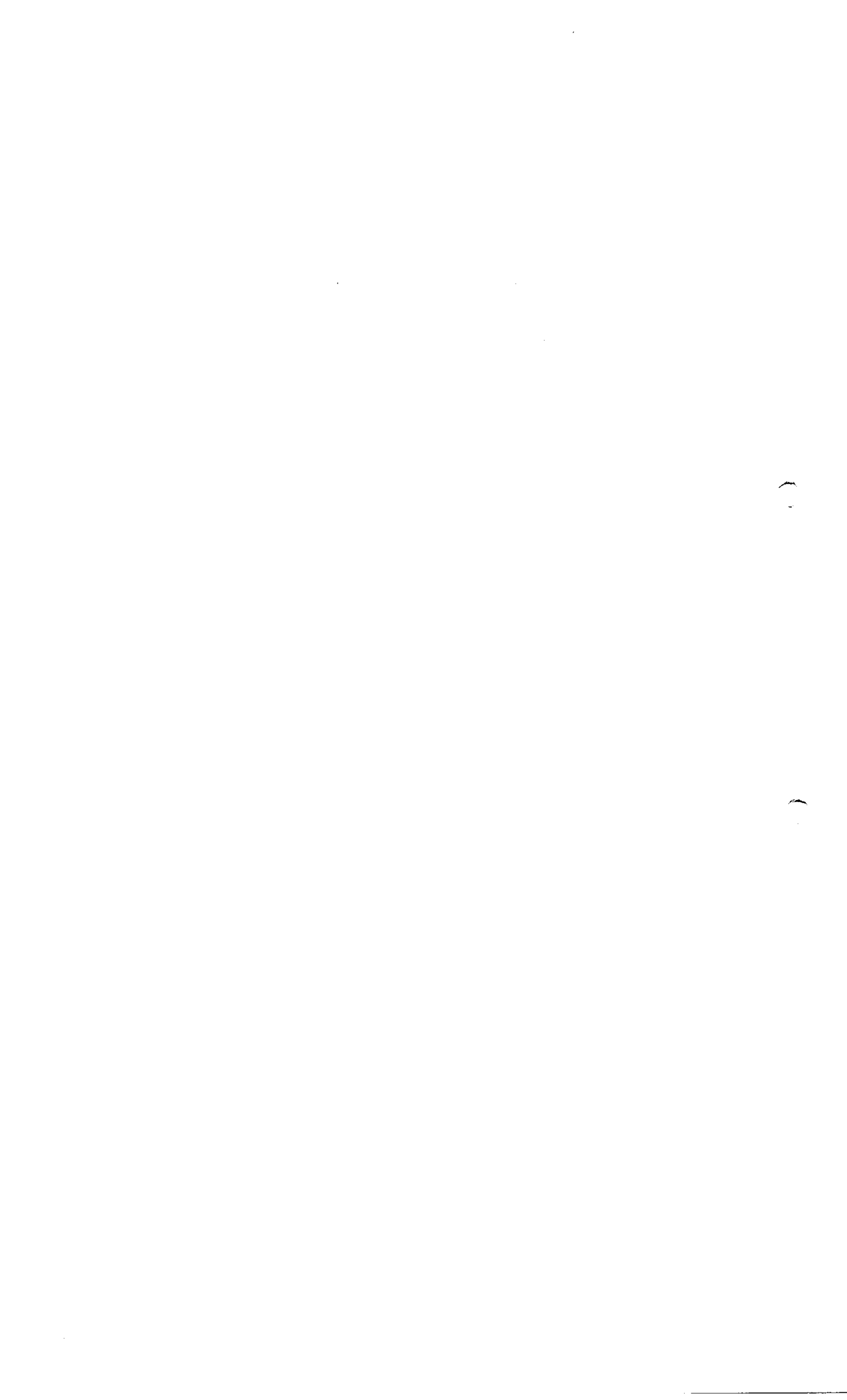
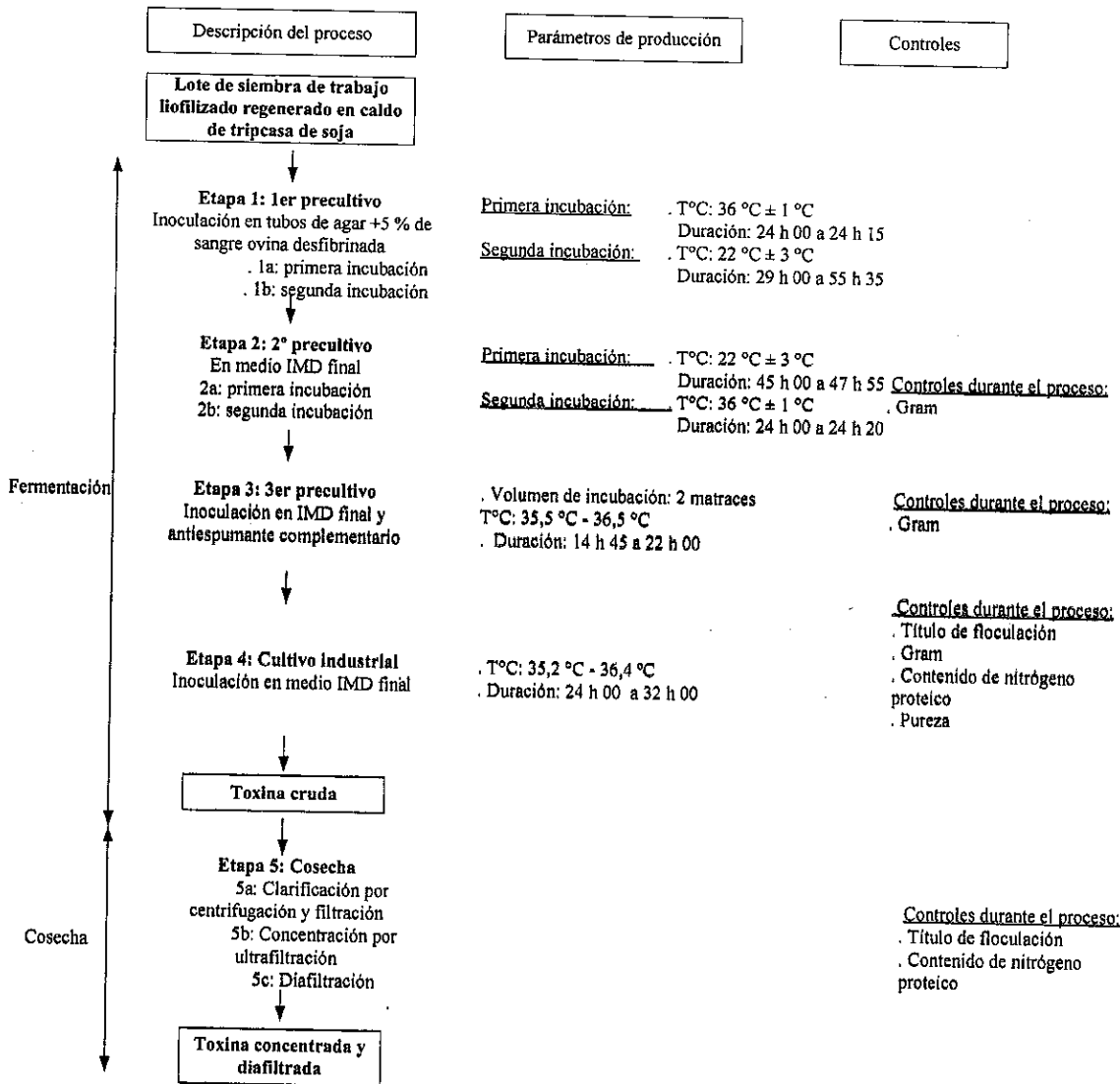
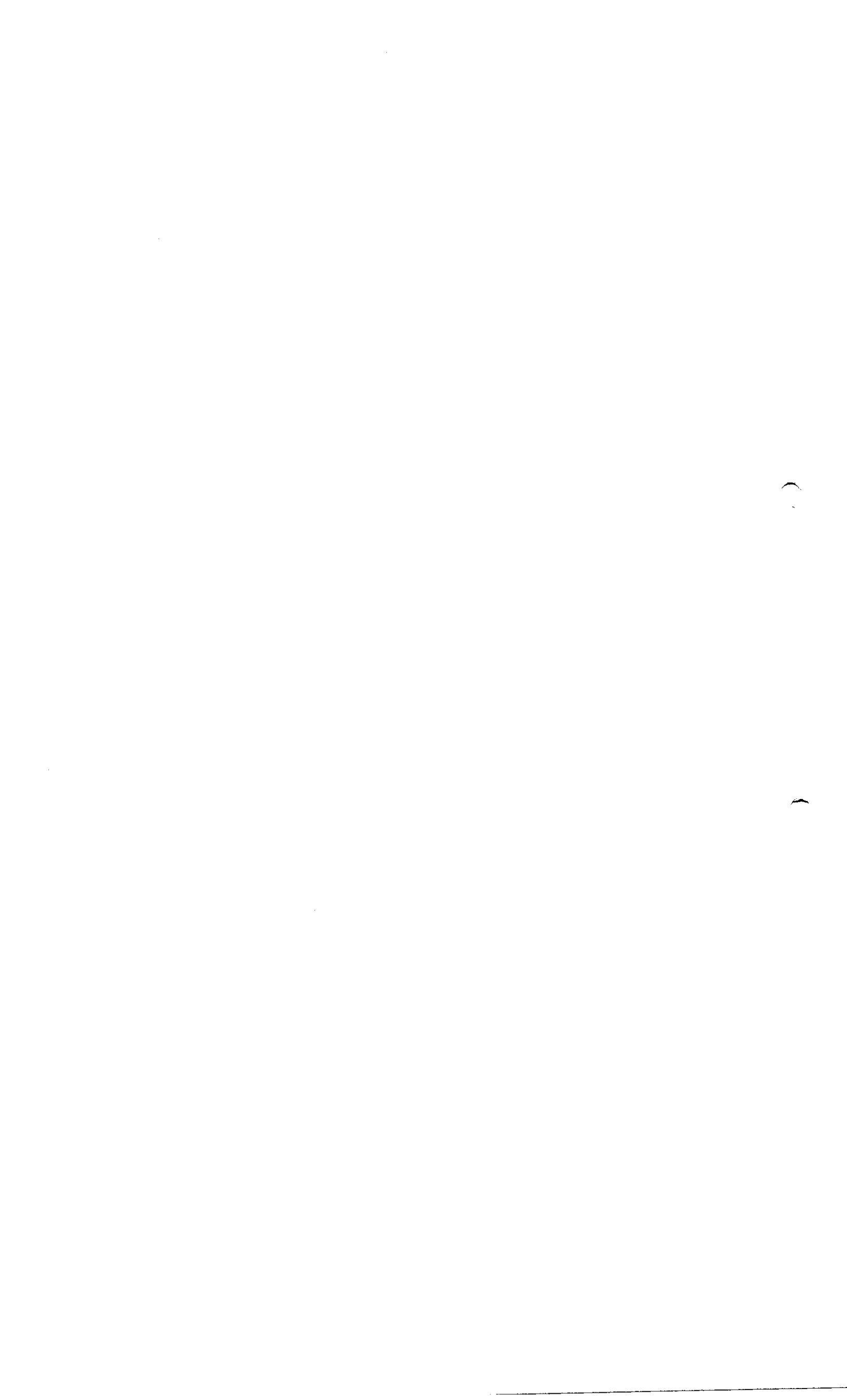
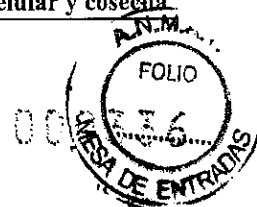




Figura 1: Preparación de la toxina diftérica concentrada y diafiltrada







1.1 Fermentación de *Corynebacterium diphtheriae*

1.1.1 Amplificación del cultivo

Etapa 1: Primer precultivo

Se reconstituyen ampollas liofilizadas de WSL de *C. diphtheriae* en caldo de trip casa de soja. El WSL reconstituido se inocula en la superficie de tubos de agar suplementados con 5 % de sangre de oveja desfibrinada.

Etapa 1a: Los tubos se incuban primero a $+36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ durante 24 horas a 24 horas 15 minutos.

Etapa 1b: Se realiza una segunda incubación de los tubos a $+22\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ de 29 horas a 55 horas 35 minutos.

Etapa 2: Segundo precultivo

Se inoculan con el cultivo anterior matraces que contienen medio de “difteria del Institute Mérieux” (medio IMD).

Etapa 2a: Los matraces se incuban a $+22\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ durante 45 horas a 47 horas 55 minutos bajo agitación.

Etapa 2b: Se realiza una segunda incubación de los matraces a $+36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ de 24 horas a 24 horas 20 minutos bajo agitación.

Al final de este paso, se agrupa el contenido de dos matraces (que podrían provenir de diferentes lotes de WSL) para constituir el inóculo que se utiliza para el tercer precultivo. La elección de los dos precultivos se realiza luego de un control de pureza y medición de la densidad óptica.

Etapa 3: Tercer precultivo

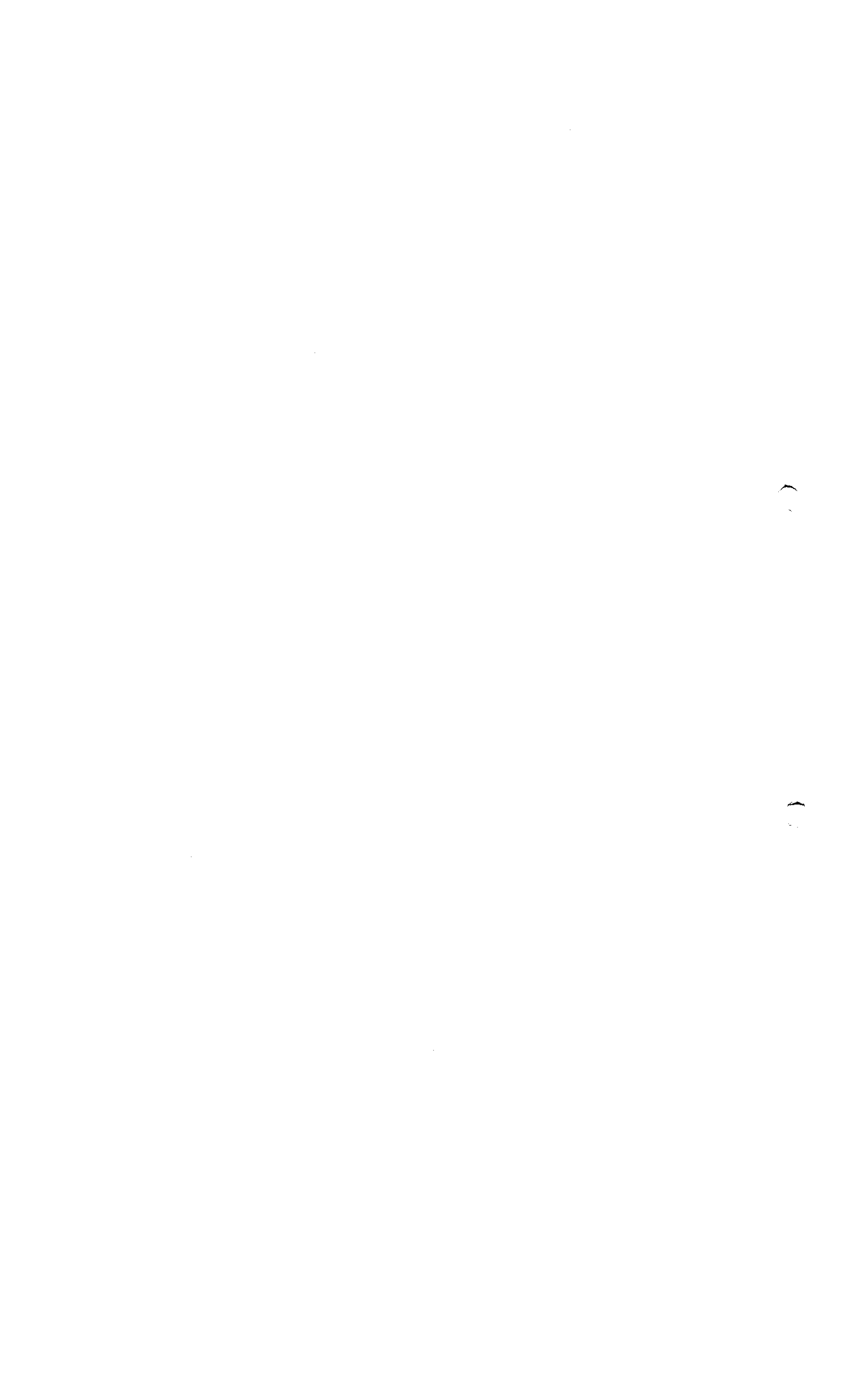
El medio IMD final se introduce en el prefermentador a través de un filtro de 0,2 μm . El contenido de los matraces seleccionados se inocula en el prefermentador, el cual se incubaba a $+35,5\text{ °C} - 36,5\text{ °C}$ en presencia de antiespumante durante 14 horas 45 minutos a 22 horas. Al final del tercer precultivo, se cosecha una alícuota del cultivo para los controles durante el proceso (vea el capítulo 2).

1.1.2 Cultivo industrial (etapa 4)

Se introduce medio IMD final en el fermentador a través de un filtro de 0,2 μm y el producto obtenido durante el tercer precultivo se inocula en el fermentador.

El cultivo se continúa durante 28 ± 4 horas a $35,2\text{ °C} - 36,4\text{ °C}$ en presencia de antiespumante.

Al final del cultivo industrial, se cosecha una muestra para los controles durante el proceso (vea el capítulo 2).





1.2 Proceso de cosecha (Etapa 5)

Etapa 5 a: Clarificación por centrifugado y filtración

El sobrenadante que contiene la toxina diftérica cruda se cosecha mediante centrifugación continua y se filtra. Se eliminan los desechos bacterianos.

Etapa 5b: Concentración por ultrafiltración

Luego, el sobrenadante se concentra por ultrafiltración.

Etapa 5c: Diafiltración

La toxina concentrada se diafiltra con tampón de fosfato.

Al final de la etapa de diafiltración, se toma una muestra para los controles durante el proceso, con el fin de calcular el título de floculación (vea el capítulo 2).

2 Controles durante el proceso

Los controles durante el proceso aplicados en la fermentación de *Corynebacterium diphtheriae* y en la cosecha de la toxina se presenta en la tabla 1.

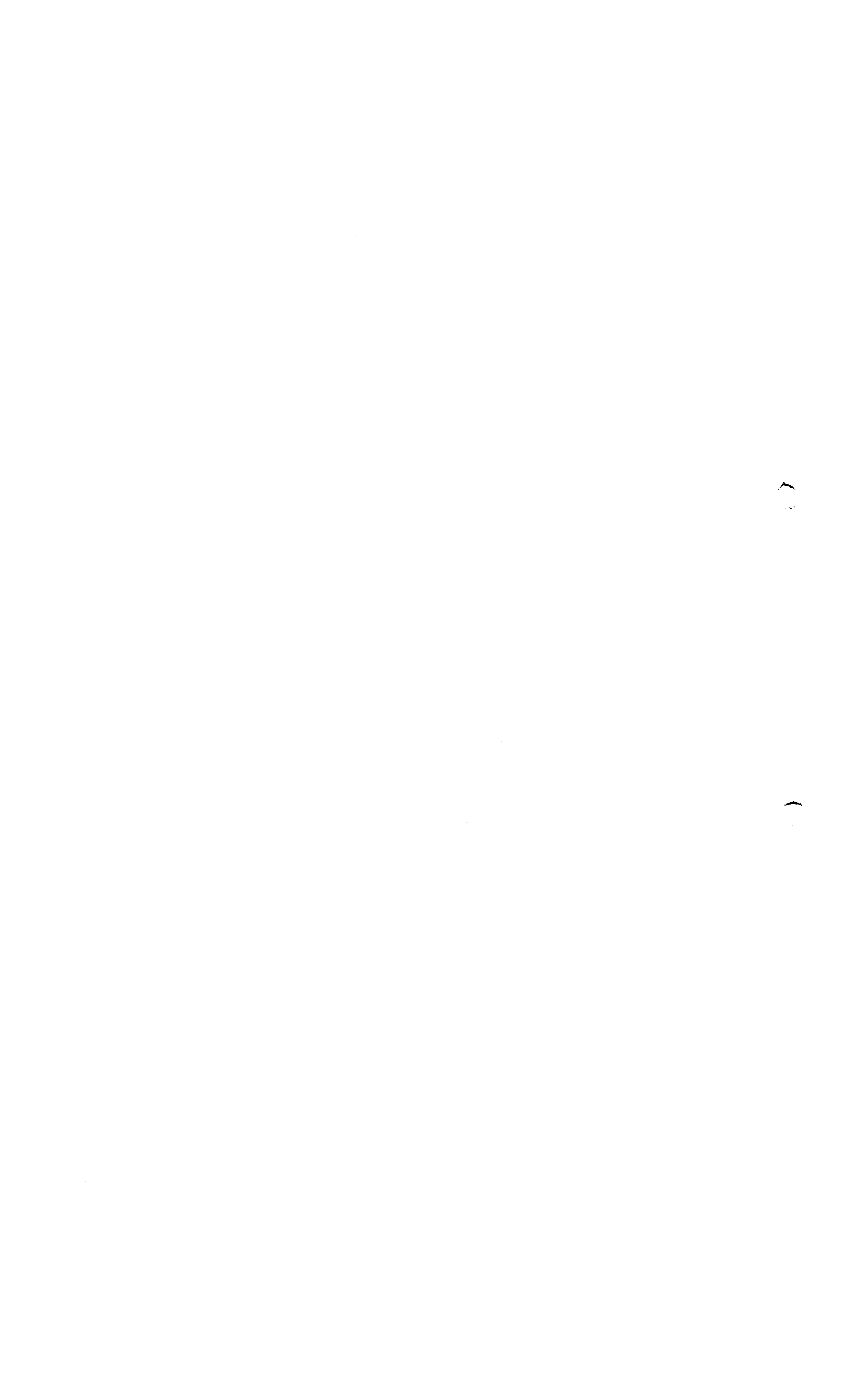




Tabla 1: Controles durante el proceso aplicados en la fermentación de *Corynebacterium diphtheriae* y en la cosecha de la toxina concentrada

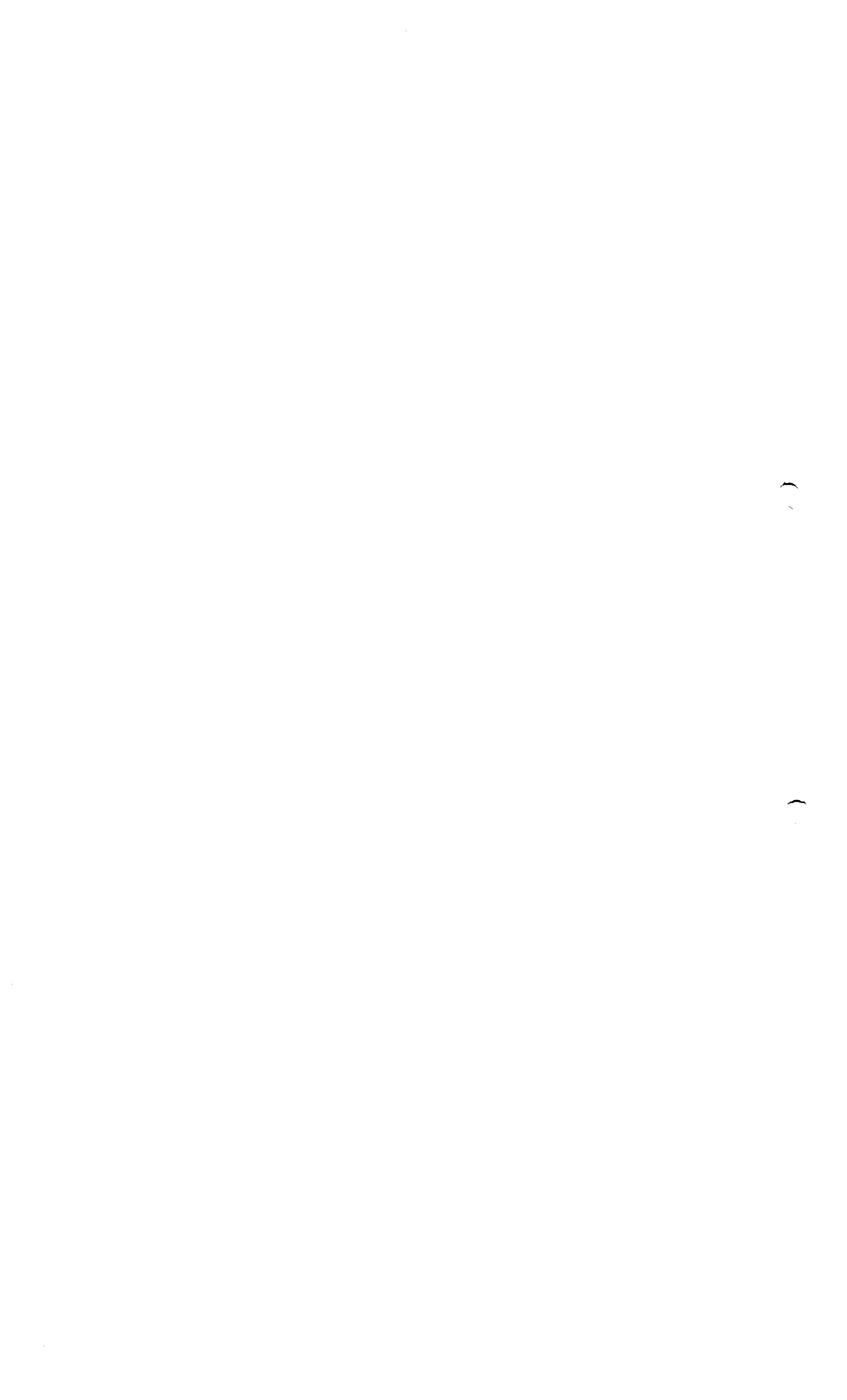
Pasos de elaboración	Controles durante el proceso		
	Pruebas	Criterios/límites de aceptación	Justificación
Etapa 2: 2º precultivo	Tinción de Gram (método interno)	Bacilos gram positivos	Controlar la pureza del cultivo
Etapa 3: 3er precultivo	Tinción de Gram (método interno)	Bacilos gram positivos	Controlar la pureza del cultivo
Etapa 4: Cultivo industrial	Tinción de Gram (método interno)	Bacilos gram positivos	Controlar la pureza del cultivo
	Pureza (Método interno)	Crecimiento en los diferentes medios seleccionados	Controlar la pureza del cultivo
	Título de floculación (Ph. Eur. 2.7.27, edición actual, prueba de Ramon)	≥ 80 Lf/mL	Estimar la producción de toxina y calcular la pureza antigénica
	Contenido de nitrógeno proteico (con base en la monografía 2.5.9 de la Ph. Eur., edición actual, método de Kjeldahl)	≤ 1 g/L	Determinar la pureza antigénica
Etapa 5: Cosecha 5c: Diafiltración	Título de floculación (Ph. Eur. 2.7.27, edición actual, prueba de Ramon)	≥ 700 Lf/mL	Asegurar las condiciones óptimas para el primer tratamiento químico y determinar la pureza antigénica
	Contenido de nitrógeno proteico (con base en la monografía 2.5.9 de la Ph. Eur. edición actual, método de Kjeldahl)	≤ 2 g/L	Determinar la pureza antigénica

3 Medios de cultivo, tampones y otros aditivos utilizados durante el cultivo celular y la cosecha

3.1 Caldo de tripcasa de soja

Éste es un caldo listo para usarse que contiene:

- Peptona de caseína
- Fosfato disódico





- Glucosa
- Cloruro de sodio
- Peptona de soja
- Agua purificada

3.2 Agar con sangre ovina

3.2.1 Composición del agar

- Agar base con sangre y triptosa
- Agua purificada

El agar se esteriliza con vapor caliente.

3.2.2 Agar con sangre ovina

El agar con sangre y triptosa se mezcla con agua purificada y esta preparación se esteriliza con vapor caliente. Luego, se le agrega 5% de sangre ovina desfibrinada al agar previamente enfriado a +45 °C a +50 °C. El agar con sangre preparado de esta manera se vacía en tubos previamente esterilizados con vapor a alta temperatura.

3.3 Medio IMD final

3.3.1 Composición del medio IMD final

- Medio IMD básico (1)
- Solución de maltosa y factores de crecimiento (2)

El medio IMD final se filtra a través de una membrana de 0,2 µm durante la transferencia al fermentador.

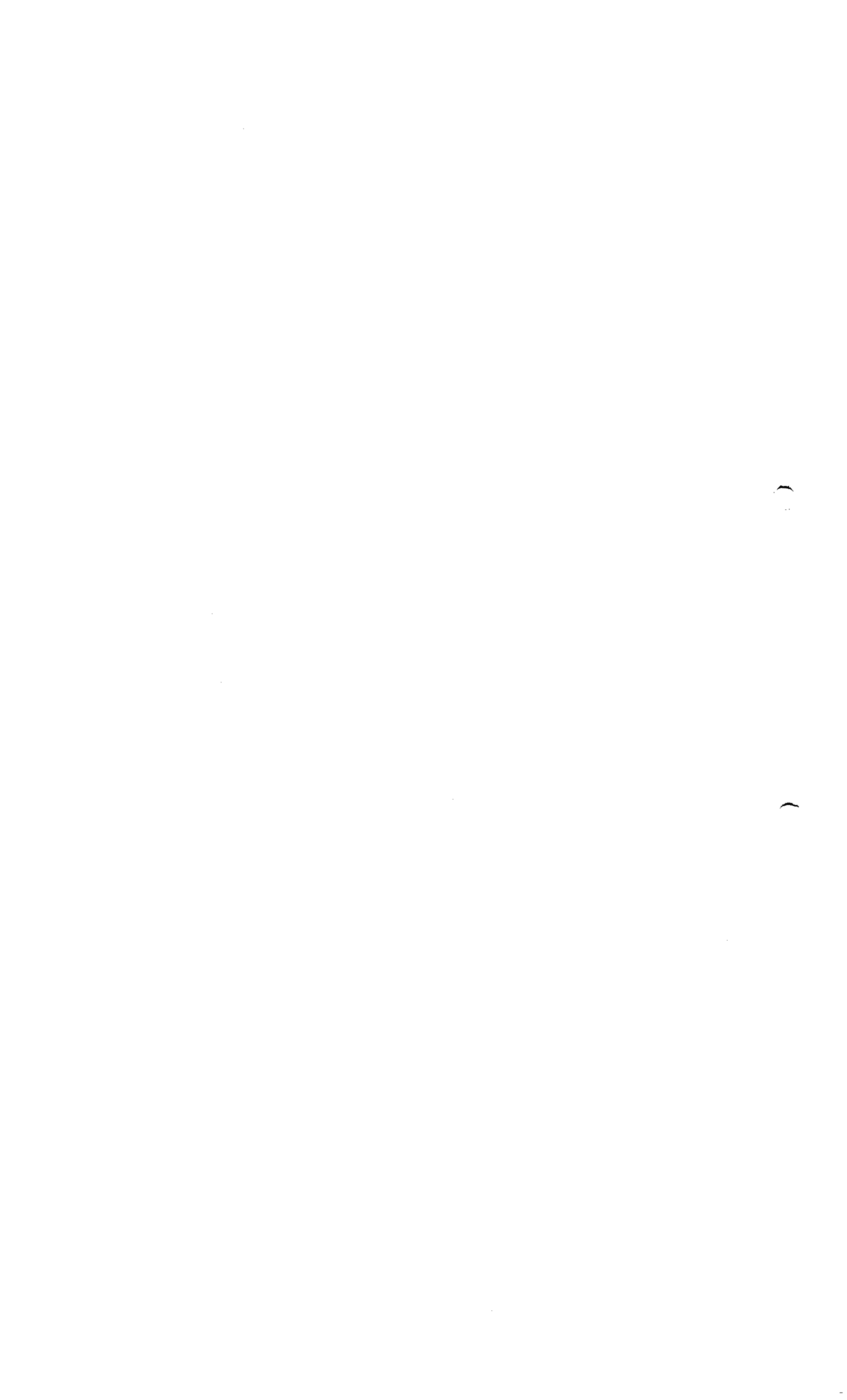
3.3.2 Medio IMD básico (1)

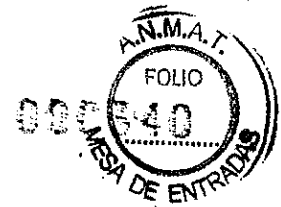
- Toxiprotona D
- Agua purificada

3.3.3 Solución de maltosa y factores de crecimiento (2)

3.3.3.1 Composición de la solución de maltosa y factores de crecimiento

- Extracto de levadura en polvo
- Sulfato de magnesio, 7H₂O





- Monohidrato de L-asparagina
- Lactato de sodio; se usa una de las dos soluciones siguientes:
 - Solución al 60 %
 - Solución al 50 %
- Solución de factores de crecimiento (3)
- Solución de maltosa (4)
- Agua purificada

3.3.3.2 Solución de factores de crecimiento (3)

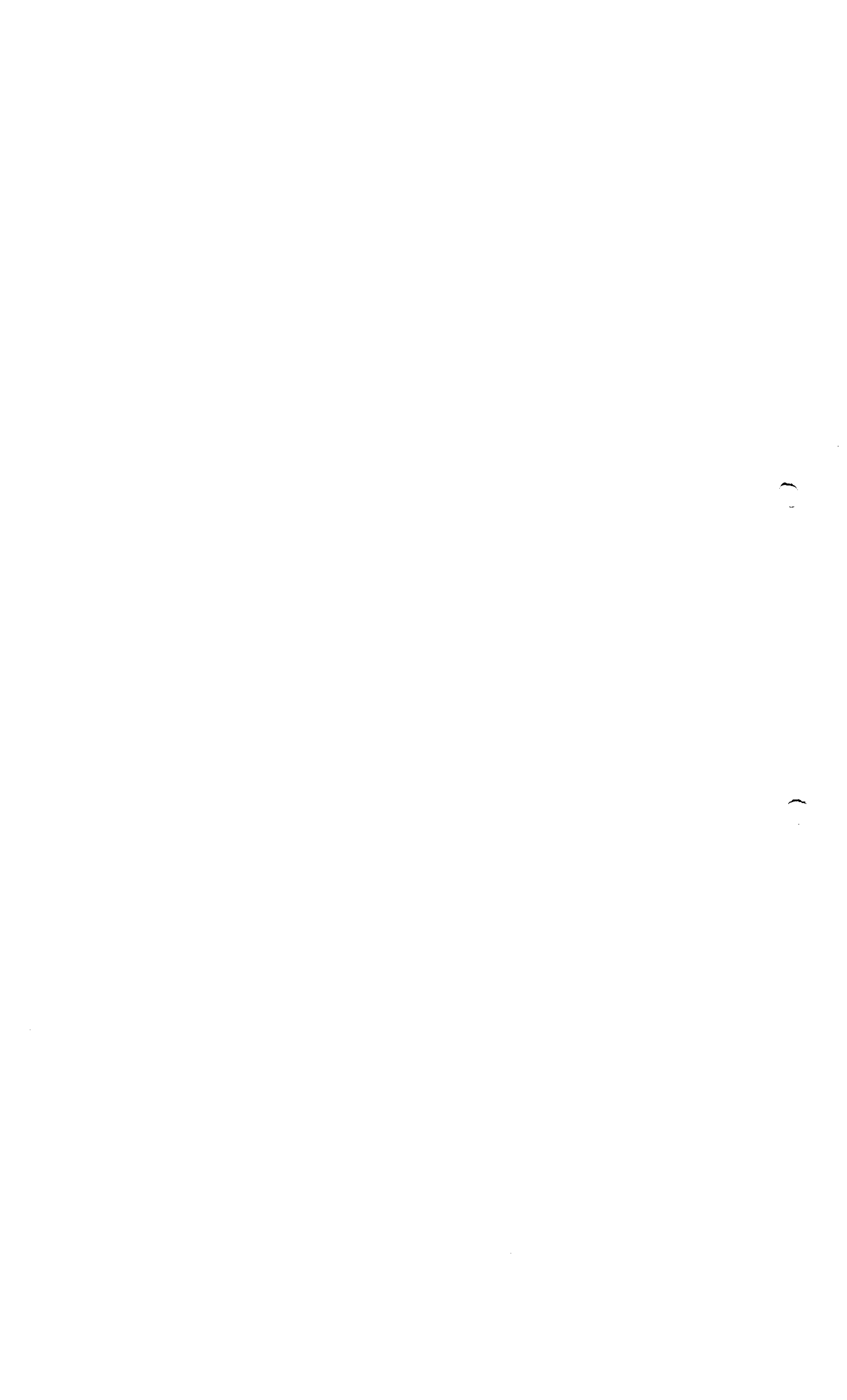
- Sulfato de magnesio $7H_2O$
- Beta alanina
- Ácido pimélico
- Sulfato de zinc $7H_2O$
- Cloruro de manganeso $4H_2O$
- Sulfato de cobre $5H_2O$
- Ácido nicotínico
- Ácido clorhídrico concentrado 10N
- Agua purificada

3.3.3.3 Solución de maltosa (4)

- Cloruro de calcio, $2H_2O$
- Fosfato disódico, $12H_2O$
- Maltosa
- Agua purificada

3.4 Dextrosa, aminoácidos y solución IMD

- Glucosa anhidra
- Beta ciclodextrina
- L-Histidina
- Monohidrato de L-asparagina
- L-Glutamina
- Ácido L-glutámico





- Piruvato de sodio
- NADH/DPNH
- Cisteína (clorhidrato) anhidra
- Ácido diaminopimélico
- Medio IMD
- Solución de maltosa y factores de crecimiento
- Agua purificada


La solución se filtra a través de una membrana de 0,2 µm durante la transferencia al fermentador.

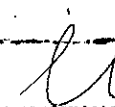
3.5 Tampón de fosfato

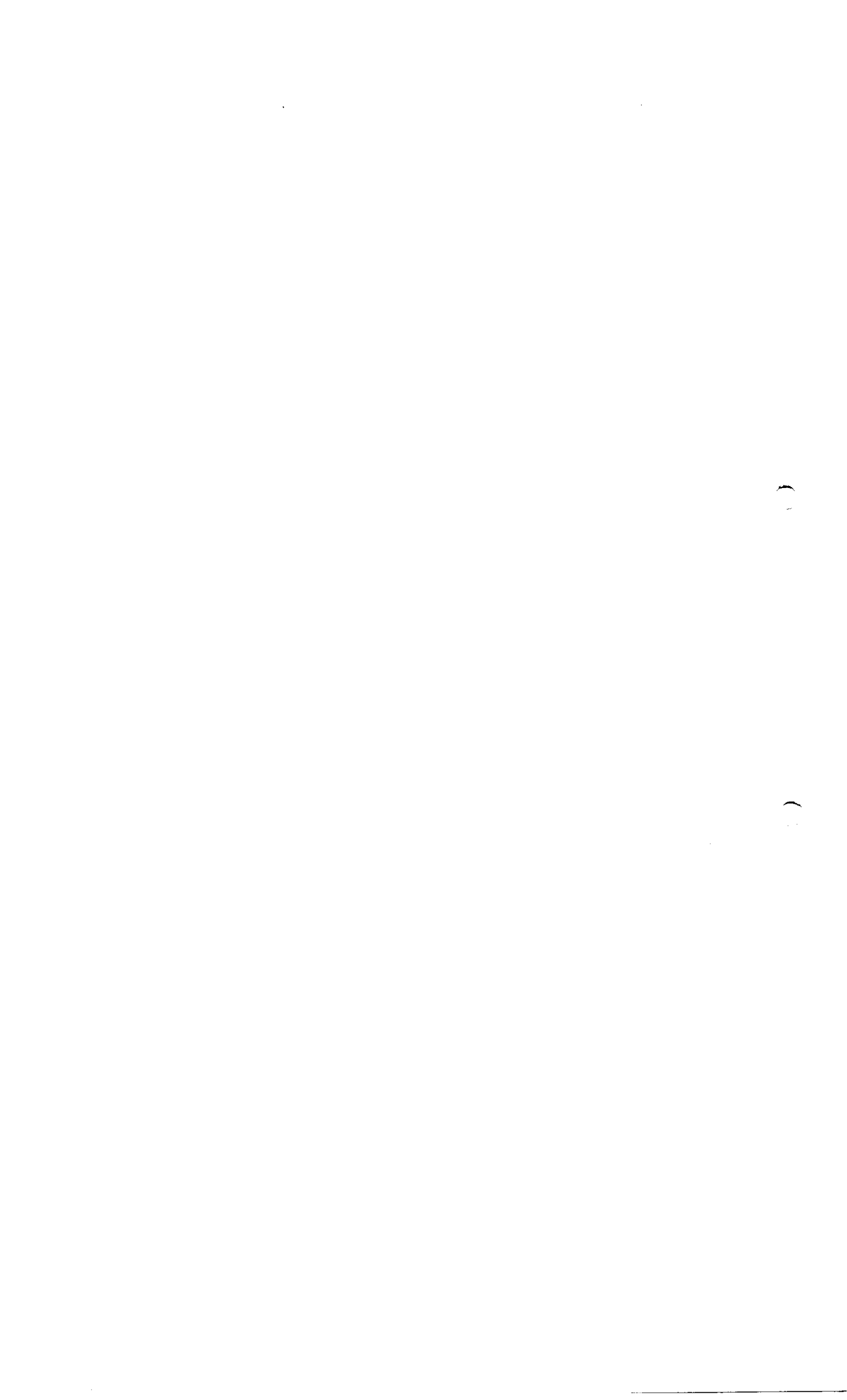
- Fosfato disódico, 12H₂O 10,58 g
- Dihidrogenofosfato de potasio 3,017 g
- Agua purificada hasta 1000 mL

3.6 Otros aditivos

Antiespumante de silicio


ROXANA MONTEMILONE DIRECTORA TÉCNICA SANOFI PASTEUR S.A.



CHRISTIAN DOMINGUEZ APODERADO SANOFI PASTEUR S.A.

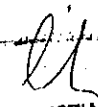


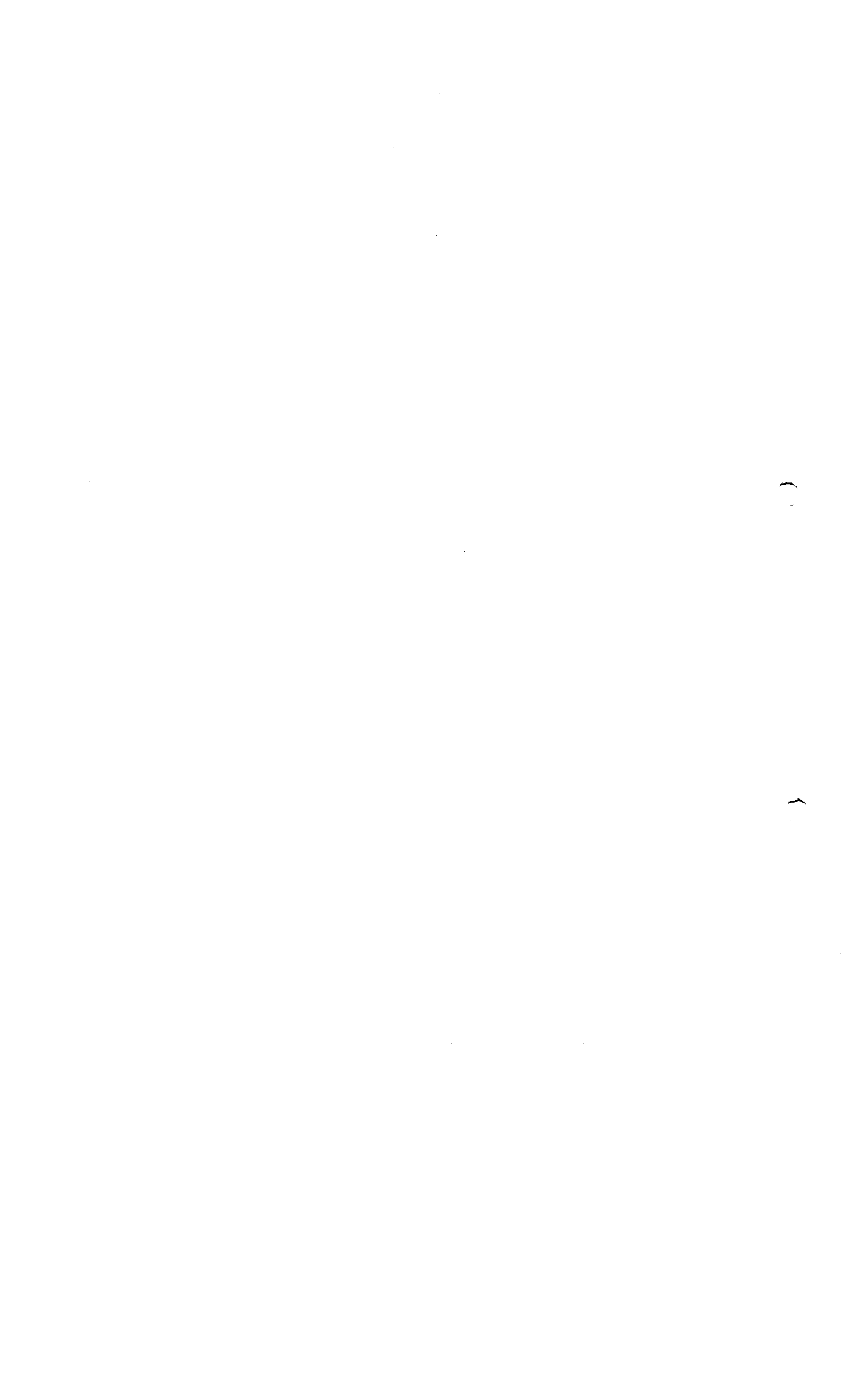


3.2.S.2.2

Reacciones de Purificación y Modificación - Diftérico


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.



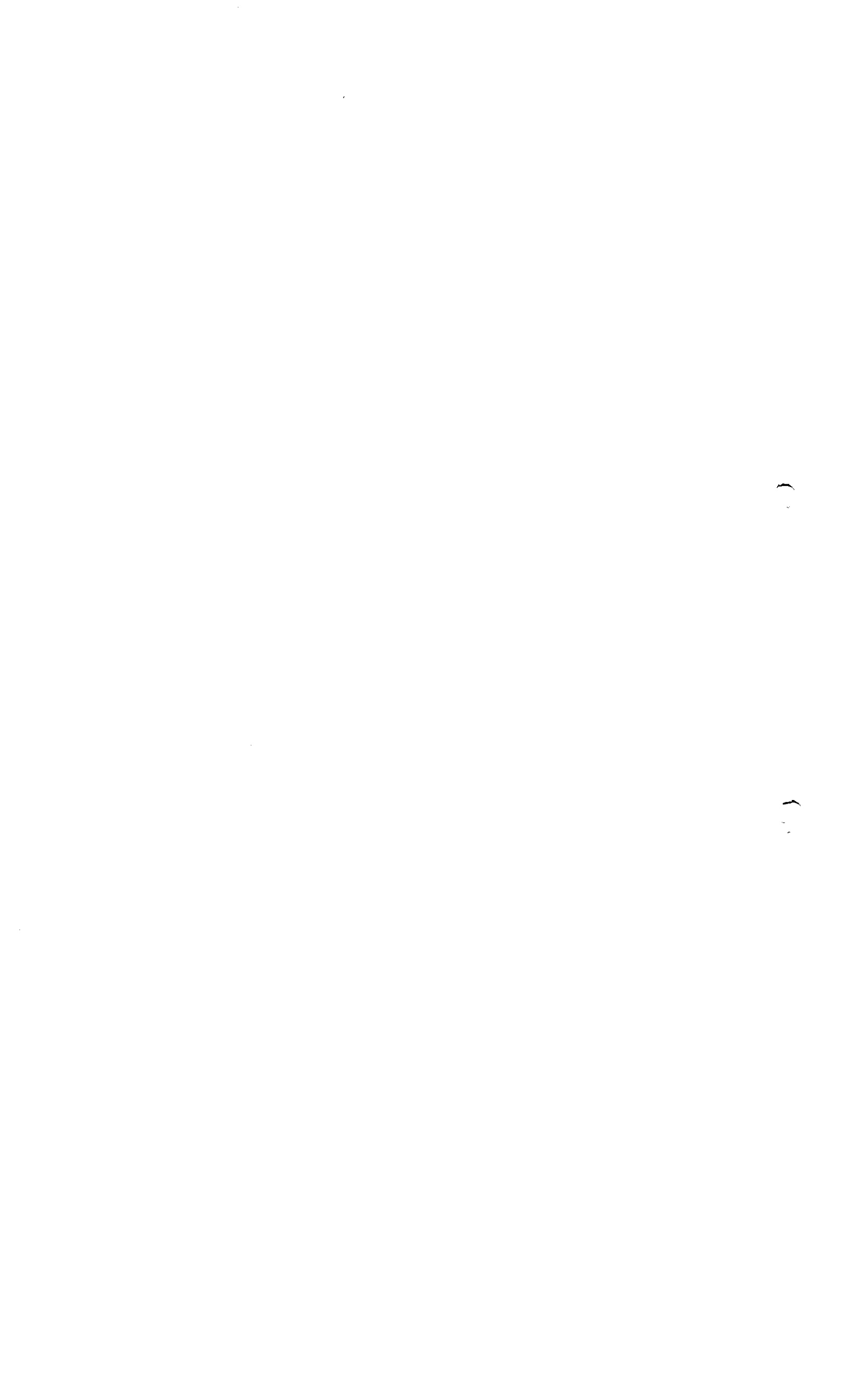


Sección 3.2.S.2.2 Descripción del proceso de elaboración y controles del proceso

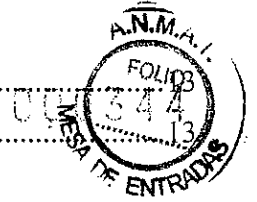
Reacciones de purificación y modificación

Índice

Lista de tablas	3
Lista de figuras	4
1 Tratamiento y detoxificación de la toxina cruda concentrada y diafiltrada	5
1.1 Panorama.....	5
1.2 Detoxificación de la toxina (etapas 6 y 7)	6
2 Producción de toxoide diftérico purificado.....	6
2.1 Proceso de purificación.....	7
2.1.1 Concentración y diafiltración (etapas 8 y 9).....	7
2.1.2 Ajuste del volumen (Etapa 10).....	8
2.1.3 Precipitación (etapas 11 y 12)	8
2.1.4 Diálisis (etapa 13).....	8
2.1.5 Prefiltración, estabilización, filtración y llenado (etapa 14).....	8
3 Condiciones de llenado y almacenamiento.....	9
3.1 Llenado	9
3.2 Almacenamiento	9
4 Controles durante el proceso.....	10
4.1 Detoxificación de la toxina diftérica.....	10
4.2 Purificación del toxoide diftérico.....	11
5 Tampones y aditivos empleados durante la purificación	12
5.1 Agua fisiológica tamponada	12
5.2 Solución de sales.....	12
5.3 Fosfato disódico	12
5.4 Tampón de fosfato	12

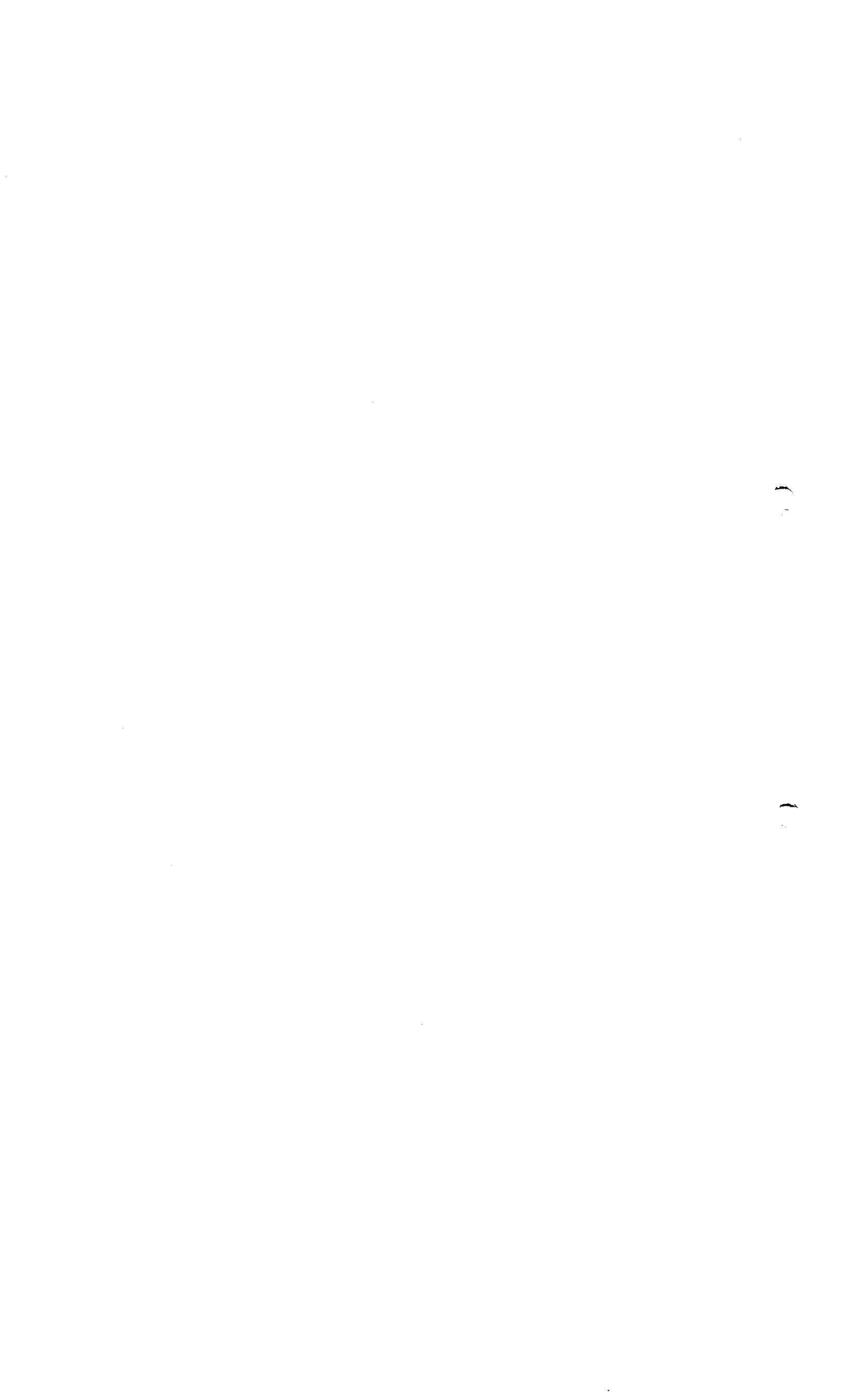


- 5.5 Carbonato de sodio
- 5.6 Otros aditivos




ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

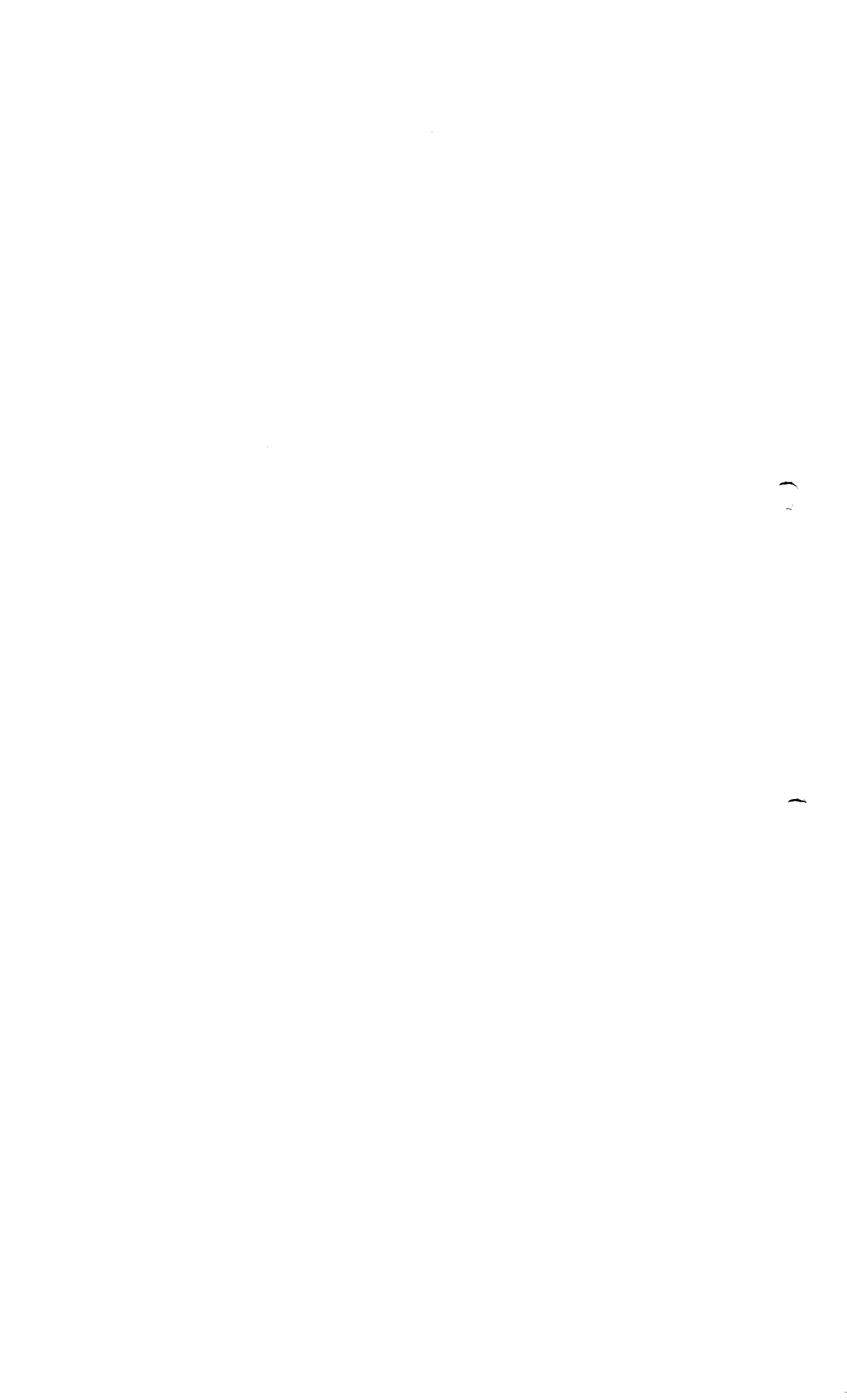

CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.





Lista de tablas

Tabla 1: Controles durante el proceso aplicados en la detoxificación de la toxina diftérica10
Tabla 2: Controles durante el proceso aplicados en la purificación del toxoide diftérico11





Lista de figuras

Figura 1: Preparación del toxoide diftérico crudo.....5
Figura 2: Panorama del proceso de purificación.....7


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.

)

)