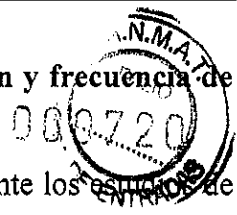


3.7.2.1.3 Parámetros estudiados / criterios de aceptación y frecuencia de pruebas



La tabla 117 y la tabla 118 ofrecen un panorama de las pruebas realizadas durante los estudios de estabilidad con los criterios de aceptación y la frecuencia de las pruebas.

Tabla 117: Parámetros estudiados / especificaciones y frecuencia de pruebas (meses) para el estudio inicial de estabilidad (estudio 1)

| Pruebas | Criterios de aceptación | T0 | T3 | T6 | T9 | T12 | T18 | T24 | T30 | T36 | T42 |
|---|---------------------------------------|----|-----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Contenido de formaldehído residual | 80 ± 30 µg/mL | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Contenido proteico (µg/mL) | Para información | X | NR* | X | NR | X | NR | X | NR | X | X |
| Título de antígeno D mediante el método sigmoideo | Pérdida < 30 %/T0 | NR | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica | No se observa crecimiento microbiano. | X | NR | NR | NR | X | NR | NR | NR | NR | X |

* NR: no realizada.

Nota: en T0 los resultados para cada prueba corresponden a los obtenidos en la liberación y cumplen con los criterios de aceptación correspondientes (ver el capítulo 3.1).

Para el contenido de antígeno D, los resultados obtenidos en los siguientes momentos de medición tienen que cumplir el siguiente criterio de aceptación: la pérdida de contenido de antígeno D es < 30 %/T0.

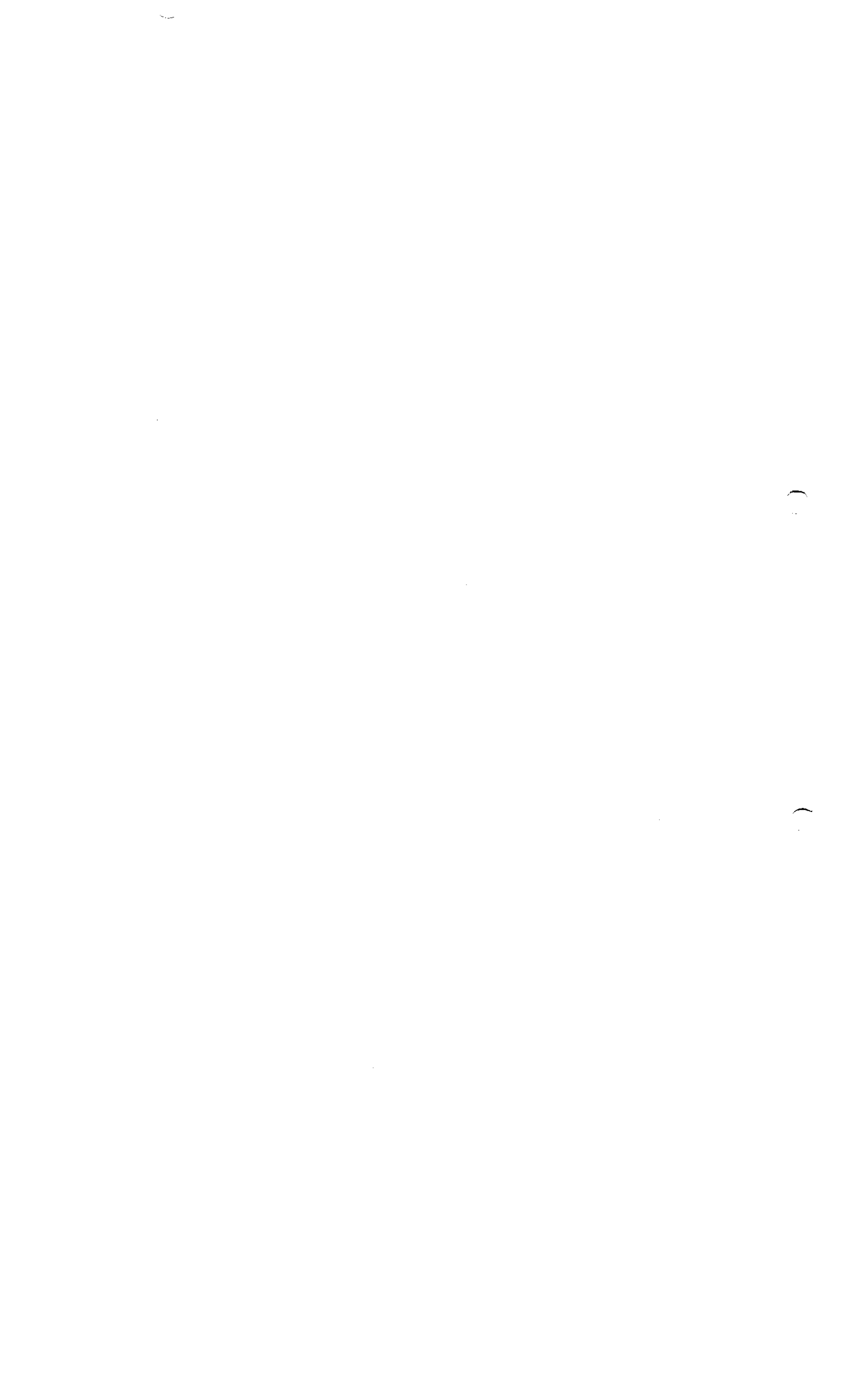
Tabla 118: Parámetros estudiados / especificaciones y frecuencia de pruebas (meses) para el estudio adicional de estabilidad (estudio 2)

| Pruebas | Criterios de aceptación | T0 | T6 | T12 | T24 | T36 |
|---|--|-----|----|-----|-----|-----|
| Contenido de formaldehído residual | 80 ± 30 µg/mL | X | X | X | X | X |
| Contenido proteico (µg/mL) | Para información | X | X | X | X | X |
| Título de antígeno D mediante el método sigmoideo | Pérdida < 30 %/T0 | NR* | X | X | X | X |
| Pureza (actividad específica) | ≤50 ng de proteína/unidad de antígeno D. | X | X | X | X | X |
| Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica | No se observa crecimiento microbiano. | X | NR | NR | NR | X |

* NR: no realizada.

Nota: En T0 los resultados para cada prueba corresponden a los obtenidos en la liberación y cumplen con los criterios de aceptación correspondientes (ver el capítulo 3.1).

Para el contenido de antígeno D, los resultados obtenidos en los siguientes momentos de medición tienen que cumplir con el siguiente criterio de aceptación: la pérdida de contenido de antígeno D es < 30 %/T0.



3.7.2.1.4 Discusiones



Estudio inicial de estabilidad (estudio 1) del monovalente de poliomieltitis almacenado en botellas de vidrio

El estudio de estabilidad se ha finalizado. Todos los resultados cumplen los criterios de aceptación durante todo el período del estudio de estabilidad.

Estos resultados permiten declarar la vida útil de 36 meses para los tres serotipos de monovalente de la poliomieltitis, cuando se almacenan en condiciones normales de almacenamiento a $+5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ en botellas de vidrio.

Estudio adicional de estabilidad (estudio 2) del monovalente de poliomieltitis

El estudio de estabilidad está en curso. Después de 12 meses de almacenamiento a $+5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$, todos los resultados para cada lote de monovalente cumplen con las especificaciones de los criterios de aceptación.

Con base en los resultados del estudio inicial de estabilidad, el período de validez actual del monovalente se mantiene en 36 meses a $+5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.7.2.2 Datos de estabilidad

Estudio inicial de estabilidad (estudio 1) del monovalente de poliomieltitis

Los resultados obtenidos para los 3 lotes de cada serotipo de poliovirus se presentan en la tabla 119 a la tabla 121.

Estudio adicional de estabilidad (estudio 1) del monovalente de poliomieltitis

Los resultados obtenidos para un lote de cada serotipo de poliovirus se presentan en la tabla 122.

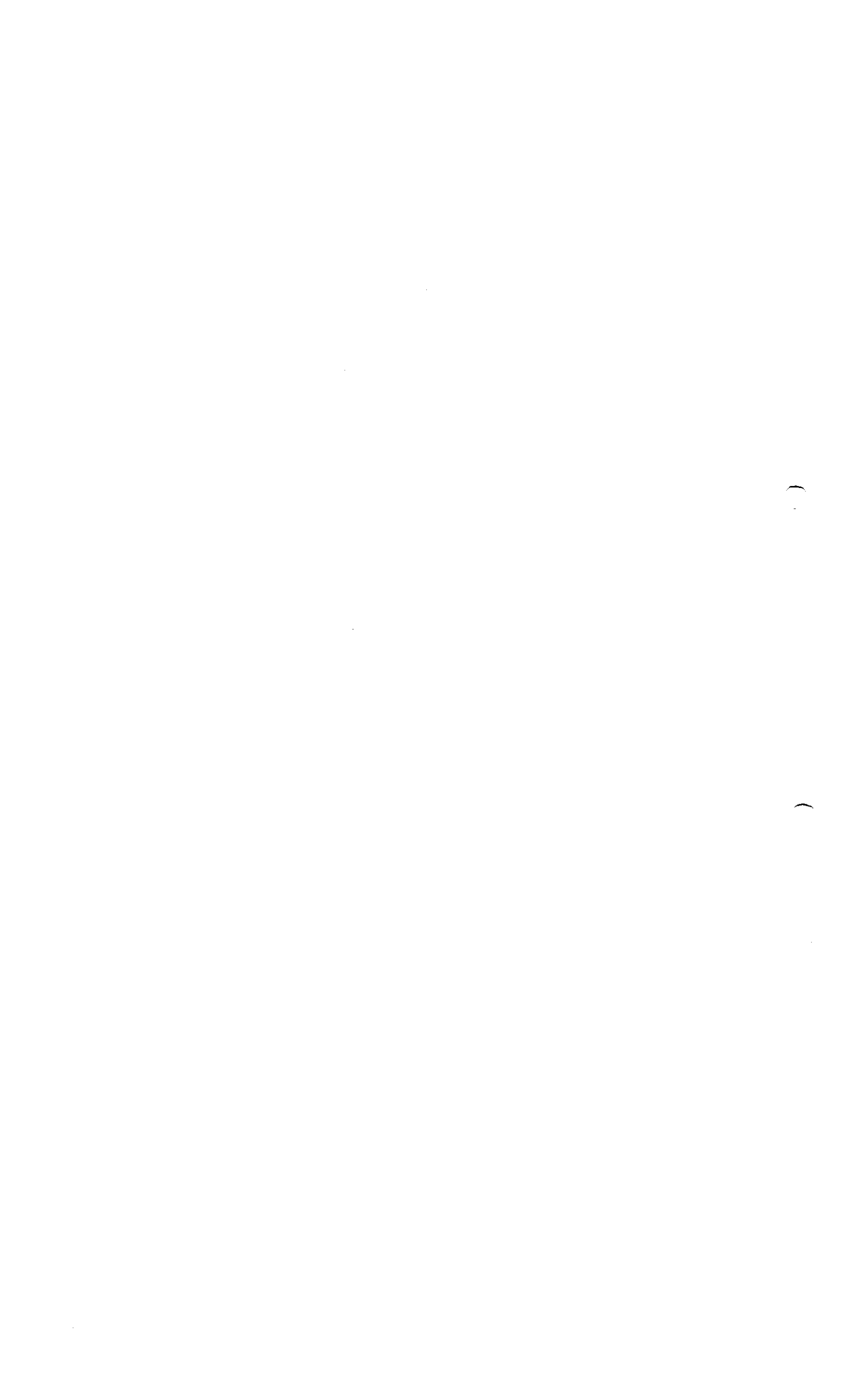


Tabla 119: Resultados obtenidos para el estudio de estabilidad del tipo 1 almacenados a $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$

| Lotes | Pruebas | Criterios de aceptación | T0 | T3 | T6 | T9 | T12 | T18 | T24 | T30 | T36 | T42 |
|----------|--|---------------------------------------|---------|-------|-------|-------|---------|-------|-------|-------|-------|---------|
| FA017078 | Formaldehído residual | $80 \pm 30 \mu\text{g/mL}$ | 83,49 | 82,40 | 76,14 | 75,38 | 77,75 | 74,21 | 66,69 | 67,29 | 67,54 | 60,82 |
| | Contenido proteico ($\mu\text{g/mL}$) | Para información | 18,36 | NR* | 17,43 | NR | 29,62 | NR | 24,11 | NR | 38,70 | 25,24 |
| | Título de antígeno D UD/mL (método sigmoidico) | Pérdida $< 30\% / T0$ | 1619 | 1573 | 1946 | 1590 | 1678 | 1683 | 1678 | 1820 | 1711 | 1686 |
| | Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica | No se observa crecimiento microbiano. | Cumple. | NR | NR | NR | Cumple. | NR | NR | NR | NR | Cumple. |
| FA030746 | Formaldehído residual | $80 \pm 30 \mu\text{g/mL}$ | 85,24 | 81,00 | 81,21 | 81,16 | 76,65 | 75,54 | 67,30 | 68,30 | 62,17 | 66,16 |
| | Contenido proteico ($\mu\text{g/mL}$) | Para información | 27,58 | NR | 31,22 | NR | 25,98 | NA* | 25,71 | NR | 27,29 | 25,88 |
| | Título de antígeno D UD/mL (método sigmoidico) | Pérdida $< 30\% / T0$ | 1635 | 1652 | 1608 | 1868 | 1661 | 1750 | 1605 | 1646 | 1687 | 1769 |
| | Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica | No se observa crecimiento microbiano. | Cumple. | NR | NR | NR | Cumple. | NR | NR | NR | NR | Cumple. |
| FA632107 | Formaldehído residual | $80 \pm 30 \mu\text{g/mL}$ | 83,44 | 83,41 | 80,54 | 79,57 | 80,18 | 68,71 | 70,88 | 66,65 | 70,18 | 64,16 |
| | Contenido proteico ($\mu\text{g/mL}$) | Para información | 28,30 | NR | 33,18 | NR | 28,16 | NR | 29,47 | NR | 20,35 | 33,93 |
| | D-antigen titer DU/mL (sigmoid method) | Pérdida $< 30\% / T0$ | 1644 | 1644 | 1836 | 1779 | 1584 | 1745 | 1878 | 1619 | 1809 | 1852 |
| | Bacterial and fungal sterility test | No se observa crecimiento microbiano | Cumple | NR | NR | NR | Cumple | NR | NR | NR | NR | Cumple |

* NR: No realizada.

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.





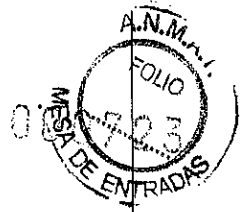
Tabla 120: Resultados obtenidos para el estudio de estabilidad (estudio 1) de los lotes de monovalente del tipo 2 almacenados a +5 °C ± 3 °C

| Lotes | Pruebas | Criterios de aceptación | T0 | T3 | T6 | T9 | T12 | T18 | T24 | T30 | T36 | T42 |
|----------|---|---------------------------------------|---------|-------|-------|-------|---------|-------|-------|-------|-------|---------|
| FA041647 | Formaldehído residual | 80 ± 30 µg/mL | 83,73 | 82,68 | 79,19 | 74,46 | 72,85 | 67,65 | 65,66 | 58,65 | 58,64 | 63,37 |
| | Contenido proteico (µg/mL) | Para información | 30,38 | NR* | 37,96 | NR | 35,11 | NR | 29,86 | NR | 34,67 | 31,29 |
| | Título de antígeno D UD/mL (método sigmoideo) | Pérdida < 30 %/T0 | 732 | 952 | 888 | 888 | 860 | 927 | 946 | 922 | 869 | 873 |
| | Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica | No se observa crecimiento microbiano. | Cumple. | NR | NR | NR | Cumple. | NR | NR | NR | NR | Cumple. |
| FA043088 | Formaldehído residual | 80 ± 30 µg/mL | 86,40 | 79,91 | 80,64 | 76,66 | 72,84 | 71,68 | 70,94 | 69,65 | 65,22 | 65,34 |
| | Contenido proteico (µg/mL) | Para información | 38,60 | NR | 43,96 | NR | 38,80 | NR | 39,27 | NR | 39,49 | 34,89 |
| | Título de antígeno D UD/mL (método sigmoideo) | Pérdida < 30 %/T0 | 890 | 906 | 905 | 779 | 875 | 841 | 780 | 866 | 875 | 850 |
| | Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica | Sin crecimiento microbiano. | Cumple. | NR | NR | NR | Cumple. | NR | NR | NR | NR | Cumple. |
| FA056970 | Formaldehído residual | 80 ± 30 µg/mL | 89,28 | 80,96 | 78,79 | 73,05 | 76,07 | 69,36 | 65,81 | 66,82 | 55,82 | 63,60 |
| | Contenido proteico (µg/mL) | Para información | 29,90 | NR | 36,06 | 35,79 | 41,11 | NR | 51,14 | NR | 31,55 | 37,44 |
| | Título de antígeno D UD/mL (método sigmoideo) | Pérdida < 30 %/T0 | 904 | 850 | 858 | 903 | 937 | 904 | 905 | 939 | 937 | 834 |
| | Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica | No se observa crecimiento microbiano. | Cumple. | NR | NR | NR | Cumple. | NR | NR | NR | NR | Cumple. |

NR: no realizada.

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.



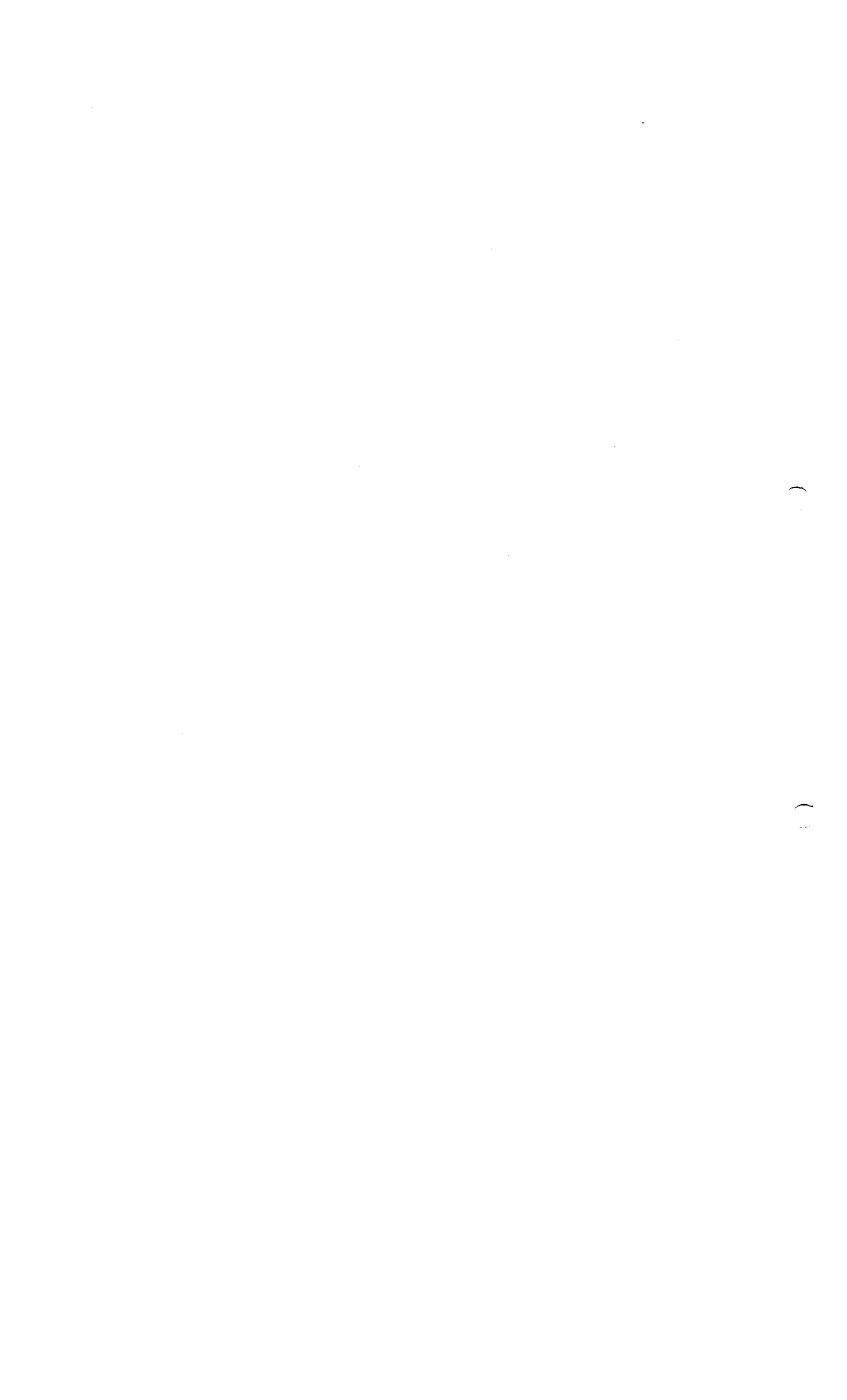
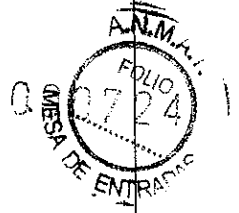


Tabla 121: Resultados obtenidos para el estudio de estabilidad inicial (estudio 1) de los lotes de monovalente del tipo 3 almacenados a +5 °C ± 3 °C

| Lotes | Pruebas | Criterios de aceptación | T0 | T3 | T6 | T9 | T12 | T18 | T24 | T30 | T36 | T42 |
|----------|---|---------------------------------------|---------|-------|-------|-------|---------|-------|-------|-------|----------------------|---------|
| FA021238 | Formaldehído residual | 80 ± 30 µg/mL | 87,12 | 81,14 | 74,52 | 75,71 | 75,66 | 70,07 | 65,00 | 58,92 | 63,75 | 61,72 |
| | Contenido proteico (µg/mL) | Para información | 26,57 | NR* | 28,61 | NR | 34,70 | NR | 20,23 | NR | 24,04 | 22,25 |
| | Título de antígeno D UD/mL (método sigmoideo) | Pérdida < 30 %/T0 | 1347 | 1358 | 1201 | 1287 | 1250 | 1401 | 1139 | 1201 | 1138 | 1144 |
| | Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica | No se observa crecimiento microbiano. | Cumple. | NR | NR | NR | Cumple. | NR | NR | NR | NR | Cumple. |
| FA027293 | Formaldehído residual | 80 ± 30 µg/mL | 78,94 | 69,07 | 77,70 | 74,75 | 75,30 | 67,10 | 68,24 | 65,61 | 64,53 | 64,07 |
| | Contenido proteico (µg/mL) | Para información | 29,71 | NR | 25,63 | NR | 29,19 | NR | 25,26 | NR | 25,81 | 23,17 |
| | Título de antígeno D UD/mL (método sigmoideo) | Pérdida < 30 %/T0 | 1432 | 1328 | 1152 | 1235 | 1233 | 1167 | 1361 | 1360 | 822† 1365 1406 | 1313 |
| | Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica | No se observa crecimiento microbiano. | Cumple. | NR | NR | NR | Cumple. | NR | NR | NR | NR | Cumple. |
| FA033291 | Formaldehído residual | 80 ± 30 µg/mL | 81,67 | 79,49 | 76,77 | 75,39 | 71,41 | 66,91 | 64,45 | 63,35 | 61,91 | 57,38 |
| | Contenido proteico (µg/mL) | Para información | 26,63 | NR | 43,22 | NR | 33,43 | NR | 27,56 | NR | 29,29 | 23,69 |
| | Título de antígeno D UD/mL (método sigmoideo) | Pérdida < 30 %/T0 | 1312 | 1397 | 1172 | 1238 | 1297 | 1223 | 1236 | 1254 | 1131 | 1100 |
| | Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica | No se observa crecimiento microbiano. | NR | NR | NR | NR | Cumple. | NR | NR | NR | NR | Cumple. |

NR: no realizada.
Repetición de pruebas.

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





sanofi pasteur

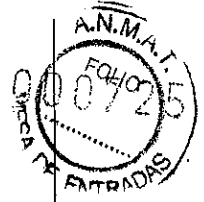
Granel de vacuna antipoliomielítica trivalente inactivada en células Vero

Control de pasos críticos e intermedios

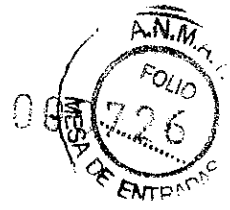
Tabla 122: Resultados obtenidos para el estudio de estabilidad (estudio 2) de los lotes de monovalente del tipo 1, 2 y 3 almacenados a +5 °C ± 3 °C

| Lotes | Pruebas | Criterios de aceptación | T0 | T6 | T12 |
|-------------------|---|---|---------|-------|-------|
| FA343588 (tipo 1) | Formaldehído residual | 80 ± 30 µg/mL | 88,88 | 83,01 | 78,54 |
| | Contenido proteico (µg/mL) | Para información | 13,43 | 17,88 | 14,44 |
| | Título de antígeno D UD/mL (método sigmoideo) | Pérdida < 30 %/T0 | 1506 | 1370 | 1565 |
| | Pureza (actividad específica) | ≤50 ng de proteína/unidad de antígeno D | 8,92 | 13,05 | 9,23 |
| | Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica | No se observa crecimiento microbiano. | Cumple. | NR* | NR |
| | Formaldehído residual | 80 ± 30 µg/mL | 87,75 | 84,88 | 79,14 |
| FA341042 (tipo 2) | Contenido proteico (µg/mL) | Para información | 28,75 | 37,91 | 40,32 |
| | Título de antígeno D UD/mL (método sigmoideo) | Pérdida < 30 %/T0 | 1011 | 957 | 973 |
| | Pureza (actividad específica) | ≤50 ng de proteína/unidad de antígeno D | 28,43 | 39,62 | 41,44 |
| | Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica | No se observa crecimiento microbiano. | Cumple. | NR | NR |
| | Formaldehído residual | 80 ± 30 µg/mL | 88,51 | 84,43 | 79,61 |
| | Contenido proteico (µg/mL) | Para información | 14,97 | 19,50 | 16,17 |
| FA342935 (tipo 3) | Título de antígeno D UD/mL (método sigmoideo) | Pérdida < 30 %/T0 | 1185 | 1072 | 1180 |
| | Pureza (actividad específica) | ≤50 ng de proteína/unidad de antígeno D | 12,64 | 18,19 | 13,70 |
| | Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica | No se observa crecimiento microbiano. | Cumple. | NR | NR |
| | NR: no realizada | | | | |

ROXANA MONTEMLONE DIRECTORA TÉCNICA SANOFI PASTEUR S.A.
 CHRISTIAN DOMINGUEZ APODERADO SANOFI PASTEUR S.A.







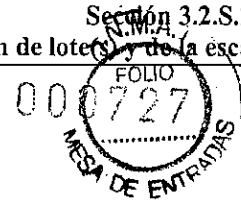


3.2.S.2.2

Definición de Lote(s) y de la Escala - PRP-T

| | |
|--|---|
|  |  |
| ROXANA MONTEMILONE | CHRISTIAN DOMINGUEZ |
| DIRECTORA TECNICA | APODERADO |
| SANOPI PASTEUR S.A. | SANOPI PASTEUR S.A. |



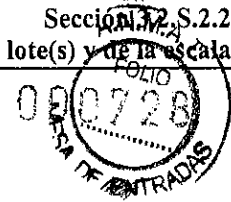


Sección 3.2.S.2.2 - Descripción del proceso de elaboración y controles del proceso

Definición de lote(s) y de la 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 los lotes..... | 5 |



Lista de figuras

Figura 1: Diagrama general de la producción del granel concentrado conjugado de polisacárido de *Haemophilus* 4

Figura 2: Ejemplo de la numeración de los lotes 6





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

1 Panorama del proceso de elaboración

El principio activo es el granel concentrado conjugado de polisacárido de *Haemophilus*, un polisacárido de alto peso molecular elaborado a partir de la cepa 1482 de *Haemophilus influenzae* tipo b, unido por enlace covalente tras una activación química a una proteína transportadora, la proteína tetánica (vea la sección 3.2.S.1.2 Estructura). Estos dos componentes se elaboran, extraen y purifican por separado utilizando sus propios sistemas de lote de siembra y procesos de elaboración.

La producción del granel concentrado de polisacárido de *Haemophilus* conjugado con proteína tetánica, abreviado PRPT, se divide en tres pasos principales de producción: (1) Producción del polisacárido de *Haemophilus* tipo b, (2) producción de la proteína tetánica y (3) conjugación del polisacárido de *Haemophilus* tipo b con la proteína tetánica concentrada. En el diagrama de flujo que aparece en la figura 1 se resume el proceso de elaboración. Para obtener más detalles, vea las siguientes secciones.

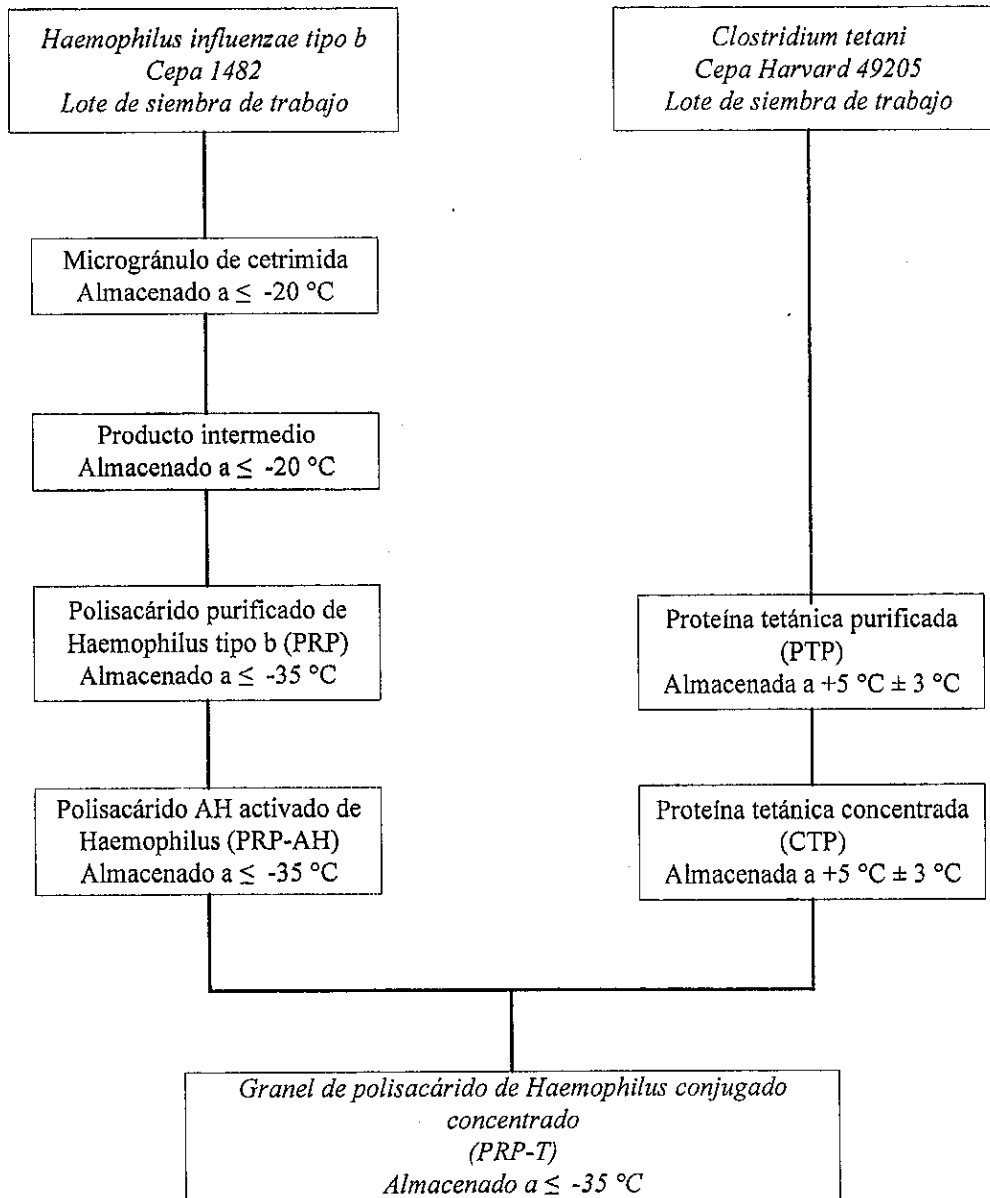
El polisacárido (3 β D-ribofuranosil (1 \rightarrow 1)D-ribitol-5-fosfato) se extrae mediante precipitación con cetrimida a partir de un cultivo de *Haemophilus influenzae* tipo b (cepa 1482), a continuación se purifica con fenol y se transforma en polisacárido activado (PRP-AH) mediante una unión a dihidrazida del ácido adípico (ADH) tras su activación con bromuro de cianógeno.

La proteína tetánica se prepara mediante la fermentación celular de *Clostridium tetani* (cepa Harvard 49205) y mediante lisis, purificación con sulfato de amonio e inactivación con formaldehído de la toxina. Luego, la proteína tetánica se concentra para proceder a la conjugación.

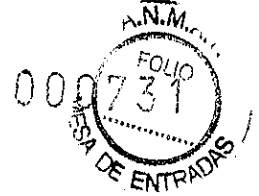
La unión covalente del polisacárido activado a la proteína tetánica concentrada se realiza mediante la reacción de condensación de la carbodiimida con etil dimetil aminopropil carbodiimida (EDAC). El producto conjugado se purifica mediante centrifugación zonal en un gradiente de sacarosa. Por último, el producto concentrado conjugado de polisacárido de *Haemophilus* se diluye mediante adición de sacarosa y solución tris-HCl, esto constituye el principio activo.



Figura 1: Diagrama general de la producción del granel concentrado conjugado de polisacárido de *Haemophilus*







2 Definición del tamaño del lote

El tamaño del lote de granel concentrado conjugado de polisacárido de *Haemophilus* se define mediante el volumen de los cultivos industriales de *Haemophilus influenzae* tipo b y *Clostridium tetani*, así como del volumen del equipo de purificación.

- El tamaño del lote de fermentación industrial de *Haemophilus influenzae* tipo b es de aproximadamente 1200 litros.
- El tamaño del lote de fermentación industrial de *Clostridium tetani* es de aproximadamente 2400 Litros.

3 Sistema de numeración de los 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.

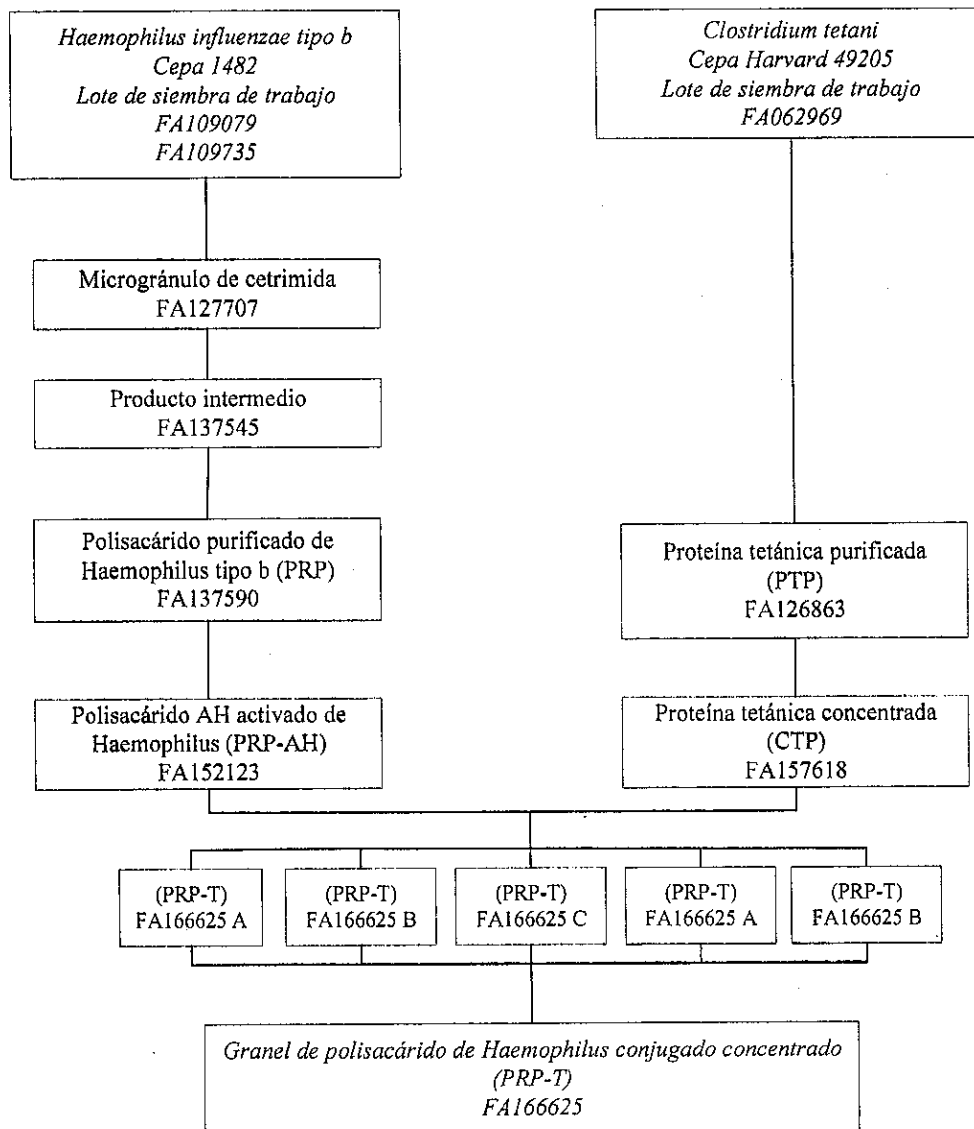
Durante el proceso de elaboración, los lotes de intermedios y del principio activo se pueden dividir en varios sublotes por motivos relacionados con los equipos y el proceso. Para los lotes de PRP-T, el nombre de estos sublotes de conjugación consta del número de PRP-T y una letra, por ejemplo FA166625A, FA166625B, FA166625C, etc.; luego, los sublotes se agrupan para formar un lote de principio activo, por ejemplo FA166625.

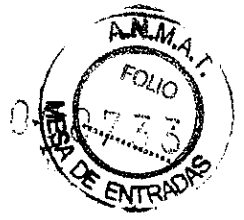
En la figura 2 se presenta un ejemplo de la numeración de los lotes.






Figura 2: Ejemplo de la numeración de los lotes





3.2.S.2.2

Cultivo Celular y Cosecha - PRP-T


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.



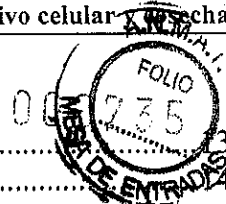


Sección 3.2.S.2.2 - Descripción del proceso de elaboración de los controles del proceso

Cultivo celular y cosecha

Índice

| | |
|--|-----------|
| Lista de tablas | 3 |
| Lista de figuras | 4 |
| 1 Fermentación del <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b y cosecha del polisacárido | 5 |
| 1.1 Fermentación de <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b..... | 6 |
| 1.2 Cosecha del polisacárido de <i>Haemophilus</i> tipo b (etapa 1.5)..... | 6 |
| 1.3 Extracción (etapa 1.6)..... | 7 |
| 2 Fermentación de <i>Clostridium tetani</i> y cosecha de la toxina tetánica..... | 7 |
| 2.1 Fermentación de <i>Clostridium tetani</i> | 9 |
| 2.1.1 Preparación del inóculo y subcultivo (etapa 2.1) | 9 |
| 2.1.2 Amplificación del cultivo | 9 |
| 2.1.3 Cultivo industrial (etapa 2.5)..... | 9 |
| 2.2 Lisis celular (etapa 2.6)..... | 9 |
| 2.3 Cosecha de la toxina tetánica (etapa 2.7)..... | 10 |
| 3 Controles durante el proceso..... | 11 |
| 3.1 Panorama de los controles durante el proceso | 11 |
| 3.1.1 Controles durante el proceso aplicados durante la fermentación de <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b y durante la cosecha del polisacárido | 11 |
| 3.1.2 Controles durante el proceso aplicados en la fermentación de <i>Clostridium tetani</i> y en la cosecha de la toxina tetánica..... | 12 |
| 4 Medios de cultivo, tampones y otros aditivos empleados durante el cultivo celular y la cosecha | 13 |
| 4.1 Medios de cultivo empleados durante la fermentación de <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b y otros aditivos utilizados para la cosecha del polisacárido | 13 |
| 4.1.1 Caldo de tripcasa de soja | 13 |
| 4.1.2 Medio sólido (agar de carbón vegetal) | 13 |

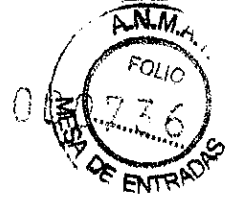


| | | |
|-------|--|----|
| 4.1.3 | Medio líquido | |
| 4.1.4 | Otros | |
| 4.2 | Medios de cultivo, tampones y otros aditivos empleados durante la fermentación de <i>Clostridium tetani</i> y cosecha de la toxina tetánica..... | 15 |
| 4.2.1 | Medio de tioglicolato y resazurina | 15 |
| 4.2.2 | Medio de Massachusetts..... | 15 |
| 4.2.3 | Tampón de fosfato disódico (0,07 M), pH 8,2 | 16 |
| 4.2.4 | Otros | 16 |


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 para la fermentación de *Haemophilus influenzae* tipo b y para la cosecha de polisacárido 11

Tabla 2: Controles durante el proceso aplicados en la fermentación del *Clostridium tetani* y en la cosecha de la toxina tetánica 12



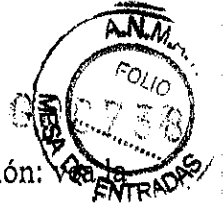
Lista de figuras

Figura 1: Preparación del microgránulo de ceftriaxona con polisacárido de *Haemophilus* tipo b5
Figura 2: Preparación de la toxina tetánica concentrada y diafiltrada.....8


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA GENERAL
SANOFI PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.





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

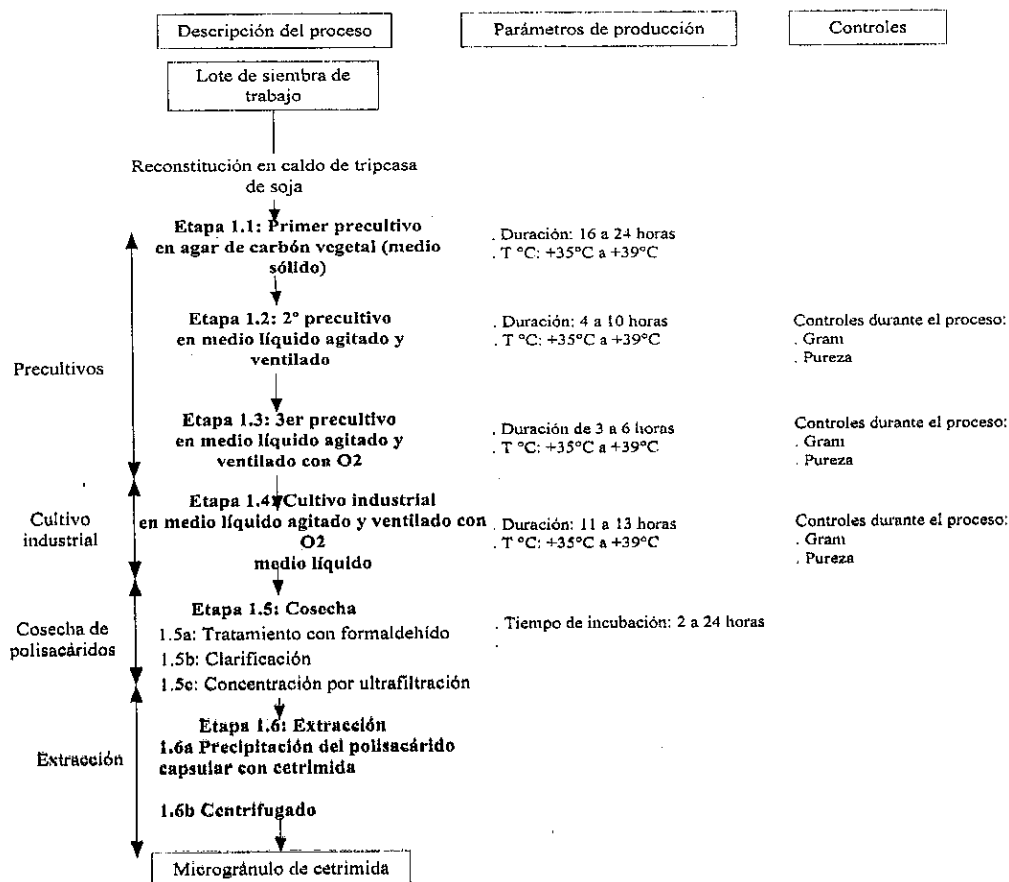
Lista y descripción de materiales y equipo utilizados durante este proceso de elaboración: sección 3.2.S.1 Instalaciones y equipo.

El proceso de elaboración que se describe a continuación se valida según lo que se presenta en la sección 3.2.S.2.5 Validación y/o evaluación del proceso con estudios sobre los parámetros de producción y sobre los controles durante el proceso.

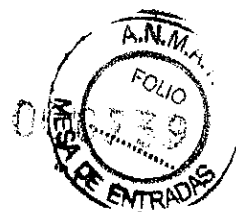
1 Fermentación del *Haemophilus influenzae* tipo b y cosecha del polisacárido

El flujo del proceso de fermentación de *Haemophilus* tipo b y de la cosecha del polisacárido se presenta en la figura 1. El tamaño del lote industrial de fermentación es de 1200 L.

Figura 1: Preparación del microgránulo de cetrimida con polisacárido de *Haemophilus* tipo b







1.1 Fermentación de *Haemophilus influenzae* tipo b

Etapa 1.1: Primer precultivo en agar de carbón vegetal (medio sólido)

Antes de esta etapa, se reconstituyen células de *Haemophilus influenzae* tipo b de la siembra de trabajo en caldo de trip casa de soja (vea el capítulo 4.1.1).

Las bacterias se siembran en matraces con medio sólido de agar de carbón vegetal (vea el capítulo 4.1.2) y se incuban durante 16 a 24 horas a entre +35 °C y +39 °C.

Etapa 1.2: Segundo precultivo en medio líquido

Las colonias bacterianas se cosechan en medio líquido (vea el capítulo 4.1.3) y se inoculan en un tanque. A continuación se incuban las bacterias bajo condiciones de agitación y ventilación estéril durante 4 a 10 horas a entre +35 °C y +39 °C.

Etapa 1.3: Tercer precultivo en medio líquido

Se realiza un tercer precultivo en un fermentador mediante la inoculación del medio líquido con el segundo precultivo. Se incuban las bacterias bajo condiciones de agitación y ventilación estéril durante 3 a 6 horas a entre +35 °C y +39 °C.

Etapa 1.4: Cultivo industrial en medio líquido

Finalmente, se inicia el cultivo industrial en un fermentador mediante la inoculación del medio líquido con el tercer precultivo. Se incuban las bacterias bajo condiciones de agitación y ventilación estéril durante 3 a 13 horas a entre +35 °C y +39 °C.

Al final de las etapas 1.2, 1.3 y 1.4, se toman muestras para realizar controles durante el proceso (vea el capítulo 3.1.1).

1.2 Cosecha del polisacárido de *Haemophilus* tipo b (etapa 1.5)

Etapa 1.5a: Tratamiento con formaldehído

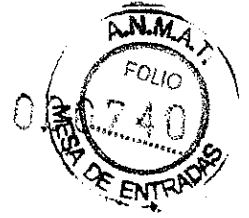
El cultivo industrial se trasvasa a un tanque de enfriamiento y se añade solución de formaldehído (36% p/p). El cultivo se mantiene durante 2 a 24 horas, con agitación suave y en condiciones de refrigeración.

Etapa 1.5b: Clarificación

El sobrenadante que contiene el polisacárido de *Haemophilus* tipo b se cosecha mediante centrifugación continua y se somete a filtración profunda. El microgránulo bacteriano se descarta.

Etapa 1.5c: Concentración mediante ultrafiltración

El sobrenadante se concentra mediante ultrafiltración (corte de la membrana en aproximadamente 100 kDa).



1.3 Extracción (etapa 1.6)

Etapa 1.6a: Precipitación del polisacárido de *Haemophilus* tipo b con cetrimida

El polisacárido capsular se precipita del sobrenadante concentrado mediante la adición de solución de cetrimida (bromuro de hexadeciltrimetil amonio).

Etapa 1.6b: Centrifugación

El precipitado se recolecta mediante centrifugación continua y se descarta el sobrenadante. El microgránulo de cetrimida obtenido se almacena en tanques de acero inoxidable a ≤ -20 °C (vea la sección 3.2.S.2.4 Pasos críticos e intermedios de PRP).

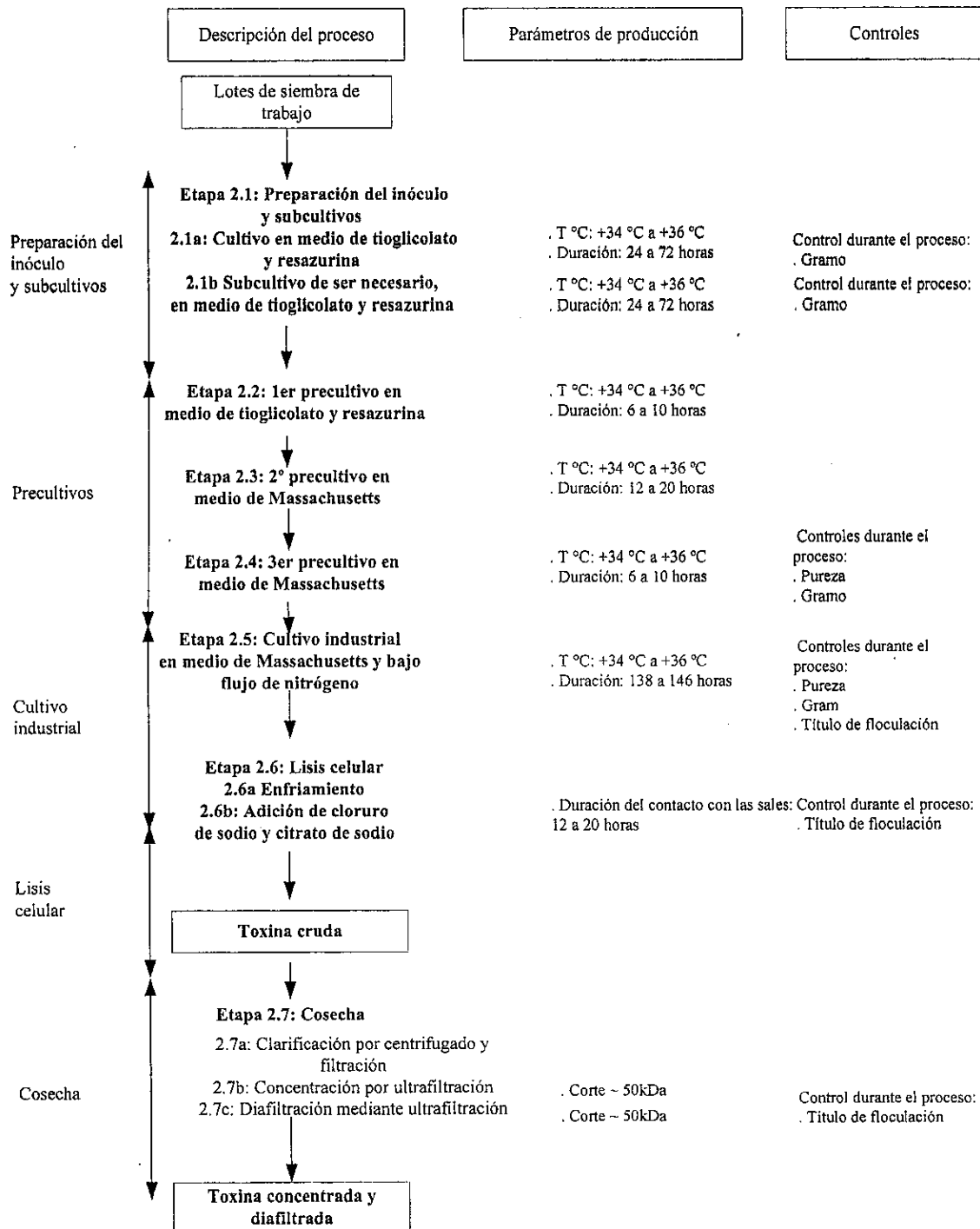
2 Fermentación de *Clostridium tetani* y cosecha de la toxina tetánica

El flujo de proceso de la fermentación de *Clostridium tetani* y la cosecha de la toxina tetánica se presenta en la figura 2. El tamaño del lote industrial de fermentación es de 2400 L.





Figura 2: Preparación de la toxina tetánica concentrada y diafiltrada





2.1 Fermentación de *Clostridium tetani*

2.1.1 Preparación del inóculo y subcultivo (etapa 2.1)

Se inoculan células de *Clostridium tetani* de un lote de siembra de trabajo en tubos que contienen medio de tioglicolato y resazurina (vea el capítulo 4.2.1). Los tubos de cultivo se incuban durante 24 a 72 horas a entre +34 °C y +36 °C. Se pueden realizar subcultivos bajo las mismas condiciones.

Al final de la preparación del inóculo y el subcultivo, se toman muestras para realizar controles durante el proceso (vea el capítulo 3.1.2).

2.1.2 Amplificación del cultivo

Etapa 2.2: Primer precultivo

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

Etapa 2.3: Segundo precultivo

Se lleva a cabo un segundo precultivo por inoculación de medio de Massachusetts (vea 4.2.2) con los viales del primer precultivo a una razón de volumen de 1 a 30. El cultivo se incuba durante 12 a 20 horas a una temperatura de +34 °C a +36 °C.

Etapa 2.4: Tercer precultivo

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

Al final del tercer precultivo, se recogen muestras para realizar los controles durante el proceso (vea el capítulo 3.1.2).

2.1.3 Cultivo industrial (etapa 2.5)

Los fermentadores se inoculan con el tercer precultivo en una razón de volumen de 1 a 39.

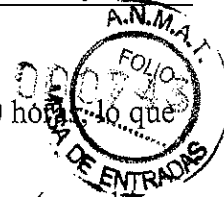
Las células se incuban durante 138 a 146 horas, bajo agitación y flujo de nitrógeno, a entre +34 °C y +36 °C.

Al final del cultivo industrial, se recogen muestras para realizar los controles durante el proceso (vea el capítulo 3.1.2).

2.2 Lisis celular (etapa 2.6)

Etapa 2.6a: El crecimiento bacteriano se detiene enfriando el medio de cultivo.

Etapa 2.6b: El cultivo se trasvasa a un tanque de lisis designado. La lisis se lleva a cabo añadiendo cloruro de sodio y citrato de sodio al cultivo industrial a través de un filtro de 0,2 µm.



La suspensión bacteriana se mantiene bajo condiciones de agitación durante 12 a 20 horas, lo que produce la liberación de la toxina cruda en los medios.

Al final de la etapa, se recogen muestras para realizar los controles durante el proceso (vea el capítulo 3.1.2).

2.3 Cosecha de la toxina tetánica (etapa 2.7)

Etapa 2.7a: Clarificación mediante centrifugación

El sobrenadante que contiene la toxina tetánica cruda se cosecha mediante centrifugación continua y se somete a filtración. Se desechan los residuos bacterianos.

Etapa 2.7b: Concentración mediante ultrafiltración

El sobrenadante se concentra mediante ultrafiltración (corte de la membrana \approx 50 kDa).

Etapa 2.7c: Diafiltración mediante ultrafiltración

La toxina tetánica concentrada se diluye en tampón de fosfato disódico (0,07 M / pH 8,1 a 8,3; vea el capítulo 4.2.3) y se diafiltra 5 veces (corte de membrana \approx 50 kDa) contra el mismo tampón para obtener la toxina concentrada diafiltrada. La toxina se trasvasa de inmediato para las siguientes etapas mediante una etapa de filtración de 0,2 μ m.

Al final de la etapa de diafiltración, se recogen muestras para realizar los controles durante el proceso (vea el capítulo 3.1.2).





3 Controles durante el proceso

3 Controles durante el proceso

3.1 Panorama de los controles durante el proceso

3.1.1 Controles durante el proceso aplicados durante la fermentación de *Haemophilus influenzae* tipo b y durante la cosecha del polisacárido

Los controles durante el proceso aplicados para la fermentación del *Haemophilus influenzae* tipo b y para la cosecha de polisacárido se presentan en la tabla 1. No se realizan controles durante el proceso para la cosecha del polisacárido.

Tabla 1: Controles durante el proceso aplicados para la fermentación de *Haemophilus influenzae* tipo b y para la cosecha de polisacárido

| Pasos de elaboración | Controles durante el proceso | | |
|--|----------------------------------|---|---|
| | Pruebas | Criterios de aceptación | Justificación |
| Etapa 1.2: 2º precultivo en medio líquido bajo agitación | Tinción de Gram(método interno) | Cocobacilos gram negativos | Controlar la pureza e identidad del cultivo |
| | Pureza (método interno) | Características de crecimiento en diferentes medios seleccionados | |
| Etapa 1.3: 3º precultivo en medio líquido bajo agitación | Tinción de Gram(método interno) | Cocobacilos gram negativos | Controlar la pureza e identidad del cultivo |
| | Pureza (método interno) | Características de crecimiento en diferentes medios seleccionados | |
| Etapa 1.4: Cultivo industrial | Tinción de Gram(método interno) | Cocobacilos gram negativos | Controlar la pureza e identidad del cultivo |
| | Pureza (método interno) | Características de crecimiento en diferentes medios seleccionados | |



3.1.2 Controles durante el proceso aplicados en la fermentación de *Clostridium tetani* y la cosecha de la toxina tetánica

Los controles durante el proceso aplicados en la fermentación del *Clostridium tetani* y en la cosecha de toxina tetánica se presentan en la tabla 2.

Tabla 2: Controles durante el proceso aplicados en la fermentación del *Clostridium tetani* y en la cosecha de la toxina tetánica

| Pasos de elaboración | Controles durante el proceso | | |
|---|---|---|---|
| | Pruebas | Criterios de aceptación | Justificación |
| Etapa 2.1: Preparación del inóculo y de los subcultivos | Tinción de Gram(método interno) | Bacilos gram positivos | Identificar la cepa |
| Etapa 2.4: 3^{er} precultivo | Tinción de Gram(método interno) Pureza (método interno) | Bacilos gram positivos Características de crecimiento en diferentes medios seleccionados | Controlar la pureza e identidad del cultivo |
| Etapa 2.5: Cultivo industrial | Tinción de Gram(método interno) Pureza (método interno) Título de floculación (Ph. Eur. 2.7.27 Prueba de Ramon) | Bacilos gram positivos Características de crecimiento en diferentes medios seleccionados ≥ 40 Lf/mL | Controlar la pureza e identidad del cultivo Calcular la producción de toxina |
| Lisis celular: Etapa 2.6b: Adición de las sales de lisis | Título de floculación (Ph. Eur. 2.7.27 Prueba de Ramon) | > 36 Lf/mL | Cuantificar el título de la toxina |
| Cosecha: Etapa 2.7c: Diafiltración | Título de floculación (Ph. Eur. 2.7.27 Prueba de Ramon) | Sin criterios de aceptación | Permitir ajustar el título al comienzo del paso de purificación |





4 Medios de cultivo, tampones y otros aditivos empleados durante el cultivo celular y la cosecha

4.1 Medios de cultivo empleados durante la fermentación de *Haemophilus influenzae* tipo b y otros aditivos utilizados para la cosecha del polisacárido

4.1.1 Caldo de tripcasa de soja

Este medio ya está esterilizado y listo para usar en tubos.

Peptona de caseína

Peptona de soja

Cloruro de sodio

Fosfato dipotásico

Glucosa

Agua purificada

El pH de este medio es de 7,1 a 7,5.

4.1.2 Medio sólido (agar de carbón vegetal)

Agar de carbón vegetal (elaborado con infusión de corazón de buey y peptona porcina)

Agua purificada

Sangre de caballo desfibrinada

El agar de carbón vegetal en polvo se mezcla con agua purificada y este preparado se esteriliza con vapor a alta temperatura. Luego se añade la sangre de caballo desfibrinada y el medio se calienta a $+80\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$ durante 15 minutos.

4.1.3 Medio líquido

Este medio está constituido por 2 componentes, 1) y 2), que se preparan como se describe a continuación.

1) Medio base:

Hidrolizado ácido de caseína

Dihidrogenofosfato de sodio dihidrato ($2\text{H}_2\text{O}$)

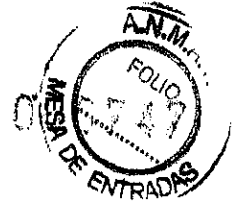
Fosfato disódico dodecahidrato ($12\text{H}_2\text{O}$)

Solución de lactato de sodio al 60 %

L-cistina



L-Triptófano
CaCl₂, 2H₂O
(NH₄)₂ SO₄
MgSO₄, 7H₂O
HCl
Agua purificada



Este componente (1) se esteriliza con calor o por filtración en una membrana de 0,22 µm.

2) Medio adicional

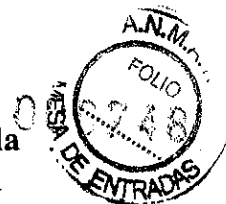
Este medio está constituido por dos componentes:

- Solución A/C:
 - Extracto de levadura ultrafiltrado
 - Dinucleótido de nicotinamida adenina
- Solución B:
 - Sal disódica de protoporfirina IX sintética
 - Glucosa

Estos 2 componentes (soluciones A/C y B) se mezclan a temperatura ambiente y se agregan al medio base mediante filtración de 0,2 µm.

4.1.4 Otros

- Solución de formaldehído (36 % p/p)
- Solución de cetrimida (bromuro de hexadeciltrimetil amonio)
- Antiespumante (opcional durante las etapas de fermentación en caso de producirse espuma)



4.2 Medios de cultivo, tampones y otros aditivos empleados durante la fermentación de *Clostridium tetani* y cosecha de la toxina tetánica

4.2.1 Medio de tioglicolato y resazurina

Este medio viene listo para usar.

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 a alta temperatura.

4.2.2 Medio de Massachusetts

Triptona V

Infusión de corazón de buey previamente ultrafiltrada (50 g/L)

Glucosa anhidra

Cloruro de sodio

Fosfato disódico, $12H_2O$

Fosfato monopotásico $2H_2O$

Sulfato de magnesio, $7H_2O$

Sulfato ferroso, $7H_2O$

L-cistina

L-Tirosina

Uracilo

HCl de tiamina (B1)

Riboflavina (B2)

Pantotenato de calcio (B5)



Clorhidrato de piridoxina (B6)

Biotina

Cianocobalamina

Ácido pirídico 2-6 dicarboxílico

Péptidos N3

HCl concentrado

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.

4.2.3 Tampón de fosfato disódico (0,07 M), pH 8,2

Fosfato disódico dodecahidrato ($12H_2O$)

HCl concentrado

Agua purificada

4.2.4 Otros

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



3.2.S.2.2

Reacciones de Purificación y Modificación - PRP-T

| | |
|---|---|
|  |  |
| ROXANA MONTEMILONE | CHRISTIAN DOMINGUEZ |
| DIRECTORA TÉCNICA | APODERADO |
| SANOFI PASTEUR S.A. | SANOFI PASTEUR S.A. |

