

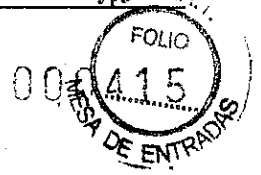


3.2.S.2.2

Definición de Lote(s) y de la Escala - FHA PTxd


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA GENERAL
SANOFI PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DOMINGUEZ
PRODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.

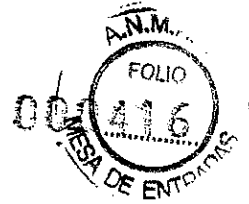


Sección 3.2.S.2.2 Descripción del proceso de elaboración y controles del proceso

Definición de lote(s) y escala

Índice

Lista de figuras	2
1 Panorama del proceso de elaboración.....	3
2 Definición del tamaño del lote.....	5
3 Sistema de numeración de lotes	5



Lista de figuras

Figura 1: Panorama del proceso de elaboración de los antígenos de la *Bordetella Pertussis*4
Figura 2: Ejemplo del sistema de numeración de lotes6



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



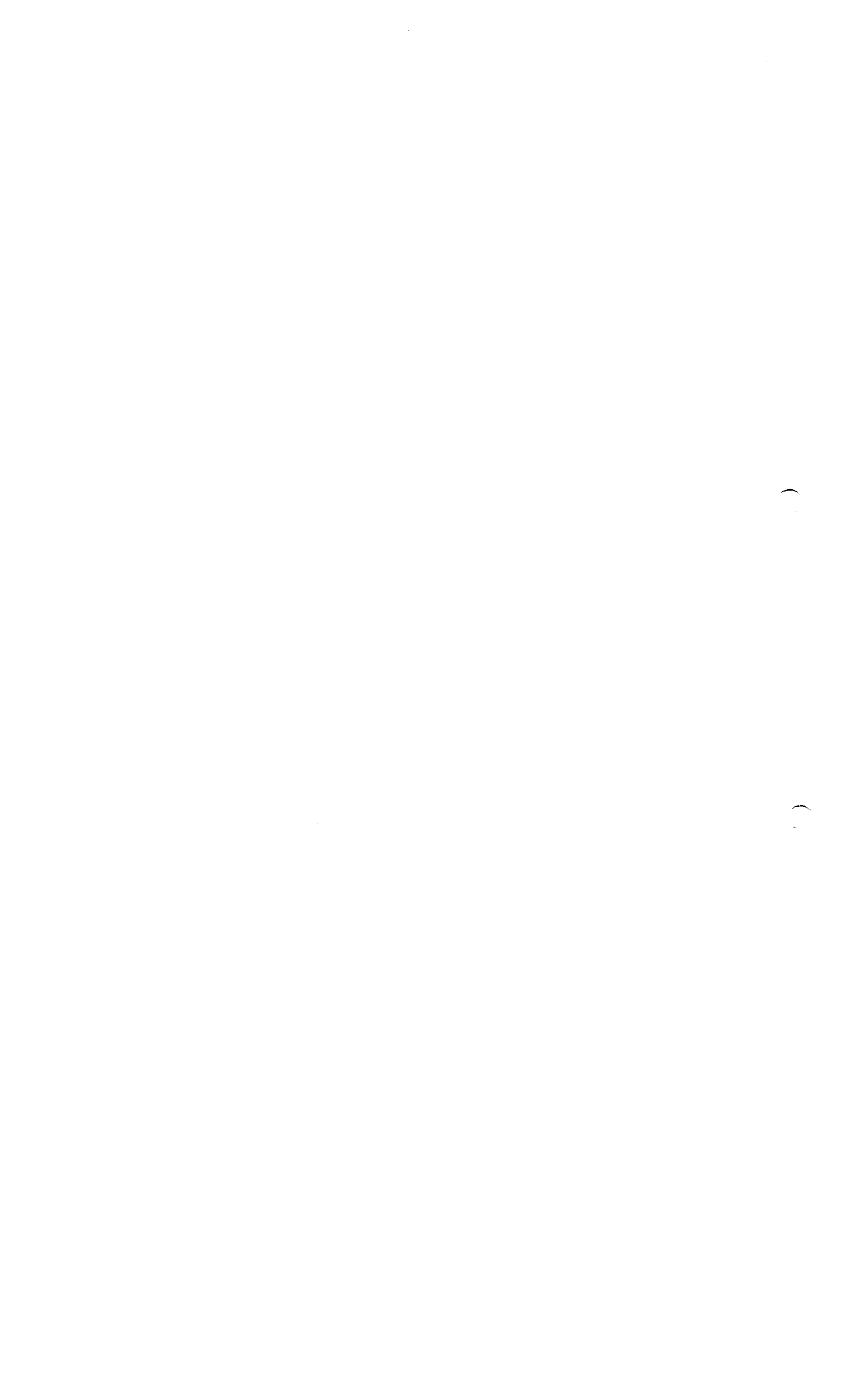
1 Panorama del proceso de elaboración

El principio activo está compuesto por dos proteínas antigénicas, el toxoide pertúsico purificado adsorbido y la hemaglutinina filamentosa purificada adsorbida (FHA). Estas proteínas se obtienen de la *Bordetella pertussis*.

Ambos antígenos pertúsicos (la FHA nativa purificada y la toxina pertúsica nativa purificada) se obtienen a partir del mismo proceso de fermentación y se procesan por separado mediante cromatografía de adsorción y cromatografía de afinidad. Luego, la toxina purificada nativa se detoxifica utilizando glutaraldehído (GTA) como agente detoxificador. La FHA purificada, la cual se somete a pruebas de rutina para comprobar que está completamente desprovista de actividad tóxica, se utiliza en su forma nativa. Ambos antígenos (el toxoide pertúsico purificado en solución y la FHA purificada en solución) luego se adsorben por separado en hidróxido de aluminio.

En la figura 1 se presenta el panorama del proceso de elaboración. Este incluye los siguientes pasos:

- Fermentación, incluidos los precultivos y los cultivos industriales,
- Separación de las dos proteínas antigénicas mediante cromatografía de adsorción
- Purificación de las dos proteínas antigénicas de manera independiente
- Detoxificación de la toxina pertúsica purificada
- Adsorción en hidróxido de aluminio para cada proteína purificada



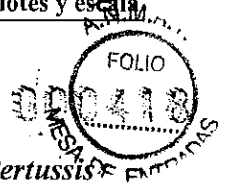
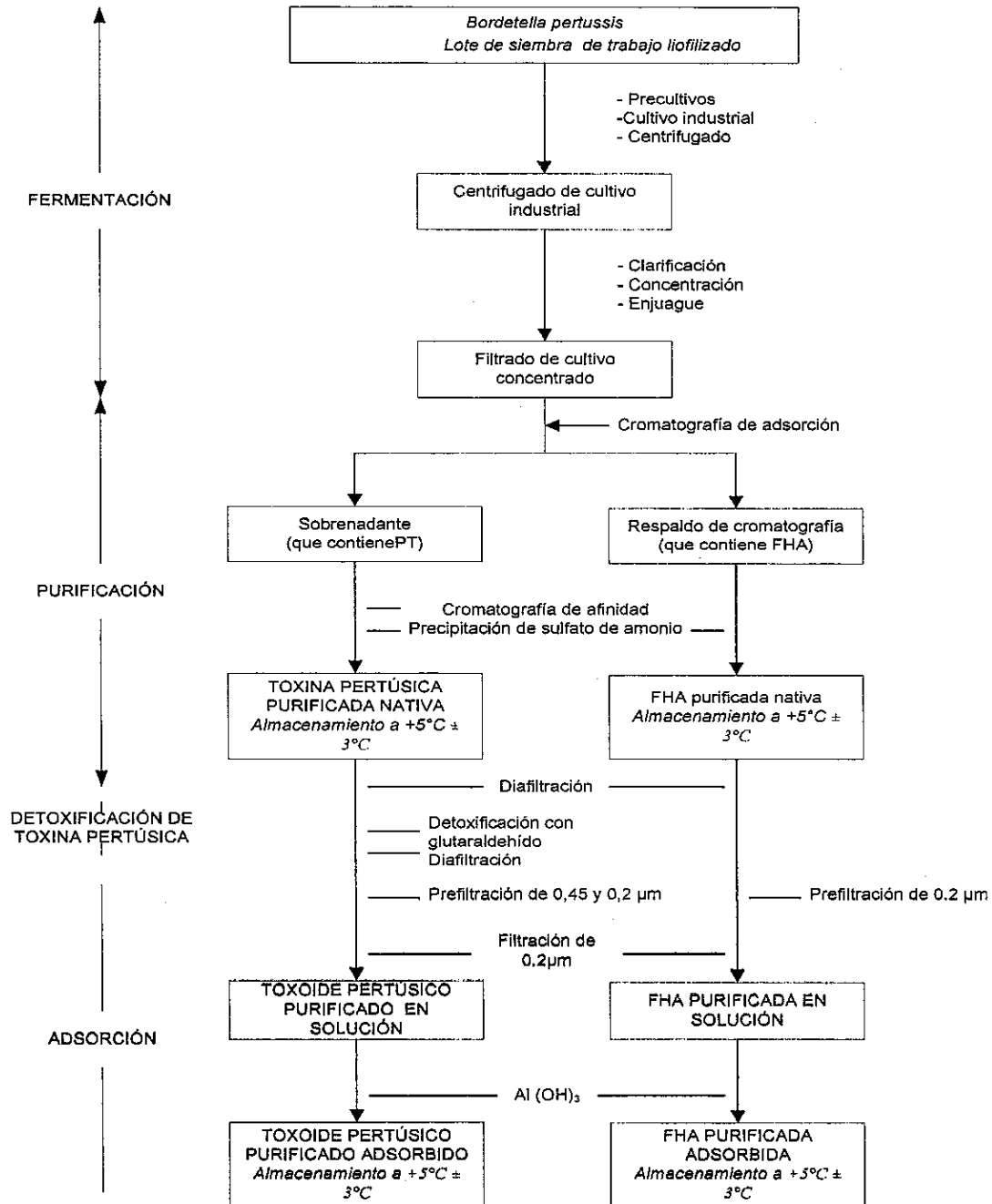


Figura 1: Panorama del proceso de elaboración de los antígenos de la *Bordetella Pertussis*



2 Definición del tamaño del lote

El tamaño de lote del cultivo industrial es de aproximadamente 8000 litros antes de procesar los pasos de purificación. La purificación del cultivo de 8000 litros permite obtener los antígenos pertúsicos nativos purificados: toxina pertúsica y FHA. Luego, se pueden utilizar cantidades variables de antígenos pertúsicos purificados nativos en forma de precipitado para producir antígenos adsorbidos de entre 20 g para lotes de pequeña escala y 45 g para lotes a gran escala antes de la adsorción en hidróxido de aluminio.

El tamaño usual del lote de la FHA y del PTxd purificados adsorbidos varía de 15 a 75 litros, según el rendimiento y tamaño del lote inicial.

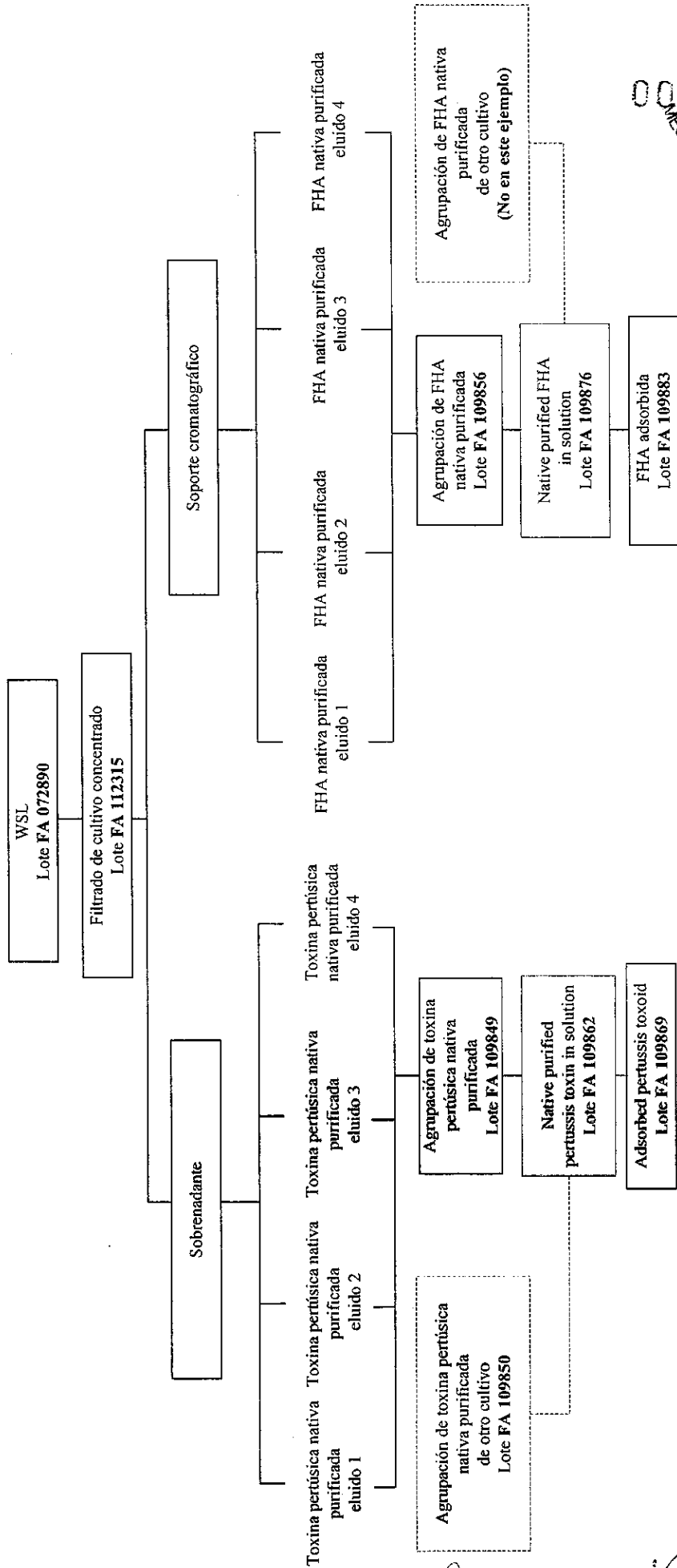
3 Sistema de numeración de lotes

El número de lote es una secuencia de caracteres única y no descriptiva que un sistema informático asigna a cada lote de siembra de trabajo, intermedios y principio activo.

En la figura 2 se presenta un ejemplo del sistema de numeración de lotes.



Figura 2: Ejemplo del sistema de numeración de lotes



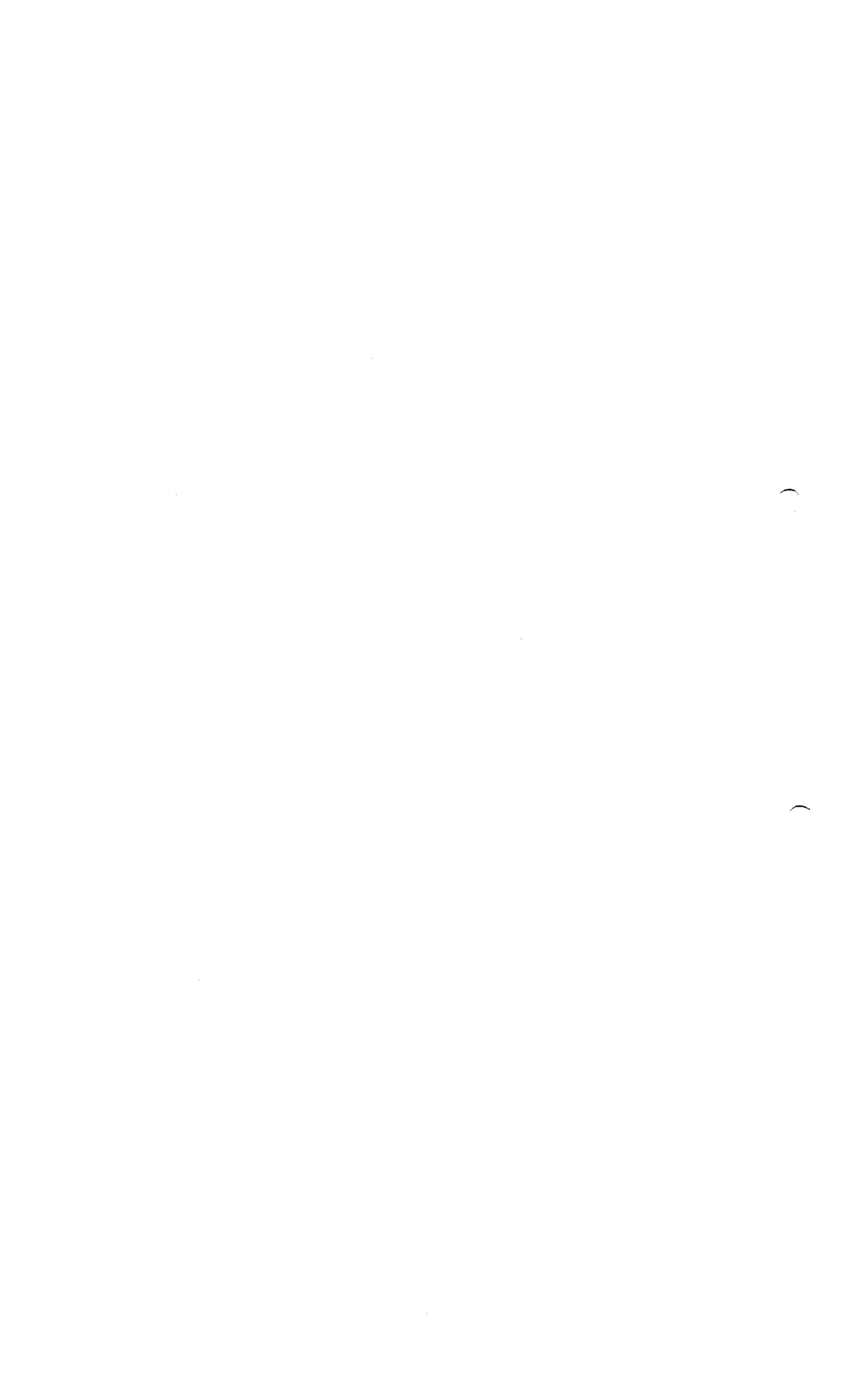
ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.

RA_0301915

Información confidencial/proprietaria
Página 6 de 6





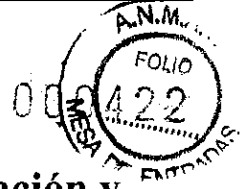
3.2.S.2.2

Cultivo Celular y Cosecha - FHA PTxd


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA
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

Cultivo y cosecha celular

Índice

Lista de tablas	2
Lista de figuras	3
1 Fermentación de la <i>Bordetella Pertussis</i> y cosecha	4
1.1 Proceso de fermentación (etapas 1 a 5)	6
1.1.1 Amplificación del cultivo (etapas 1 a 4)	6
1.1.2 Cultivo industrial (etapa 5)	6
1.2 Cosecha (etapa 6a a 6d)	7
2 Controles durante el proceso	8
2.1 Panorama general de los controles durante el proceso, aplicados en la fermentación y cosecha de la <i>Bordetella Pertussis</i>	8
3 Medios de cultivo, tampones y otros aditivos utilizados durante el cultivo celular y la cosecha	9
3.1 Caldo de tripcasa de soja	9
3.2 Medio Stainer y Scholte – medio SAT (Medio SS-SAT)	9
3.3 Solución suplementaria	9
3.4 Metilcelulosa /Solución de L-prolina	10
3.5 Medio de agar de Bordet Gengou con sangre ovina desfibrinada	10
3.6 Tampón de carbonato	10



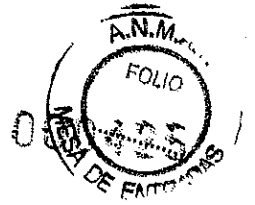




Lista de figuras

Figura 1: Diagrama de flujo de la fermentación y la cosecha5

Lista de abreviaturas: vea 2.3 Resumen general de calidad, Introducción



1 Fermentación de la *Bordetella Pertussis* y cosecha

El esquema del proceso para la fermentación de la *Bordetella pertussis* y cosecha se proporciona en la figura 1.



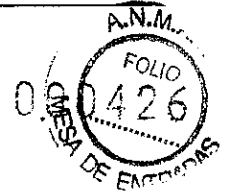
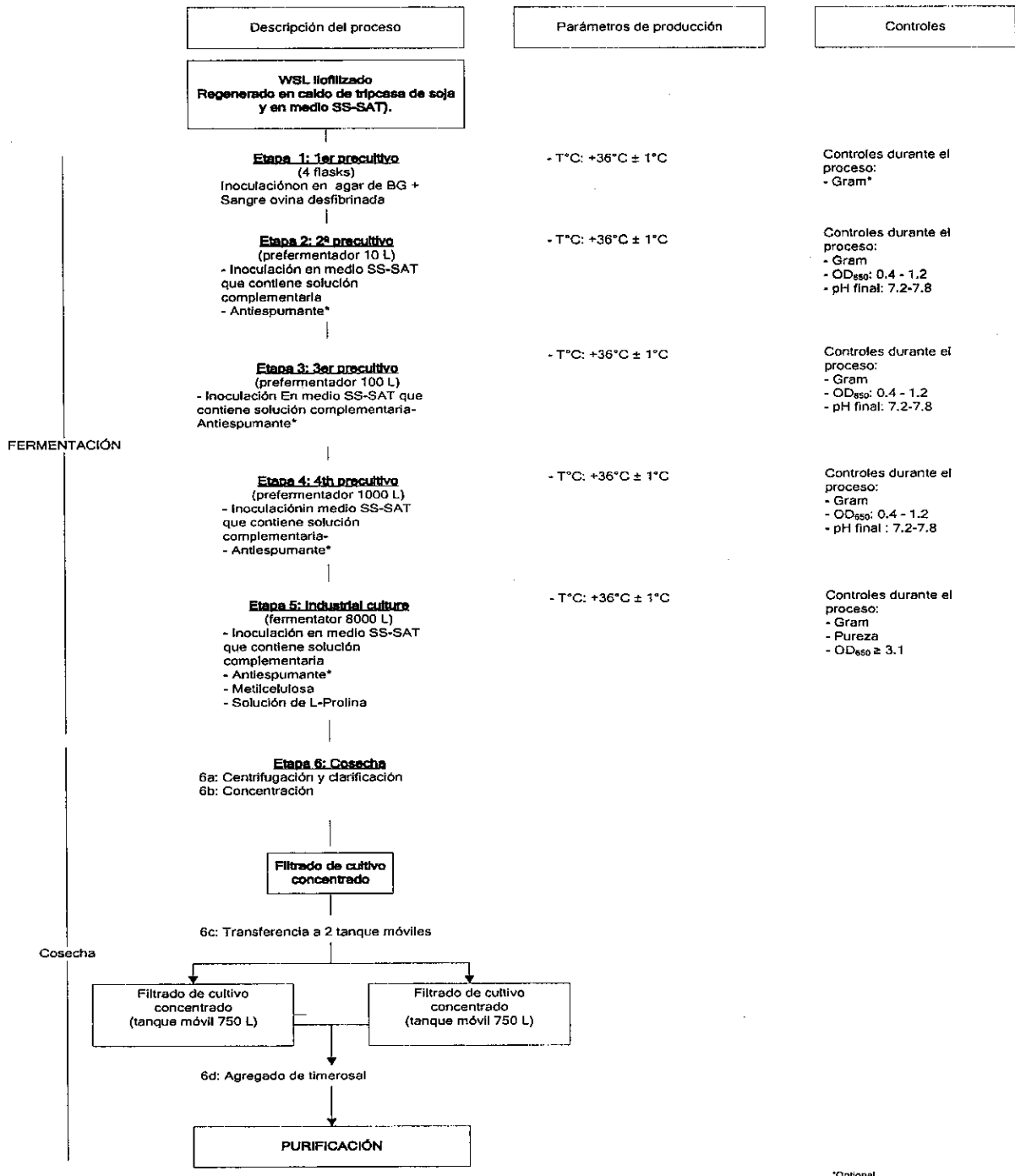
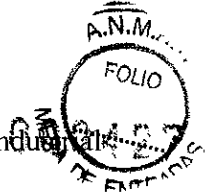


Figura 1: Diagrama de flujo de la fermentación y la cosecha







1.1 Proceso de fermentación (etapas 1 a 5)

El proceso de fermentación está compuesto por cuatro cultivos previos y un cultivo industrial.

1.1.1 Amplificación del cultivo (etapas 1 a 4)

- **Etapa 1:** Primer cultivo previo

Los lotes de siembra de trabajo (WSL) liofilizados se reconstituyen en caldo de trip casa de soja y medio SS-SAT (vea el capítulo 3). El WSL reconstituido se inocula en agar de Bordet Gengou (BG) que contiene sangre ovina desfibrinada. Se preparan cuatro matraces a partir de cada WSL y se incuban a $+ 36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Al final de esta fase se toman muestras para los controles durante el proceso (vea el párrafo 2.1).

- **Etapa 2:** Segundo cultivo previo

Este cultivo previo se lleva a cabo en un prefermentador de 10 litros.

El medio SS-SAT que contiene solución suplementaria (vea el capítulo 3) se introduce en el prefermentador suministrado por aire y sometido a agitación. Luego, el contenido de los matraces se inocula dentro del prefermentador, el cual se incuba a $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Finalmente, se agrega antiespumante, cuando sea necesario.

Al final de esta etapa se toman muestras para los controles durante el proceso (vea el párrafo 2.1).

- **Etapa 3:** Tercer cultivo previo

Este cultivo previo se lleva a cabo en un prefermentador de 100 litros.

El medio SS-SAT que contiene solución suplementaria se introduce en el prefermentador suministrado por aire y sometido a agitación. Luego, el segundo cultivo previo se inocula dentro del prefermentador, el cual se incuba a $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Finalmente, se agrega antiespumante cuando sea necesario.

Al final de esta etapa se toman muestras para los controles durante el proceso (vea el párrafo 2.1).

- **Etapa 4:** Cuarto cultivo previo

Este cultivo previo se lleva a cabo en un prefermentador de 1000 litros.


El medio SS-SAT que contiene solución suplementaria se introduce en el prefermentador suministrado por aire y sometido a agitación. Luego, el tercer cultivo previo se inocula dentro del prefermentador, el cual se incuba a $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Finalmente, se agrega antiespumante cuando sea necesario.

Al final de esta fase se toman muestras para los controles durante el proceso (vea el párrafo 2.1).

1.1.2 Cultivo industrial (etapa 5)

Este último paso de fermentación se lleva a cabo en un fermentador de 8000 litros.


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.





El medio SS-SAT que contiene solución suplementaria se introduce en el fermentador suministrado por aire y sometido a agitación. Luego, el cuarto cultivo previo se inocula en el fermentador.

Finalmente, se agrega antiespumante cuando sea necesario.

Durante esta etapa, en un momento que depende del desarrollo bacteriano, se añade metilcelulosa y prolina.

El parámetro controlado durante el cultivo industrial es la temperatura ($+ 36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$). El cultivo se mantiene bajo aireación con aire comprimido en profundidad durante un período máximo de 44 horas (normalmente, entre 30 y 44 horas).

El crecimiento del cultivo se detiene enfriando el tanque de fermentación (entre $+ 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $+ 15\text{ }^{\circ}\text{C}$) mientras se mantiene con agitación durante un máximo de 12 horas.

Al final de esta etapa se toman muestras para los controles durante el proceso (vea el párrafo 2.1).

1.2 Cosecha (etapa 6a a 6d)

- **Etapa 6a:** Centrifugación y clarificación

El sobrenadante se cosecha mediante centrifugado continuo y luego se clarifica mediante un sistema de filtración (filtro final de $0,2\text{ }\mu\text{m}$) para eliminar las células bacterianas.

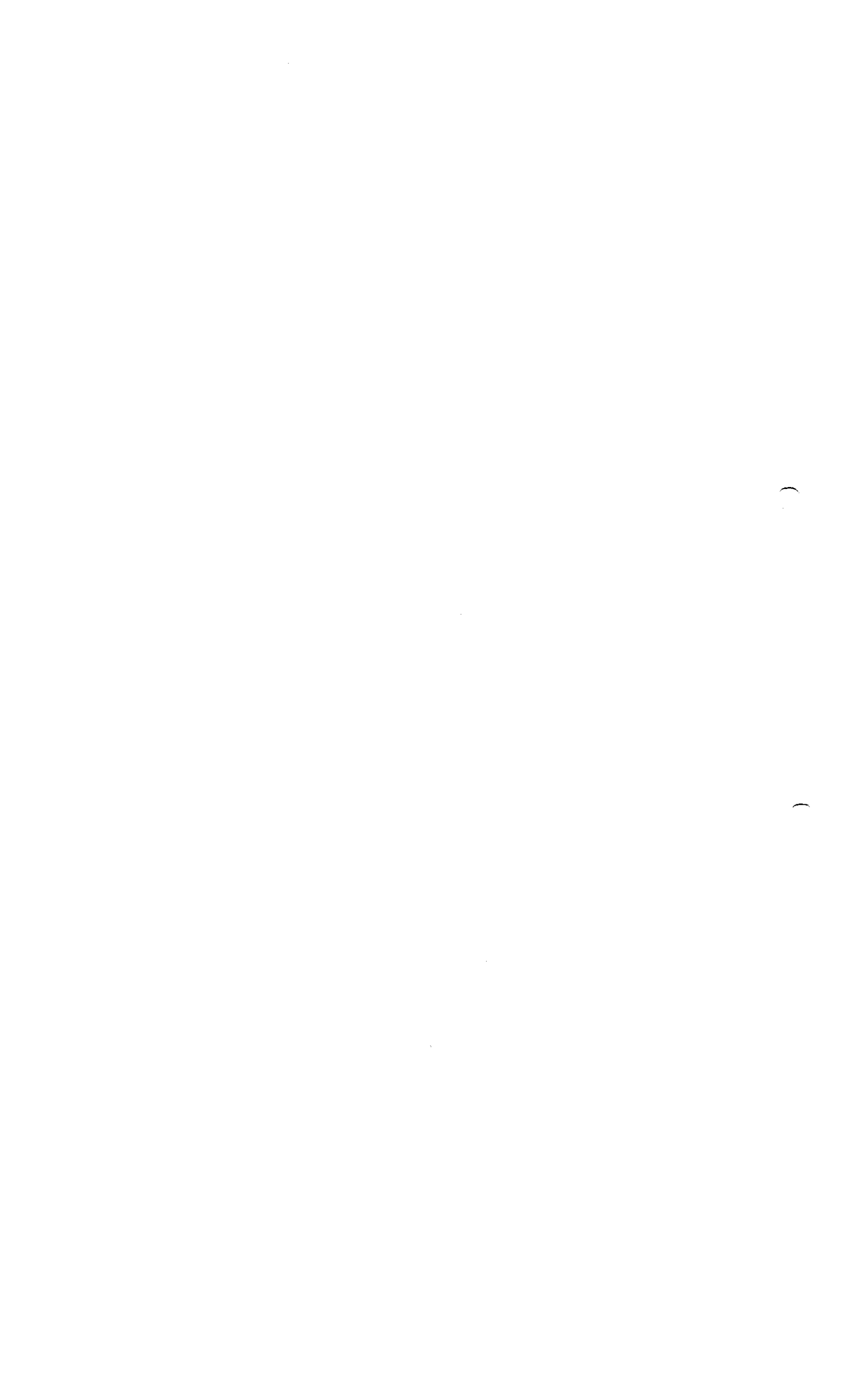
- **Etapa 6b:** Concentración

Luego, el sobrenadante (que contiene PT y FHA) se concentra mediante ultrafiltración. Las membranas se enjuagan con tampón de carbonato. La temperatura del tanque de concentración se mantiene por debajo de los $+ 15\text{ }^{\circ}\text{C}$.

- **Etapas 6c y 6d:** Transferencia en tanques móviles y adición de agente antimicrobiano

El filtrado del cultivo concentrado se transfiere a dos tanques móviles de 750 litros. Luego se agrega el agente microbiano timerosal a cada tanque móvil.

Finalmente, los dos tanques móviles se transfieren al edificio de purificación.





2 Controles durante el proceso

2.1 Panorama general de los controles durante el proceso, aplicados en la fermentación y cosecha de la *Bordetella Pertussis*

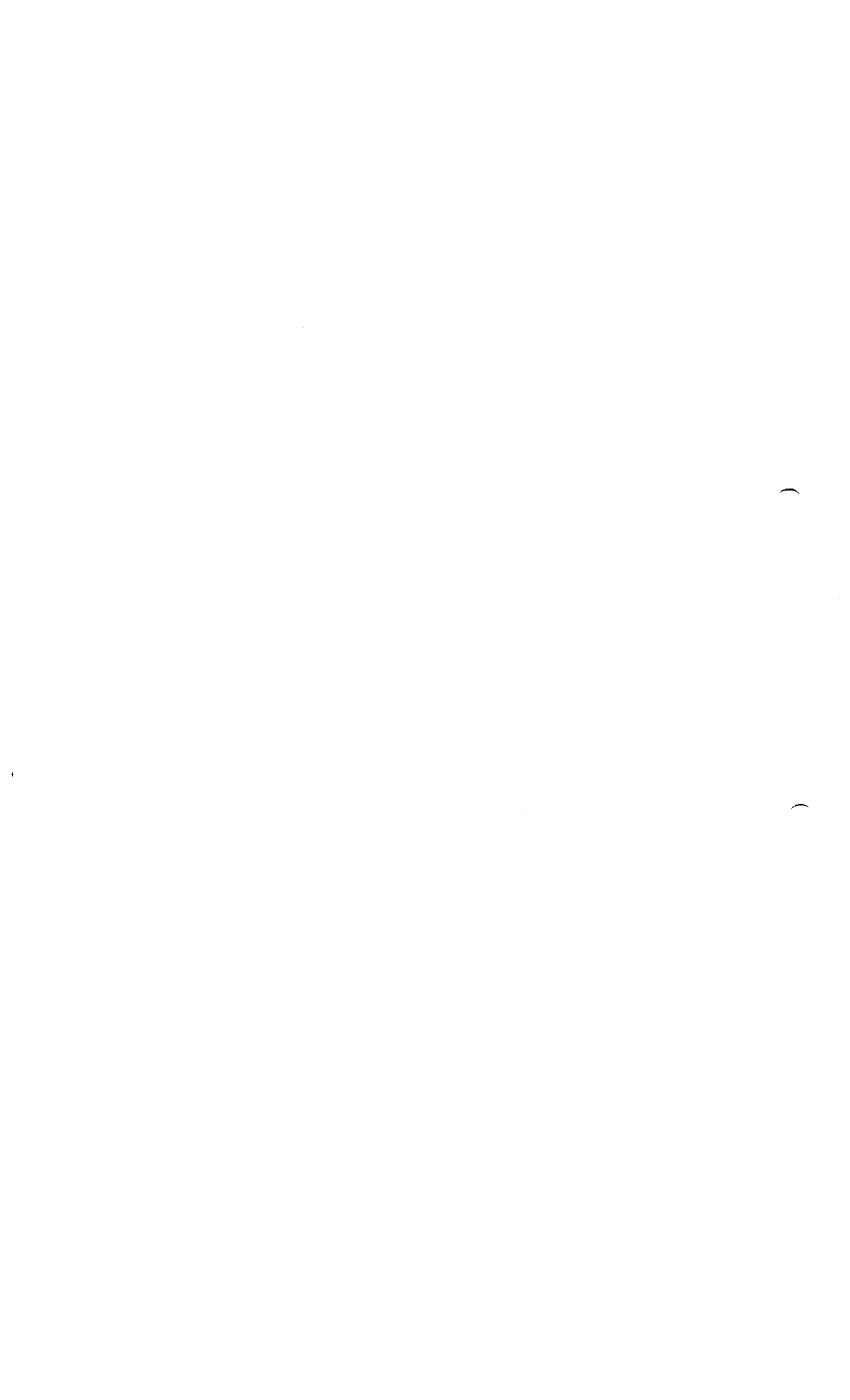
Los controles durante el proceso aplicados en la fermentación de la *Bordetella pertussis* y cosecha se presentan en la tabla 1.

Tabla 1: Controles durante el proceso aplicados durante la fermentación y cosecha de la *Bordetella pertussis*

Pasos de elaboración	Controles durante el proceso		
	Pruebas	Criterios de aceptación/límites	Justificación
Fase 1: 1 ^{er} cultivo previo	Tinción de Gram	Cocobacilos Gram negativos	Controlar la pureza del cultivo
Fase 2: 2 ^o cultivo previo	Tinción de Gram	Cocobacilos Gram negativos	Controlar la pureza del cultivo
	DO ₆₅₀	De 0,4 a 1,2	Estandarizar el inóculo para el siguiente paso y controlar el crecimiento bacteriano
	pH final	De 7,2 a 7,8	El pH se relaciona con el crecimiento bacteriano. El criterio de aceptación se basa en los datos históricos
Fase 3: 3 ^{er} cultivo previo	Tinción de Gram	Cocobacilos Gram negativos	Controlar la pureza del cultivo
	DO ₆₅₀	De 0,4 a 1,2	Estandarizar el inóculo para el siguiente paso y controlar el crecimiento bacteriano
	pH final	De 7,2 a 7,8	El pH se relaciona con el crecimiento bacteriano. El criterio de aceptación se basa en los datos históricos
Fase 4: 4 ^o cultivo previo	Tinción de Gram	Cocobacilos Gram negativos	Controlar la pureza del cultivo
	DO ₆₅₀	De 0,4 a 1,2	Estandarizar el inóculo para el siguiente paso y controlar el crecimiento bacteriano
	pH final	De 7,2 a 7,8	El pH se relaciona con el crecimiento bacteriano. El criterio de aceptación se basa en los datos históricos
Etapa 5: Cultivo industrial	Prueba de pureza	Crecimiento en diferentes medios seleccionados	Controlar la pureza del cultivo
	Tinción de gram	Cocobacilos gram negativos	Controlar la pureza del cultivo
	OD ₆₅₀	≥ 3,1	Garantizar un crecimiento mínimo



 ROXANA MONTEMILONE CHRISTIAN DOMINGUEZ
 DIRECTORA APODERADO
 SANOFI PASTEUR S.A. SANOFI PASTEUR S.A.





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

3.1 Caldo de tripeasa 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 Medio Stainer y Scholte – medio SAT (Medio SS-SAT)

- Glutamato de sodio
- L-prolina
- Fosfato dihidrogenado de potasio (KH_2PO_4)
- Cloruro de potasio (KCl)
- Cloruro de magnesio hexahidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
- Cloruro de calcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- Tris
- Hidrolizado ácido de caseína
- Cloruro de sodio (NaCl)
- β -ciclodextrina
- Agua purificada

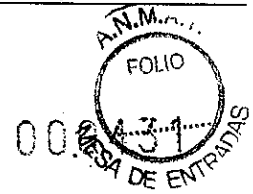
El pH se ajusta con HCl si es necesario.

El medio se esteriliza en autoclave (al menos +121 °C durante alrededor de 30 minutos) o se filtra (0,2 μm).

3.3 Solución suplementaria

- Clorhidrato de L-cisteína
- Sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- Ácido ascórbico





- Glutación
- Ácido nicotínico
- Ácido clorhídrico (HCl)
- Agua purificada

El pH se ajusta con NaOH si es necesario.

El medio se filtra (0,2 µm).

3.4 Metilcelulosa /Solución de L-prolina

- Medio SS-SAT (vea el párrafo 3.2)
- Metilcelulosa
- L-prolina
- Agua purificada
- Adición de solución suplementaria (vea el párrafo 3.3)

Las soluciones de metilcelulosa y L-prolina se pueden preparar por separado.

La solución se filtra (0,2 µm).

3.5 Medio de agar de Bordet Gengou con sangre ovina desfibrinada

- Fécula de papa
- Cloruro de sodio (NaCl)
- Peptona de trigo
- Agar
- Glicerol
- Agua purificada

El pH se ajusta con NaOH si es necesario.

Este medio se esteriliza en autoclave (al menos a +121 °C durante alrededor de 30 minutos).

Luego se agrega la sangre ovina desfibrinada al agar previamente enfriado a entre 45 °C y 50 °C.

3.6 Tampón de carbonato

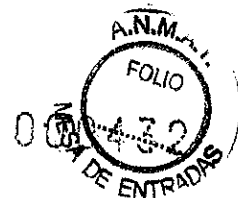
Carbonato de hidrógeno sódico (NaHCO₃)

Agua purificada

El pH se ajusta con carbonato de sodio (Na₂CO₃ 10H₂O)



El tampón se filtra (0,2 µm).





3.2.S.2.2

Reacciones de Purificación y Modificación - FHA PTxd

	
ROXANA MONTEMILONE DIRECTORA GENERAL SANOFI PASTEUR S.A.	CHRISTIAN DOMÍNGUEZ APODERADO SANOFI PASTEUR S.A.

