

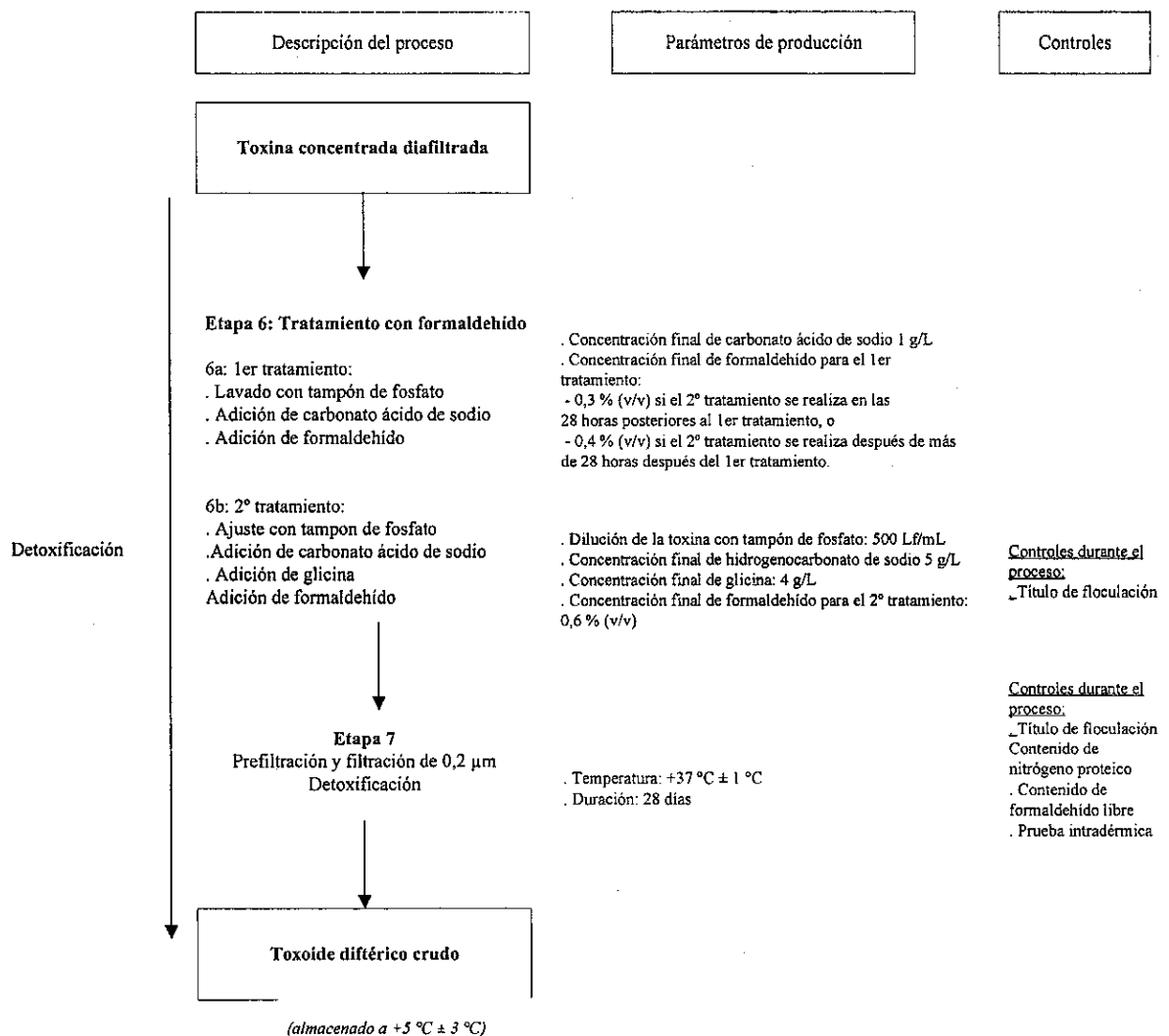
Lista de abreviaturas: vea la sección 2.3 Resumen general de calidad, Introducción.


1 Tratamiento y detoxificación de la toxina cruda concentrada y diafiltrada


1.1 Panorama

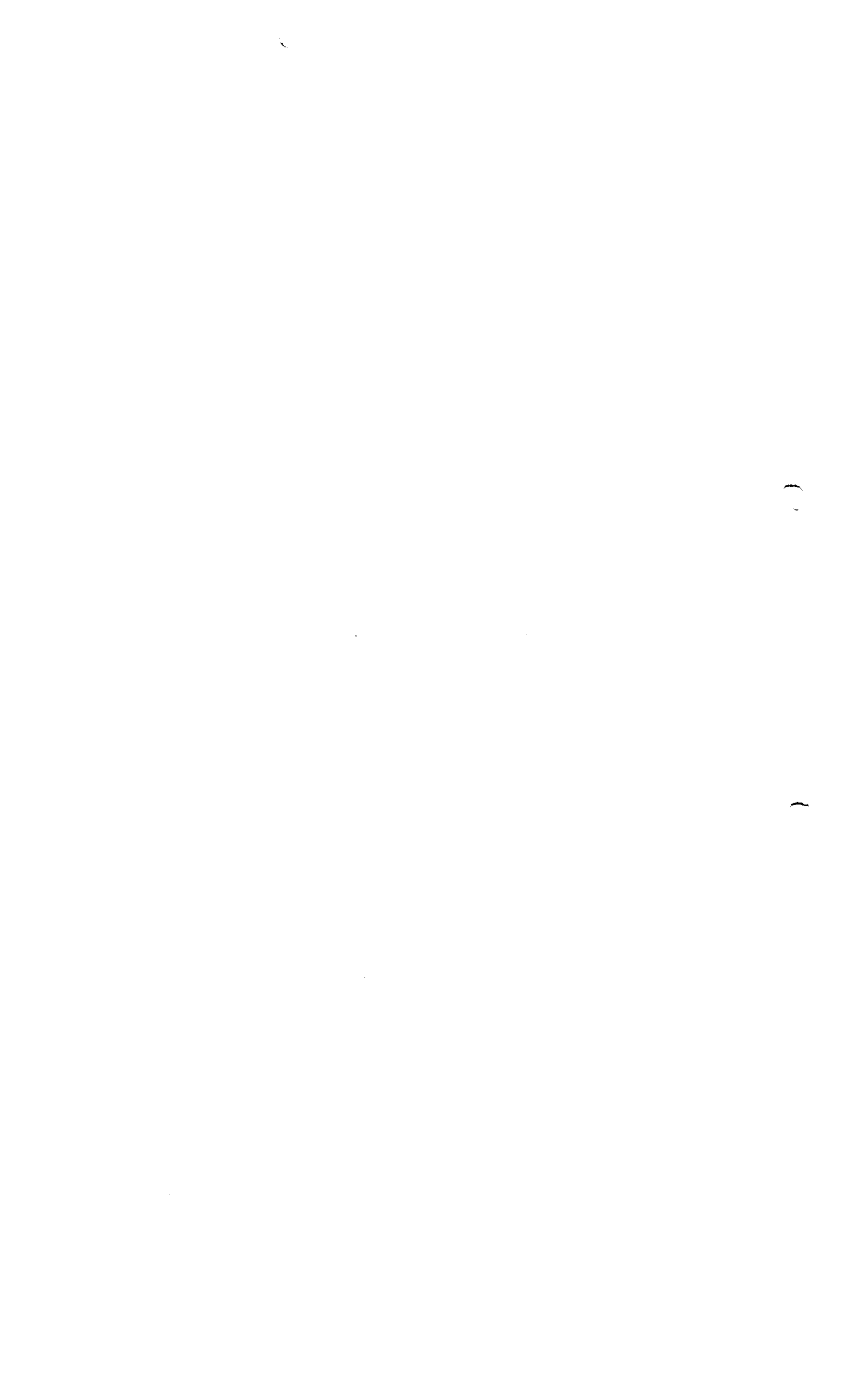
El esquema del proceso para la detoxificación de la toxina tetánica concentrada y diafiltrada (fin de la etapa 5.c) se proporciona en la figura 1 que aparece a continuación.

Figura 1: Preparación del toxoide diftérico crudo




ROXANA MONTEMILONE
 DIRECTORA TÉCNICA
 SANOFI PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DOMINGUEZ
 APODERADO
 SANOFI PASTEUR S.A.





1.2 Detoxificación de la toxina (etapas 6 y 7)

Al final de la diafiltración se detoxifica la toxina. La toxina se somete primero a un tratamiento químico y luego se lleva a cabo la detoxificación a $+37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ en presencia de formaldehído de acuerdo con la metodología descrita a continuación.

- Etapa 6a: Primer tratamiento: la toxina se diluye con tampón de fosfato. Se añade carbonato de hidrógeno de sodio para obtener una concentración final de 1 g/litro. Después se le agrega formaldehído al 0,4% (v/v) si el segundo tratamiento se lleva a cabo después de más de 28 horas después del primer tratamiento; si no, al 0,3% (v/v). Cada adición se realiza bajo condiciones de agitación.
- Etapa 6b: Segundo tratamiento: se realiza entre 24 y 48 horas después del primero. La toxina se diluye con tampón de fosfato hasta aproximadamente 500 Lf/mL. Después se agregan carbonato de hidrógeno de sodio y glicina para obtener la concentración final respectiva de 5 g/litro y 4 g/litro. Por último, se añade formaldehído para obtener una concentración final de 0,6 % (v/v). Cada adición se realiza bajo condiciones de agitación.
- Etapa 7: La solución se prefiltra y se filtra a través de una membrana de 0,2 μm dentro de un tanque. La detoxificación se efectúa bajo condiciones de agitación durante 28 días a $+37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

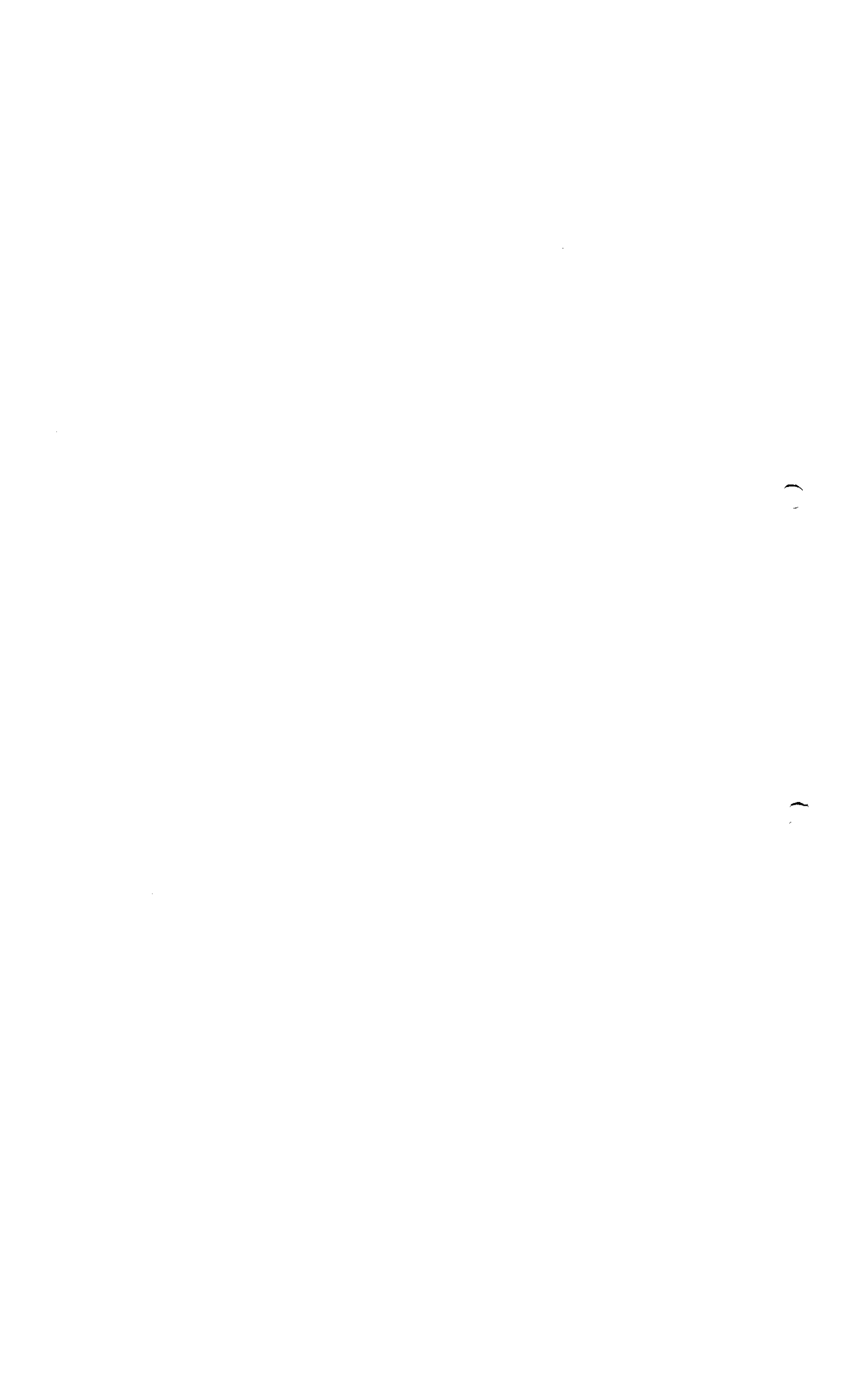
Luego de 28 días, el toxoide diftérico crudo se enfría a $+5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ bajo condiciones de agitación. El tanque que contiene el CDT se mantiene bajo enfriamiento hasta su transporte al edificio de purificación. Se toman muestras para los controles durante el proceso (ver capítulo 4.1).

El CDT se puede almacenar a $+5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta 4 meses. Los detalles sobre el almacenamiento del CDT se describen en la sección 3.2.S.2.4 Control de los pasos críticos e intermedios.

2 Producción de toxoide diftérico purificado

Después se purifica el toxoide diftérico crudo (CDT) obtenido mediante los procesos de fermentación, cosecha y detoxificación.

El diagrama de flujo del proceso para la purificación del toxoide diftérico se proporciona en la figura 2 que aparece a continuación.



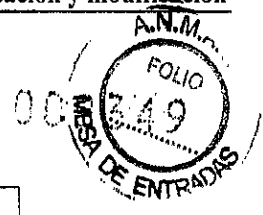
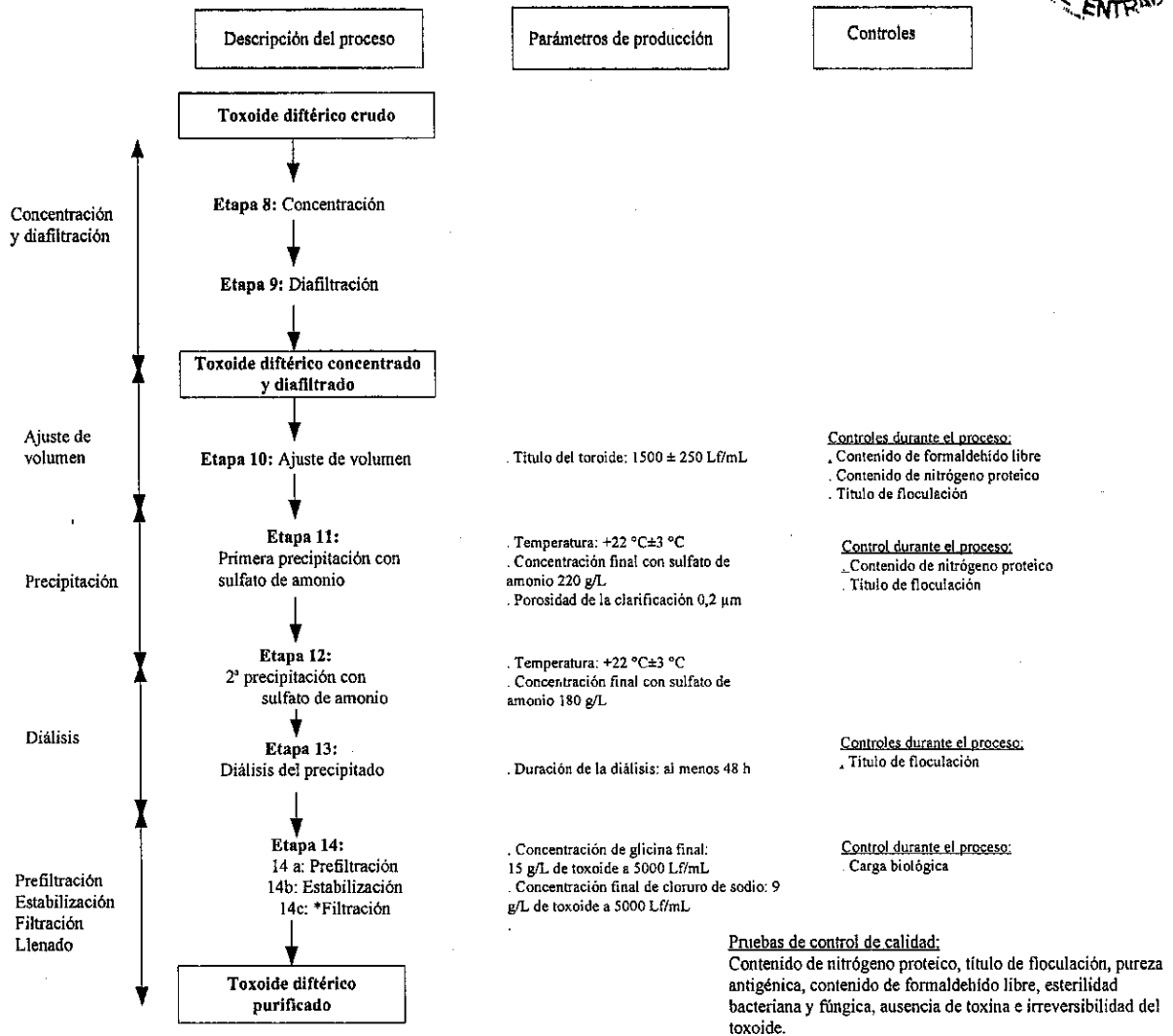


Figura 2: Panorama del proceso de purificación



2.1 Proceso de purificación

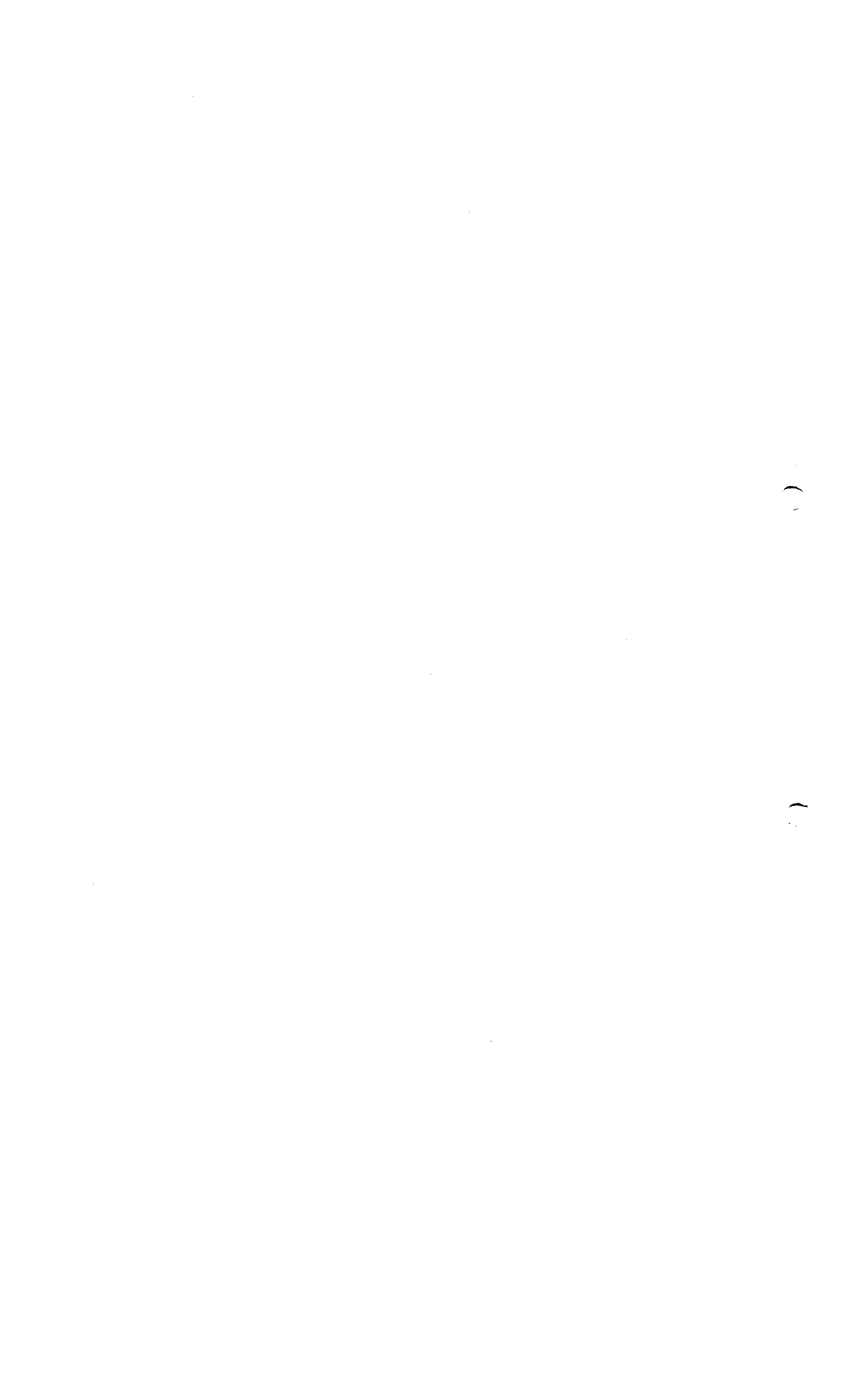
2.1.1 Concentración y diafiltración (etapas 8 y 9)

- Etapa 8: Concentración

La concentración se realiza bajo condiciones de enfriamiento por medio de un módulo de ultrafiltración hasta llegar a un volumen objetivo de 30 litros a 70 litros.

- Etapa 9: Diafiltración

Luego se diafiltra el concentrado obtenido bajo condiciones de enfriamiento con agua fisiológica tamponada (vea el capítulo 5.1).





2.1.2 Ajuste del volumen (Etapa 10)

- Etapa 10: El volumen de toxoide tetánico concentrado y diafiltrado se ajusta con agua fisiológica tamponada (ver capítulo 5.1) para alcanzar una concentración de 1500 ± 250 Lf/mL.

Se toman muestras para los controles durante el proceso (ver capítulo 4.2).

2.1.3 Precipitación (etapas 11 y 12)

La purificación del toxoide diftérico se lleva a cabo mediante precipitación con sulfato de amonio, que se compone de dos etapas sucesivas de precipitación.

- Etapa 11: Primera precipitación con sulfato de amonio

En el tanque que contiene el volumen ajustado de toxoide diftérico concentrado y diafiltrado, el producto se conserva a temperatura ambiente. Luego, se añade sulfato de amonio bajo condiciones de agitación hasta una concentración de 220 g/litro.

Tras una fase de agitación, se inicia una fase de decantación a temperatura ambiente.

Se toma una muestra para los controles durante el proceso (ver capítulo 4.2).

- Etapa 12: Segunda precipitación con sulfato de amonio

Se agrega el sulfato de amonio bajo condiciones de agitación hasta llegar a 180 g/litro.

Tras una fase de agitación, se inicia una fase de decantación a temperatura ambiente.

Tras el período de decantación, el precipitado se recolecta mediante centrifugación y vuelve a suspenderse en agua purificada.

2.1.4 Diálisis (etapa 13)

- Etapa 13: Diálisis del precipitado (eliminación de las sales de sulfato de amonio).

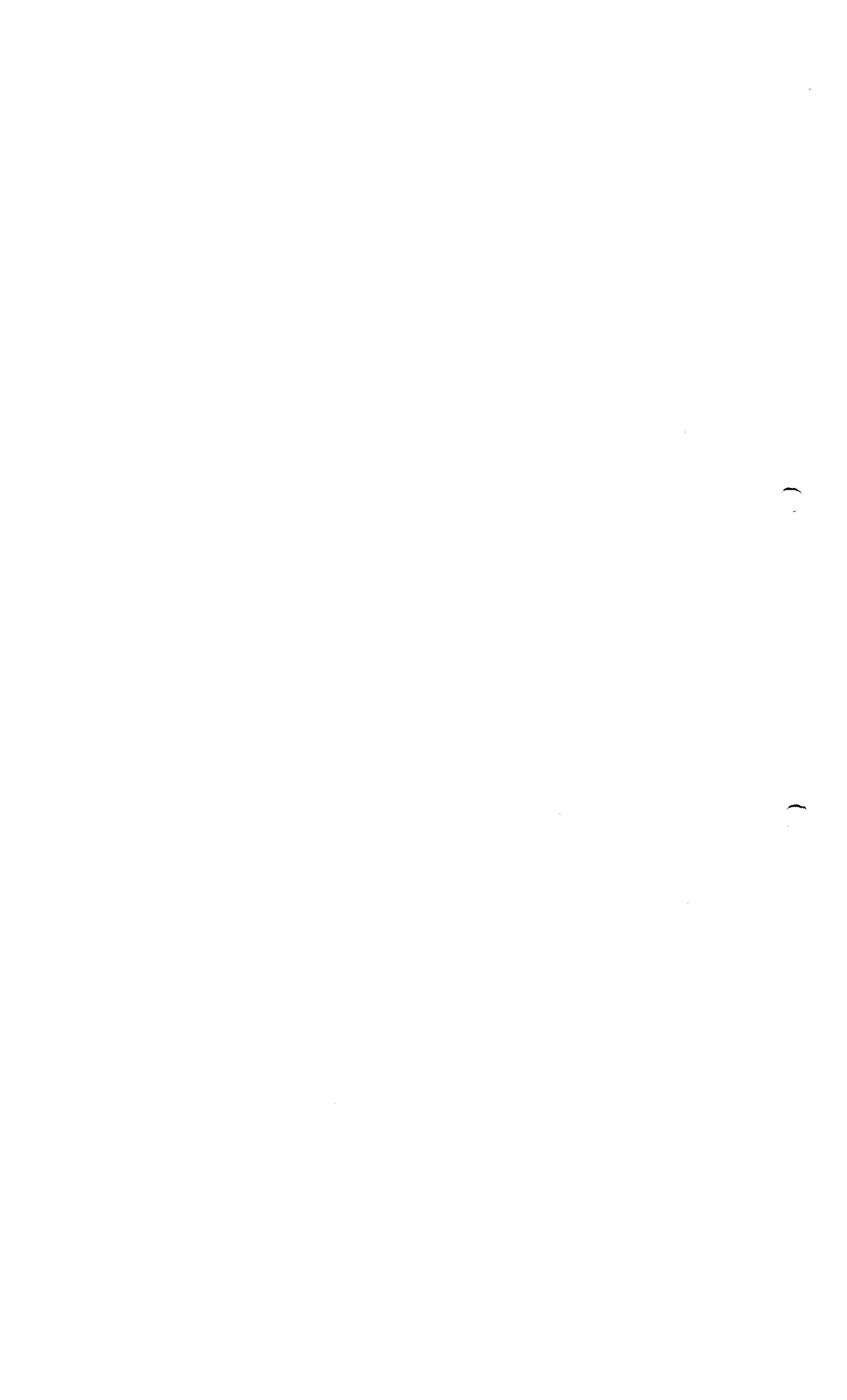
El precipitado disuelto previamente obtenido se vierte en las membranas de diálisis. La diálisis se realiza con agua purificada durante un mínimo de 48 horas.

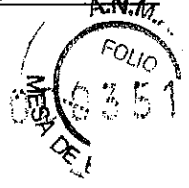
2.1.5 Prefiltración, estabilización, filtración y llenado (etapa 14)

- Etapa 14a: La solución de toxoide obtenida después de la diálisis se prefiltra a través de una membrana de $0,2 \mu\text{m}$.
- Etapa 14b: Se agrega cloruro de sodio y glicina como estabilizantes.

Se toman muestras para un control durante el proceso (vea el capítulo 4.2).

- Etapa 14c: La solución, filtrada a través de un filtro con poros de $0,2 \mu\text{m}$, constituye el toxoide diftérico purificado (PDT), que se almacena a $+5^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$ (vea la sección 3.2.S.7.1 Resumen de estabilidad y conclusiones).





3 Condiciones de llenado y almacenamiento

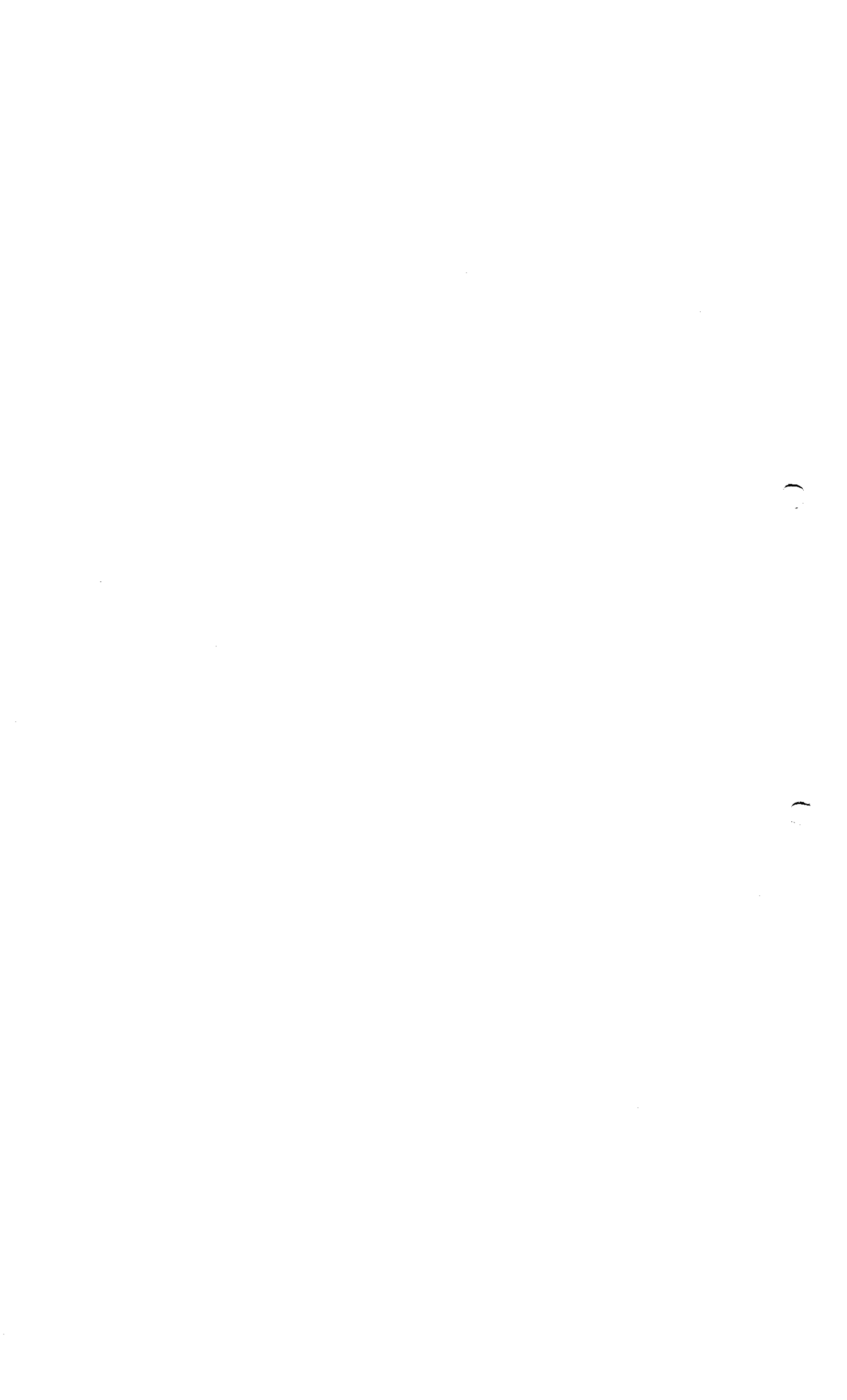
3.1 Llenado

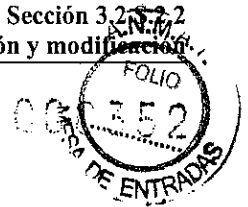
El PDT se distribuye para almacenarlo en matraces de polipropileno (vea la sección 3.2.S.6 Sistema de cierre del envase).

Durante el llenado, se toman muestras para los controles de calidad. En la sección 3.2.S.4.1 Especificaciones aparece una lista de las pruebas de liberación realizadas al PDT.

3.2 Almacenamiento

El principio activo PDT se puede almacenar a $+5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 36 meses (vea la sección 3.2.S.7.1 Resumen y conclusiones sobre la estabilidad).





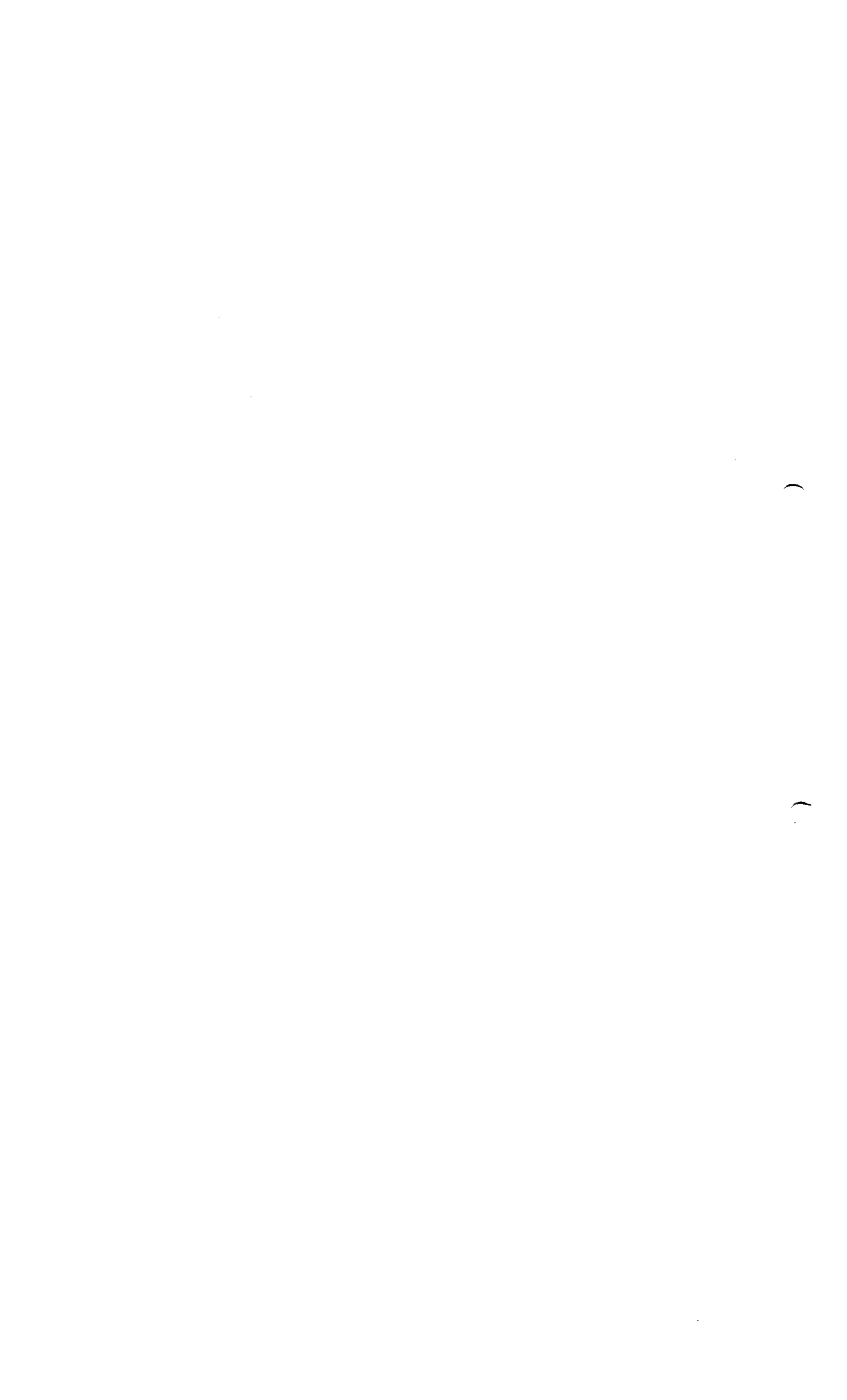
4 Controles durante el proceso

4.1 Detoxificación de la toxina diftérica

Los controles durante el proceso aplicados durante la detoxificación de la toxina diftérica se presentan en la tabla 1.

Tabla 1: Controles durante el proceso aplicados en la detoxificación de la toxina diftérica

Pasos de elaboración	Controles durante el proceso		
	Pruebas	Criterios de aceptación	Justificaciones
Etapa 6b: Segundo tratamiento	Título de floculación (Ph. Eur. 2.7.27, edición vigente, prueba de Ramon)	$\leq 500 \pm 50$ Lf/mL	Asegurar las condiciones óptimas para la detoxificación
Etapa 7: Prefiltración, filtración y detoxificación	Título de floculación (Ph. Eur. 2.7.27, edición vigente, prueba de Ramon)	Para información	Determinar la pureza antigénica
	Contenido de nitrógeno proteico (con base en la monografía 2.5.9 de la Ph. Eur. edición vigente, método de Kjeldahl)	≤ 1.5 g/Litro	
	Contenido de formaldehído libre (con base en la monografía 2.4.18 de la Ph. Eur. edición vigente, método de Nash)	≤ 2500 µg/mL	Seguir el proceso de detoxificación
	Prueba intradérmica (método interno)	No se observa reacción eritematosa ni necrótica	Verificar la ausencia de toxina



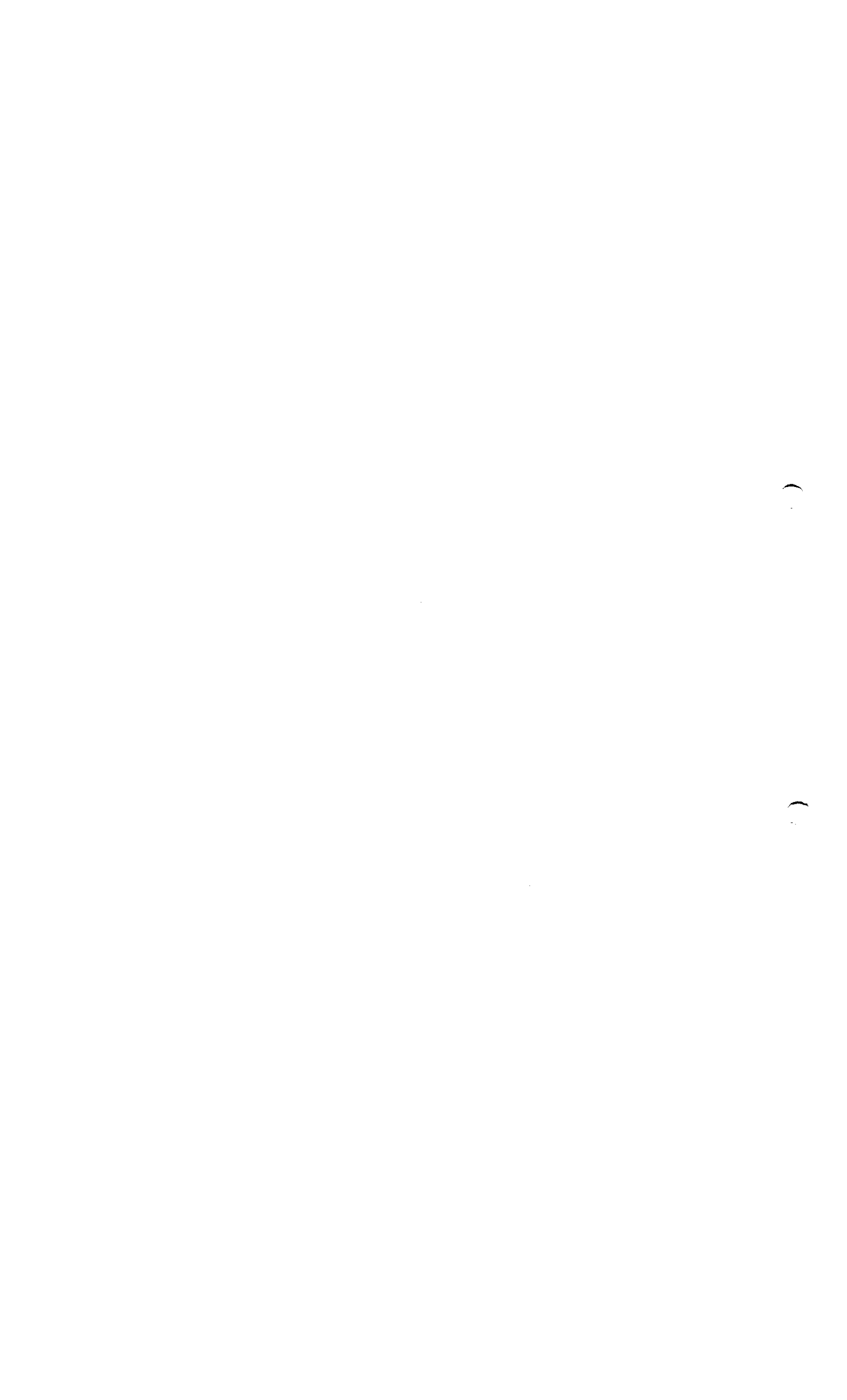


4.2 Purificación del toxoide diftérico

Los controles durante el proceso aplicados durante la purificación de la toxina tetánica se presentan en la tabla 2.

Tabla 2: Controles durante el proceso aplicados en la purificación del toxoide diftérico

Pasos de elaboración	Controles durante el proceso		
	Pruebas	Criterios de aceptación	Justificaciones
Etapa 10: Ajuste del volumen	Contenido de formaldehído libre (con base en la monografía 2.4.18 de la Ph. Eur. edición vigente, método de Nash)	$\leq 150 \mu\text{g/mL}$	Dar seguimiento a la eliminación de formaldehído
	Contenido de nitrógeno proteico (con base en la monografía 2.5.9 de la Ph. Eur. edición vigente, método de Kjeldahl)	$\leq 2.5 \text{ g/Litro}$	Determinar la pureza antigénica
	Título de floculación (Ph. Eur. 2.7.27, edición vigente, prueba de Ramon)	$\leq 1500 \pm 50 \text{ Lf/ml}$	
Etapa 11b: Clarificación	Contenido de nitrógeno proteico (con base en la monografía 2.5.9 de la Ph. Eur. edición vigente, método de Kjeldahl)	$\leq 3 \text{ g/Litro}$	Determinar la pureza antigénica
	Título de floculación (Ph. Eur. 2.7.27, edición vigente, prueba de Ramon)	Para información	
Etapa 13: Diálisis	Título de floculación (Ph. Eur. 2.7.27, edición vigente, prueba de Ramon)	Para información	Preparar una solución final de toxoide a 5000 Lf/mL
Etapa 14a: Prefiltración	Carga bacteriana (antes de la filtración) (Ph. Eur. 2.6.12, edición actual)	$\leq 50 \text{ UFC/mL}$	Evaluar la biocontaminación antes de la filtración.





5 Tampones y aditivos empleados durante la purificación

5.1 Agua fisiológica tamponada

Composición por litro

- Cloruro de sodio
- Fosfato disódico $12\text{H}_2\text{O}$
- Fosfato de sodio $2\text{H}_2\text{O}$
- Agua purificada

Esta solución se filtra en una membrana de $0,2\ \mu\text{m}$.

5.2 Solución de sales

La fórmula de esta solución es variable; depende del volumen y del título de floculación del toxoide diftérico concentrado y dializado obtenido después del paso de diálisis.

Composición por litro

- Glicina
- Cloruro de sodio
- Agua purificada

Esta solución se filtra en una membrana de $0,2\ \mu\text{m}$.

5.3 Fosfato disódico

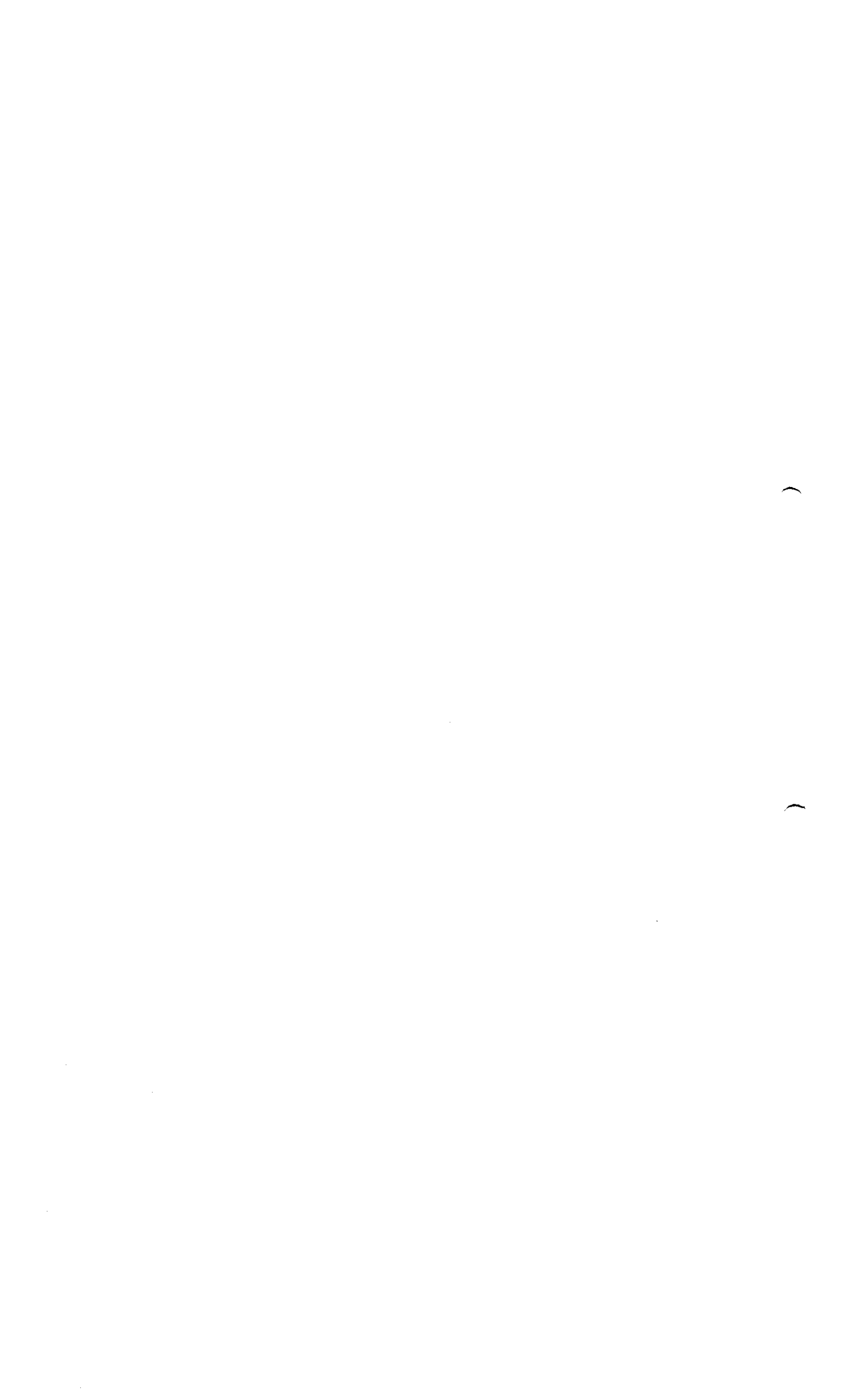
Composición por litro

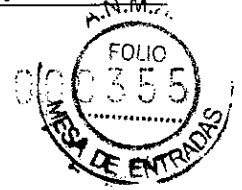
- Fosfato disódico, $12\text{H}_2\text{O}$
- Agua purificada

La solución se filtra en una membrana de $0,2\ \mu\text{m}$.

5.4 Tampón de fosfato

- Fosfato disódico, $12\text{H}_2\text{O}$
- Fosfato de potasio dihidrogenado
- Agua purificada





5.5 Carbonato de sodio

- Carbonato de sodio, 10H₂O
- Agua purificada

5.6 Otros aditivos

- Sulfato de amonio
- Formaldehído
- Glicina

