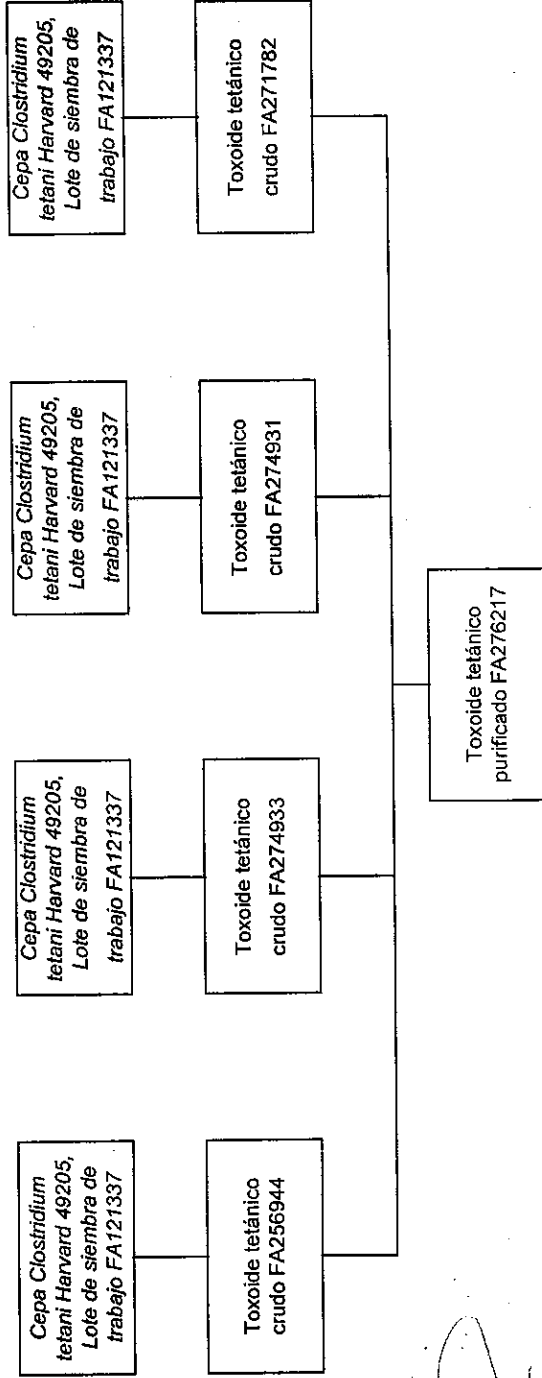


sanofi pasteur  
Toxoides tetánico purificado

Figura 2: Ejemplo de la numeración de los lotes

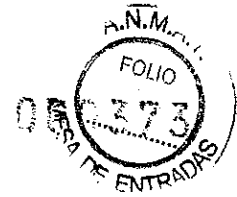


ROXANA MONTEMILONE  
DIRECTORA TÉCNICA  
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMÍNGUEZ  
APODERADO  
SANOFI PASTEUR S.A.







**3.2.S.2.2**

**Cultivo Celular y Cosecha - Tetánico**

  
ROXANA MONTEMILONE  
DIRECTORA TÉCNICA  
SANOFI PASTEUR S.A.

  
CHRISTIAN DOMINGUEZ  
APODERADO  
SANOFI PASTEUR S.A.





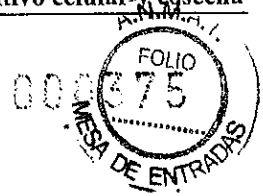
## Sección 3.2.S.2.2 Descripción del proceso de elaboración y de los controles del proceso

### Cultivo celular y cosecha

#### Índice

Lista de tablas .....	2
Lista de figuras .....	3
<b>1 Fermentación del <i>Clostridium tetani</i> y cosecha de la toxina tetánica.....</b>	<b>4</b>
1.1 Fermentación de <i>Clostridium tetani</i> .....	6
1.1.1 Preparación del inóculo y del subcultivo (etapa 1).....	6
1.1.2 Amplificación del cultivo .....	6
1.1.3 Cultivo industrial (etapa 5).....	7
1.2 Lisis celular (etapa 6).....	7
1.3 Cosecha de la toxina tetánica (etapa 7).....	7
<b>2 Controles durante el proceso.....</b>	<b>8</b>
2.1 Panorama de los controles durante el proceso aplicados en la fermentación de <i>Clostridium tetani</i> y en la cosecha de la toxina tetánica.....	8
<b>3 Medios de cultivo, tampones y otros aditivos utilizados durante el cultivo celular y la cosecha.....</b>	<b>9</b>
3.1 Medio de tioglicolato y resazurina.....	9
3.2 Medio Massachusetts.....	9
3.3 Otros.....	10





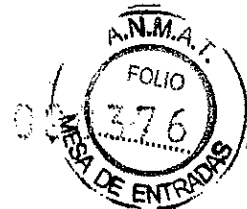
### Lista de tablas

Tabla 1: Panorama de los controles durante el proceso aplicados en la fermentación de *Clostridium tetani* y en la cosecha de la toxina tetánica .....8

  
ROXANA MONTEMILONE  
DIRECTORA TÉCNICA  
SANOFI PASTEUR S.A.

  
CHRISTIAN DOMÍNGUEZ  
APODERADO  
SANOFI PASTEUR S.A.



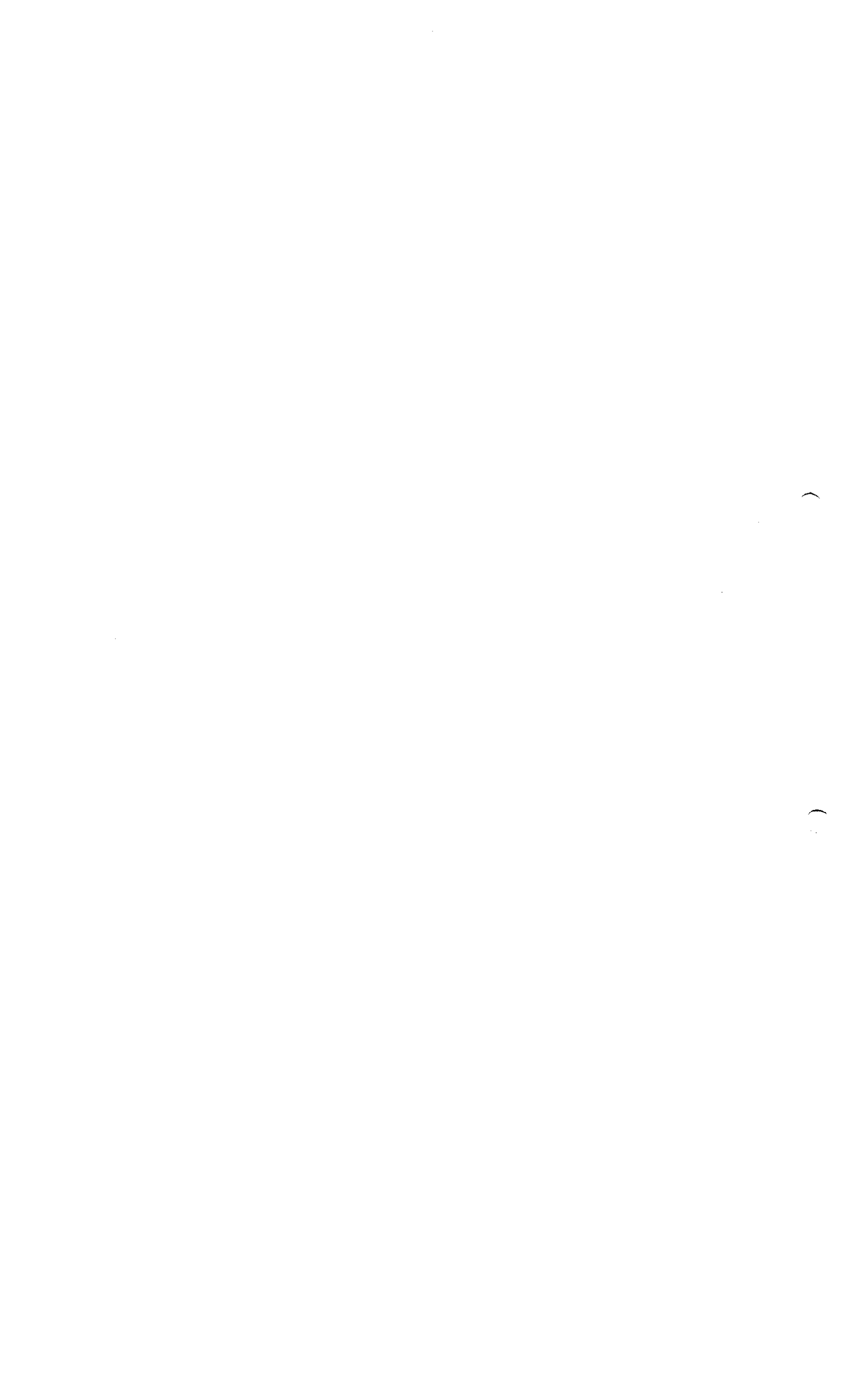


## Lista de figuras

Figura 1: Preparación de la toxina tetánica concentrada y diafiltrada .....5

  
ROXANA MONTEMILONE  
DIRECTORA TÉCNICA  
SANOFI PASTEUR S.A.

  
CHRISTIAN DOMINGUEZ  
APODERADO  
SANOFI PASTEUR S.A.





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

Lista y descripción de los materiales y equipos utilizados durante este proceso de elaboración. vea la sección 3.2.A.1 Instalaciones y equipo.

El proceso de elaboración que se describe a continuación se completa mediante los programas de validación presentados en la sección 3.2.S.2.5 Validación y/o evaluación del proceso con estudios sobre los parámetros de producción (los que se presentan aquí y otros) y sobre los controles durante el proceso.

## 1 Fermentación del *Clostridium tetani* y cosecha de la toxina tetánica

El esquema del proceso para la fermentación del *Clostridium tetani* y la cosecha de la toxina tetánica se presenta en la **figura 1**.

El tamaño del lote industrial de fermentación es de 2400L.

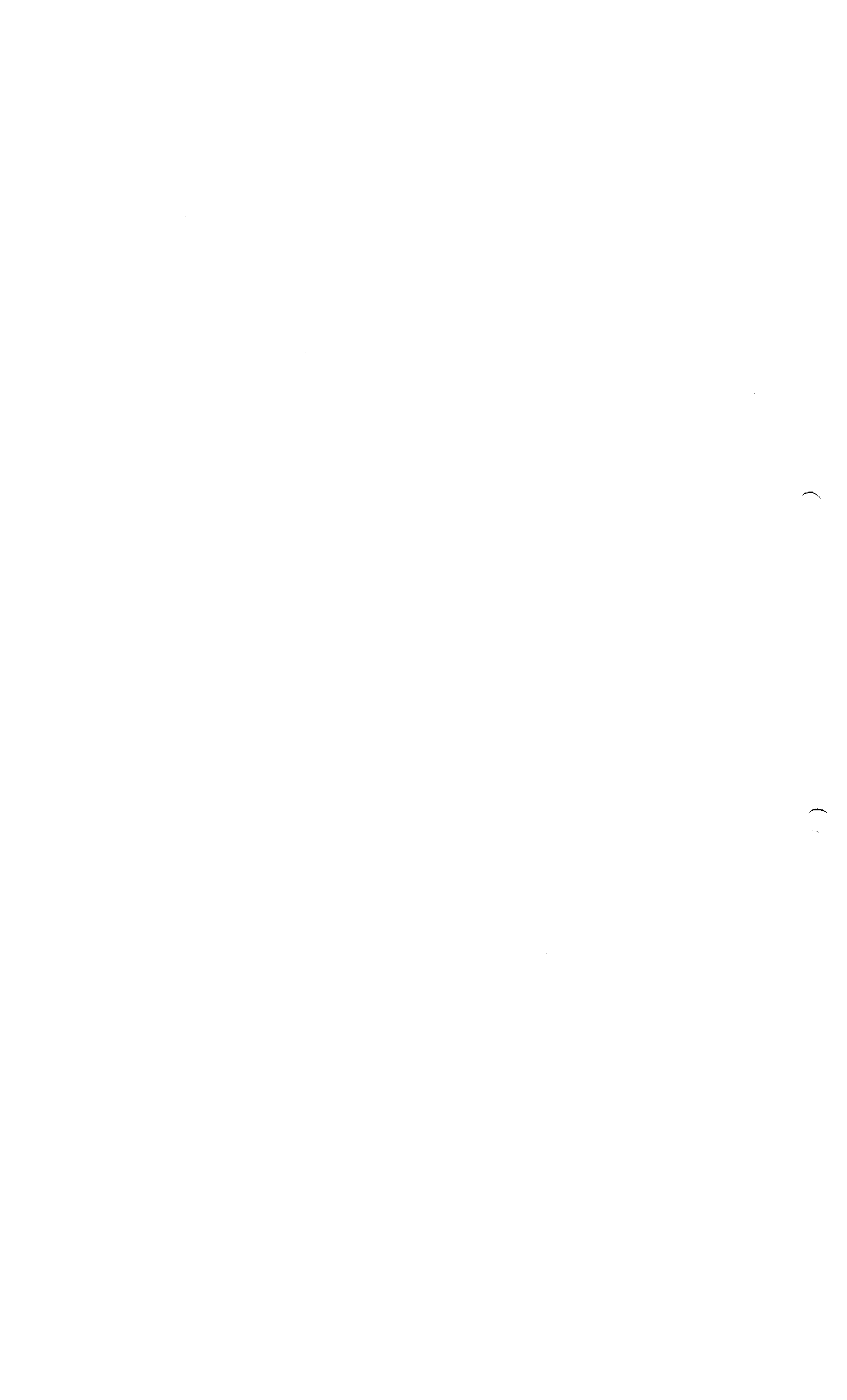
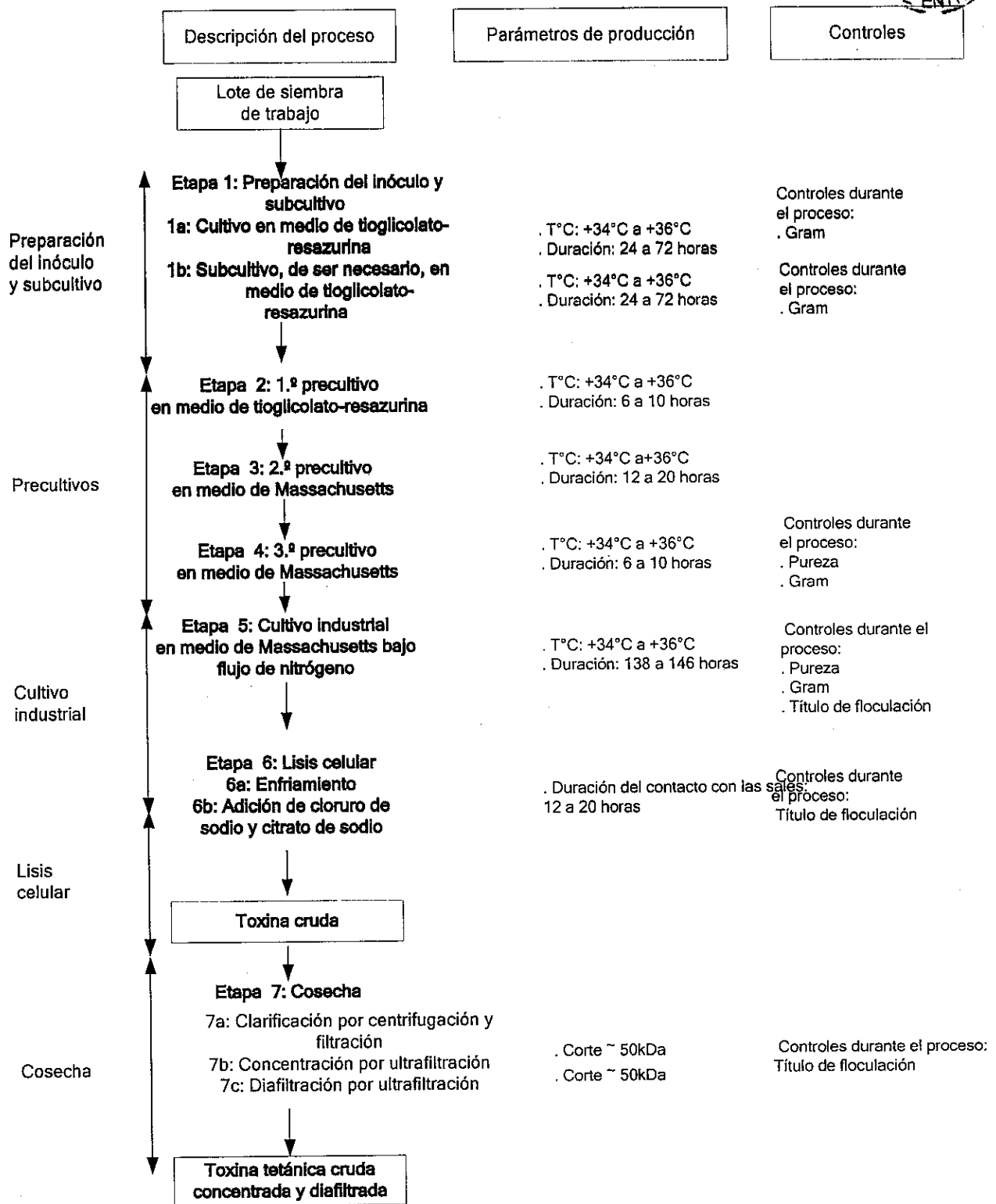
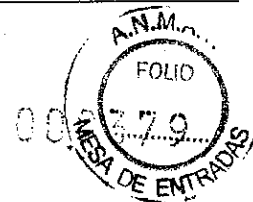




Figura 1: Preparación de la toxina tetánica concentrada y diafiltrada







## 1.1 Fermentación de *Clostridium tetani*

### 1.1.1 Preparación del inóculo y del subcultivo (etapa 1)

Las células de *Clostridium tetani* provenientes de un lote de siembra de trabajo se inoculan en tubos que contienen un medio de tioglicolato y resazurina (vea el apartado 3.1). Los tubos de cultivo se incuban durante 24 a 72 horas a una temperatura de +34 °C a +36 °C. El subcultivo se puede llevar a cabo utilizando las mismas condiciones.

Se toman muestras al final de la preparación del inóculo y del subcultivo para los controles durante el proceso (vea el apartado 2.1).

### 1.1.2 Amplificación del cultivo

#### *Etapa 2:* Primer precultivo

Se inoculan los viales que contienen medio de tioglicolato y resazurina con el cultivo anterior a una razón de volumen de 1:50. El cultivo se incuba durante 6 a 10 horas a una temperatura de +34 °C a +36 °C.

#### *Etapa 3:* Segundo precultivo

Se lleva a cabo un segundo precultivo por inoculación de medio de Massachusetts (vea el apartado 3.2) con los viales del primer precultivo a una razón de volumen de 1:30. El cultivo se incuba a una temperatura de +34 °C a +36 °C durante 12 a 20 horas.

#### *Etapa 4:* Tercer precultivo

El segundo precultivo se transfiere a medio Massachusetts a una razón de volumen de 1:5. Las células se incuban durante 6 a 10 horas a una temperatura de +34 °C a +36 °C.

Al final del tercer precultivo, se cosecha una alícuota del cultivo para los controles durante el proceso (vea el apartado 2.1).





### 1.1.3 Cultivo industrial (etapa 5)

Se inoculan los fermentadores con el tercer precultivo a una razón de volumen de 1:39. Luego se incuban las células de 138 a 146 horas, bajo condiciones de agitación y flujo de nitrógeno a una temperatura de +34 °C a +46 °C.

Al final del cultivo industrial, se cosecha una muestra para los controles durante el proceso (vea el apartado 2.1).

### 1.2 Lisis celular (etapa 6)

**Etapa 6a:** Se detiene el crecimiento bacteriano enfriando el medio de cultivo.

**Etapa 6b:** La lisis se lleva a cabo agregando cloruro de sodio y citrato de sodio al cultivo industrial.

El cultivo se transfiere a un tanque de lisis designado y se le agregan las sales para lisis en forma de solución a través de un filtro de 0.2 µm.

La suspensión bacteriana se mantiene en condiciones de agitación durante 12 a 20 horas. Se obtiene la toxina cruda.

En esta etapa se recolecta una alícuota para los controles durante el proceso (vea el apartado 2.1).

### 1.3 Cosecha de la toxina tetánica (etapa 7)

**Etapa 7a:** Clarificación por centrifugación

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

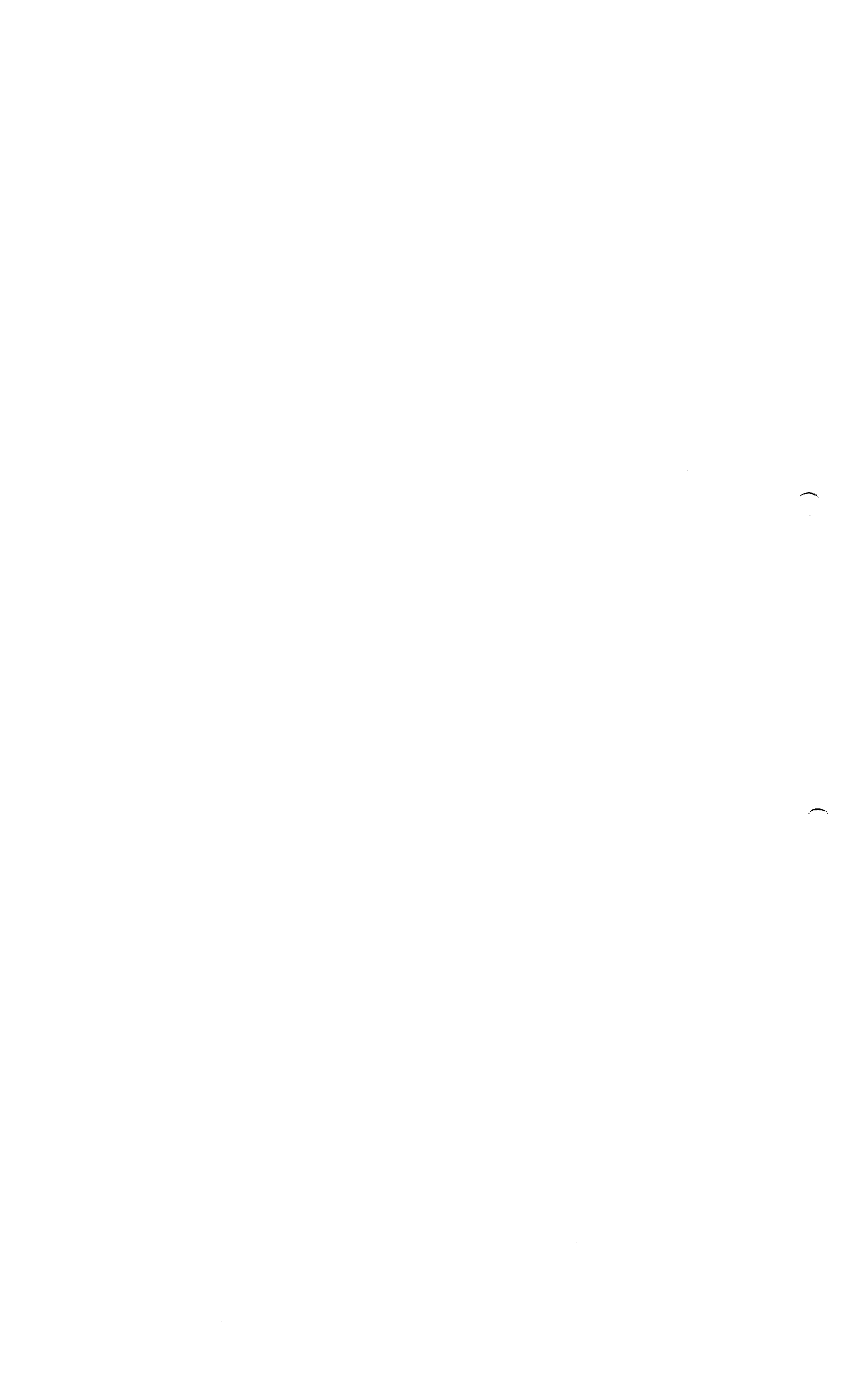
**Etapa 7b:** Concentración mediante ultrafiltración,

Luego se concentra el sobrenadante por ultrafiltración (corte de membrana ≈ 50 kDa).

**Etapa 7c:** Diafiltración mediante ultrafiltración

La toxina tetánica cruda concentrada se diafiltra (a través de un corte de membrana ≈ 50 kDa) contra agua purificada.

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 apartado 2.1).





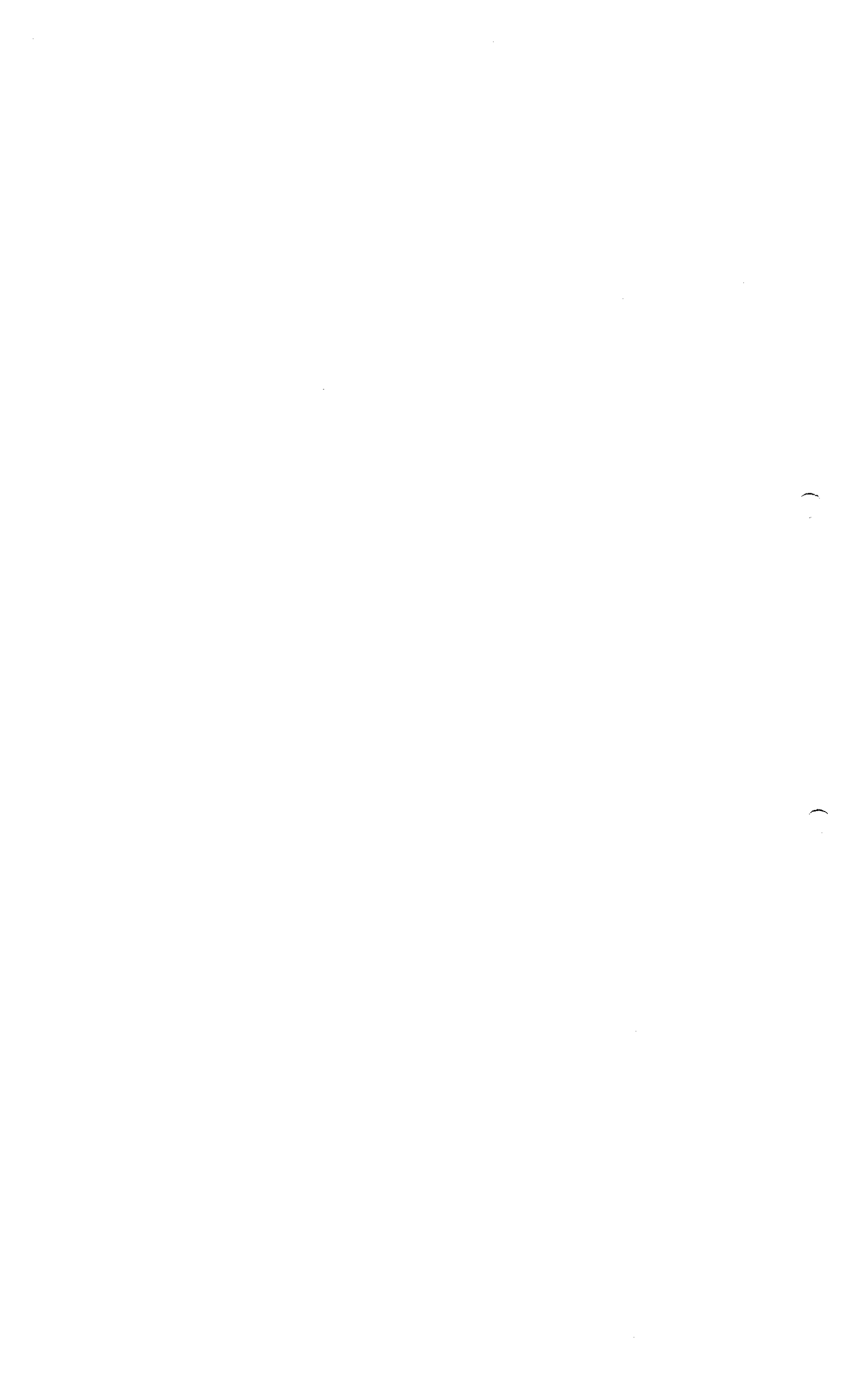
## 2 Controles durante el proceso

### 2.1 Panorama de los controles durante el proceso aplicados en la fermentación de *Clostridium tetani* y en la cosecha de la toxina tetánica

Los controles durante el proceso aplicados en la fermentación del *Clostridium tetani* y en la cosecha de la toxina tetánica se presenta en la tabla 1.

**Tabla 1: Panorama de los controles durante el proceso aplicados en la fermentación de *Clostridium tetani* y en la cosecha de la toxina tetánica**

Pasos de elaboración	Controles durante el proceso		
	Pruebas	Criterios / límites de aceptación	Justificación
<b>Etapa 1: Preparación del inóculo y subcultivos</b>	Tinción de Gram (método interno)	Bacilos gram positivos	Identificar la cepa
<b>Etapa 4: 3<sup>er</sup> precultivo</b>	Tinción de Gram (Método interno) Pureza (Método interno)	Bacilos gram positivos  Crecimiento en los diferentes medios seleccionados	Controlar la pureza del cultivo  Controlar la pureza del cultivo
<b>Etapa 5: Cultivo industrial</b>	Tinción de Gram (Método interno) Pureza (Método interno)  Título de floculación (Ph. Eur. 2.7.27, edición actual, prueba de Ramon)	Bacilos gram positivos  Crecimiento en los diferentes medios seleccionados  $\geq 40$ Lf/mL	Controlar la pureza del cultivo  Controlar la pureza del cultivo  Calcular la producción de toxina
<b>Lisis celular: Etapa 6b: adición de sales de lisis</b>	Título de floculación (Ph. Eur. 2.7.27, edición actual, prueba de Ramon)	$> 36$ Lf/mL	Cuantificar el título de la toxina
<b>Cosecha : Etapa 7c: Diafiltración</b>	Título de floculación (Ph. Eur. 2.7.27, edición actual, prueba de Ramon)	No hay criterios de aceptación	Determinar la concentración con el fin de ajustar el título al inicio del paso de detoxificación





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

#### 3.1 Medio de tioglicolato y resazurina

Este medio está listo para usarse.

##### *Composición cualitativa*

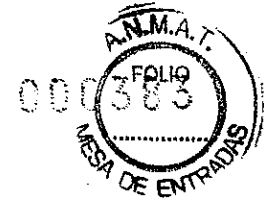
Peptona de caseína  
Extracto de levadura  
Tioglicolato de sodio  
Cloruro de sodio  
L-Cistina  
Dextrosa  
Agar  
Resazurina  
Agua purificada  
pH final:  $7,1 \pm 0,2$ .  
El medio se esteriliza con vapor caliente.

#### 3.2 Medio Massachusetts

##### *Composición cualitativa*

Triptona V  
Infusión de corazón de buey previamente ultrafiltrada (50 g/L)  
Glucosa anhidra  
Cloruro de sodio  
Fosfato disódico 12H<sub>2</sub>O  
Fosfato monopotásico 2H<sub>2</sub>O  
Sulfato de magnesio, 7H<sub>2</sub>O  
Sulfato de hierro, 7H<sub>2</sub>O  
L-Cistina  
L-Tirosina





Uracilo  
Tiamina HCl (B1)  
Riboflavina (B2)  
Pantotenato de calcio (B5)  
Hidrocloruro de piridoxina (B6)  
Biotina  
Cianocobalamina  
Ácido pirídico 2-6 dicarboxílico  
Péptidos N3  
Ácido clorhídrico  
Etanol anhidro  
Carbón vegetal  
Agua purificada  
El pH del medio se ajusta a  $7,3 \pm 0,1$  con hidróxido de sodio.  
El medio se trata con calor.

### 3.3 Otros


- Agua purificada
- Cloruro de sodio
- Citrato de sodio
- Antiespumante (opcional durante las etapas de fermentación en caso de producción de espuma)






### 3.2.S.2.2

## Reacciones de Purificación y Modificación - Tetánico

  
ROXANA MONTEMILONE  
DIRECTORA TÉCNICA  
SANOFI PASTEUR S.A.

  
CHRISTIAN DOMÍNGUEZ  
APODERADO  
SANOFI PASTEUR S.A.

