



3.2.S.2.5

Validación y/o Evaluación del Proceso - HBsAg


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
COORDINADOR
SANOFI PASTEUR S.A.

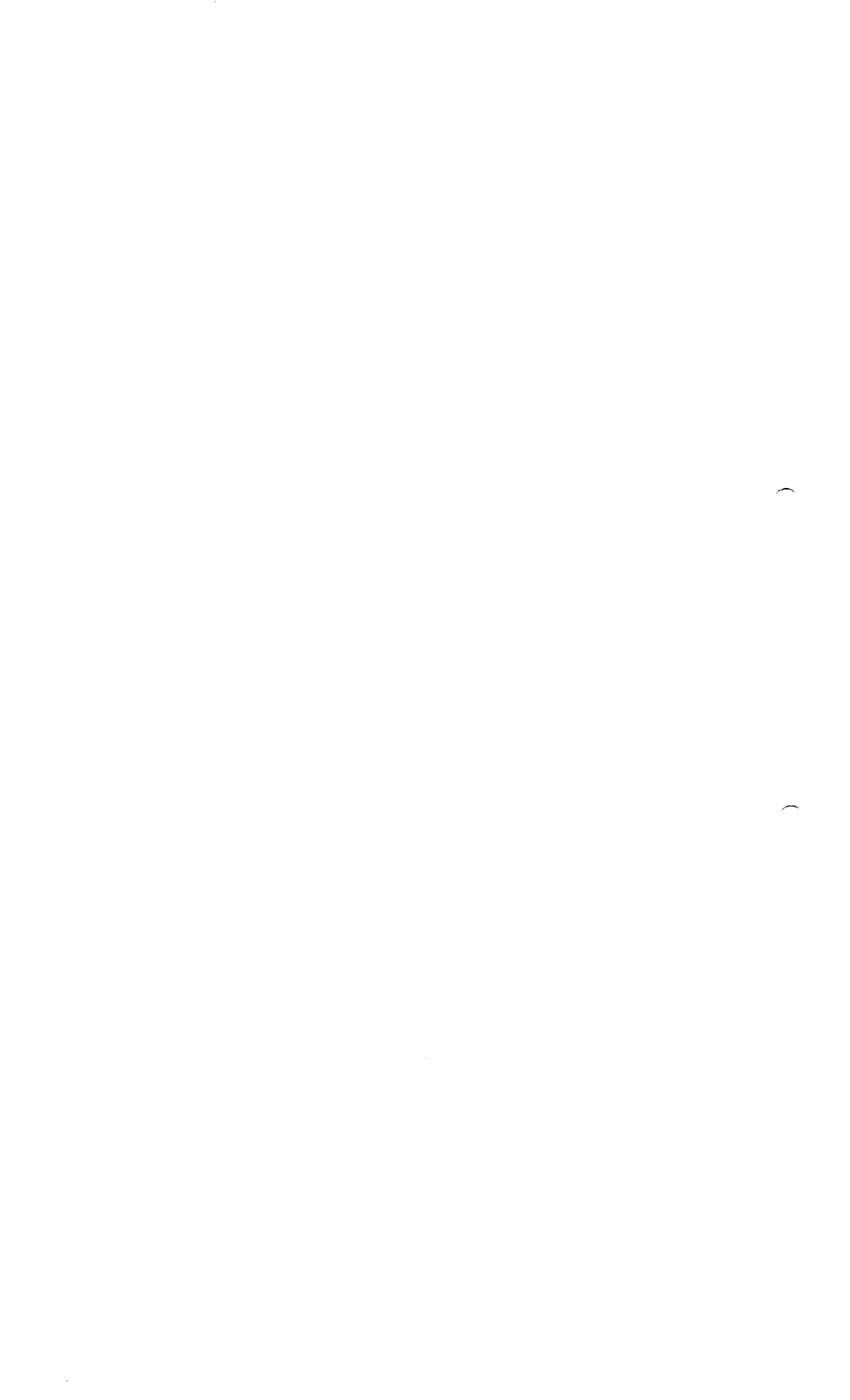




Sección 3.2.S.2.5 - Validación y/o evaluación del proceso

Índice

Lista de tablas	3
Lista de figuras	4
1 Introducción.....	5
2 Lotes de uniformidad.....	7
3 Validación del proceso de fermentación.....	8
3.1 Introducción	8
3.2 Principio.....	8
3.3 Parámetros de producción.....	8
3.4 Controles durante el proceso.....	8
3.5 Prueba adicional.....	8
3.6 Discusión y conclusión	10
4 Validación del proceso de cosecha	11
4.1 Introducción	11
4.2 Principio.....	11
4.3 Parámetros de producción.....	11
4.4 Controles durante el proceso.....	11
4.5 Prueba adicional.....	11
4.6 Discusión y conclusión	15
5 Validación del proceso de purificación y maduración.....	16
5.1 Introducción	16
5.2 Principio.....	16
5.3 Parámetros de producción.....	16
5.4 Controles durante el proceso.....	16
5.5 Resultados adicionales.....	16





5.6	Pruebas de control de calidad	17
5.7	Discusión y conclusión	24
6	Evaluación del rendimiento del proceso.....	25
6.1	Rendimiento del proceso en 30 lotes	25
6.2	Conclusión	25
7	Conclusión.....	26
8	Validación de la limpieza y estudio de la vida útil de la columna de cromatografía de intercambio iónico (IEC).....	27
8.1	Validación de la limpieza de la columna de IEC.....	27
8.1.1	Principio de validación de la limpieza.....	27
8.1.2	Resultados de validación de la limpieza.....	29
8.1.2.1	Prueba A: Verificación química.....	29
8.1.2.2	Prueba B: Verificación del proceso de sanitización.....	29
8.1.2.3	Prueba C: Verificación del proceso de limpieza.....	30
8.1.2.4	Prueba D: Verificación del tiempo máximo de almacenamiento.....	30
8.1.3	Conclusión.....	31
8.2	Estudio de la vida útil de la columna de IEC.....	31
8.2.1	Principio de validación del estudio de la vida útil.....	31
8.2.2	Resultados de los parámetros del proceso incluidos en la validación de la vida útil.....	32
8.2.3	Parámetros de relleno incluidos en la validación de la vida útil	36
8.2.4	Conclusión.....	39
9	Validación de la limpieza y estudio de la vida útil de la columna de cromatografía de filtración en gel (GFC).....	40
9.1	Validación de la limpieza de la columna de GFC.....	40
9.1.1	Principio de validación de la limpieza.....	40
9.1.2	Resultados de validación de la limpieza.....	42
9.1.2.1	Prueba A: Verificación del proceso de limpieza.....	42
9.1.2.2	Prueba B: Verificación del proceso de sanitización.....	42
9.1.2.3	Prueba C: Verificación química.....	43
9.1.2.4	Prueba D: Verificación del tiempo máximo de almacenamiento.....	43
9.1.3	Conclusión.....	44



Lista de tablas

Tabla 1: Lotes de uniformidad7

Tabla 2: Parámetros de producción registrados durante el proceso de fermentación de *Hansenula polymorpha*9

Tabla 3: Resultados de los controles obtenidos durante el proceso de fermentación de *Hansenula polymorpha*10

Tabla 4: Prueba de caracterización adicional realizada durante el proceso de fermentación de *Hansenula polymorpha*10

Tabla 5: Parámetros de producción registrados durante el proceso de cosecha del HBsAg12

Tabla 6: Resultados de los controles obtenidos durante el proceso de cosecha de HBsAg13

Tabla 7: Resultados de la prueba adicional durante el proceso de cosecha de HBsAg14

Tabla 8: Parámetros de producción registrados durante el proceso de purificación y maduración del HBsAg18

Tabla 9: Resultados de los controles durante el proceso obtenidos en el proceso de purificación y maduración del HBsAg21

Tabla 10: Resultados adicionales para los parámetros de producción y pruebas realizadas durante el proceso de purificación y maduración del HBsAg22

Tabla 11: Resultados de control de calidad de los 5 lotes de uniformidad23

Tabla 12: Contenido de HBsAg por paso25

Tabla 13: Pruebas realizadas con los lotes del estudio de validación de limpieza27

Tabla 14: Resultados de la validación química de la limpieza29

Tabla 15: Resultados del monitoreo microbiológico luego del proceso de sanitización29

Tabla 16: Resultados del monitoreo microbiológico luego del proceso de limpieza y almacenamiento30

Tabla 17: Resultados del monitoreo microbiológico luego del tiempo máximo de almacenamiento30

Tabla 18: Pruebas realizadas con los lotes considerados para el estudio de validación de limpieza40

Tabla 19: Resultados del monitoreo microbiológico luego del proceso de limpieza y almacenamiento42

Tabla 20: Resultados del monitoreo microbiológico luego del proceso de sanitización42

Tabla 21: Resultados de la validación química de la limpieza43

Tabla 22: Resultados del monitoreo microbiológico después del tiempo máximo de almacenamiento43





Lista de figuras

Figura 1: Cantidad de HBsAg (g) obtenido después del paso de IEC.....	32
Figura 2: Cantidad de proteínas (%) obtenida después del paso de IEC.....	33
Figura 3: Proporción de absorbancia A280 nm/A260 nm obtenida en el producto después del paso de IEC.....	33
Figura 4: Pureza (%) del producto obtenido después del paso de IEC	34
Figura 5: Rendimiento de HBsAg (%) obtenido después del paso de IEC.....	34
Figura 6: Rendimiento de lípidos (%) obtenido después del paso de IEC	35
Figura 7: Factor de purificación (proporción de pureza antes y después de la IEC).....	35
Figura 8: Área de flujo continuo de la columna de IEC.....	36
Figura 9: Presión máxima (bar) durante la equilibración de la columna	37
Figura 10: Presión máxima (bar) durante la limpieza de la columna.....	37
Figura 11: Presión máxima (bar) en la columna durante la elución.....	38
Figura 12: Placas teóricas de la columna	38
Figura 13: Asimetría de la columna	39





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

1 Introducción

La producción del antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) mediante la levadura recombinante *Hansenula polymorpha* puede dividirse en tres pasos principales de producción, aunque no existe ningún producto intermedio durante este proceso de elaboración:

- Fermentación de una cepa recombinante de *Hansenula polymorpha* para lograr una mayor densidad celular y expresión de la proteína de HepB;
- Cosecha: El HBsAg se desprende de la levadura mediante la fragmentación celular. Luego, el antígeno se separa de los restos celulares y se purifica en forma parcial para obtener un producto de desorbato clarificado ajustado con el que se sigue el procesamiento;
- Purificación y maduración: el HBsAg se purifica de manera consecutiva a través de 4 pasos principales (cromatografía de intercambio iónico, ultracentrifugación, diafiltración y cromatografía de filtración en gel). Al final del proceso, se obtiene una pureza igual o superior al 95 %. Después de la filtración final, se introduce un paso de maduración para garantizar la reproducibilidad del proceso con respecto a la maduración de las partículas.

Todo el proceso de elaboración se ha validado mediante la producción y el análisis de 5 lotes industriales (denominados lotes de uniformidad), para lo cual se evaluaron los siguientes puntos:

- Parámetros de producción: los definidos en la sección 3.2.S.2.2 Cultivo y cosecha celular y en la 3.2.S.2.2 Reacciones de purificación y modificación, y también los parámetros de producción adicionales definidos como importantes para respaldar el proceso de validación (vea las distintas tablas de esta sección).
- Controles durante el proceso (IPC): los definidos en 3.2.S.2.2 Cultivo y cosecha celular y en Reacciones de purificación y modificación (vea las distintas tablas de esta sección).
- Pruebas adicionales definidas como importantes para respaldar el proceso de validación (vea las distintas tablas de esta sección).
- Pruebas de control de calidad sobre el principio activo: las que se definen en la sección 3.2.S.4.1 Especificaciones.

Todos estos puntos se eligieron considerando el conocimiento sobre el proceso de elaboración acumulado durante las distintas fases del desarrollo de la elaboración presentadas en la sección 3.2.S.2.6 Desarrollo del proceso de elaboración.

También se evaluó el rendimiento durante el ejercicio de uniformidad y los resultados se compararon con los obtenidos durante la elaboración de la segunda serie de lotes de producción.

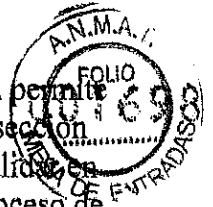
El estudio de validación de la uniformidad se basa particularmente en los resultados obtenidos en los pasos críticos del proceso que se han definido y presentado en la sección 3.2.S.2.4 Controles de los pasos críticos e intermedios.

Se validaron los pasos de producción a fin de demostrar que el proceso de elaboración permite producir de manera uniforme HBsAg de la calidad requerida (como se describe en la sección 3.2.S.4.1 Especificaciones) y se definió la estrategia de validación del proceso para validar en forma global todos los pasos del proceso de elaboración. Además, el desarrollo del proceso de elaboración respalda la robustez del proceso, que se incluye en la sección 3.2.S.2.6 Desarrollo del proceso de elaboración.

Asimismo, la validación de la eliminación de las impurezas se ha demostrado mediante estudios específicos de depuración que se presentan en la sección 3.2.S.3.2 Impurezas. Estos estudios justifican que el proceso puede producir de manera efectiva y reproducible un principio activo que cumple con los atributos de calidad en relación con a las impurezas.

Por último, se han evaluado y validado la limpieza, sanitización, almacenamiento y ciclo de vida de las columnas de cromatografía mediante estudios específicos que se presentan al final de esta sección.

Las secciones siguientes describen estos resultados de validación, e incluyen su discusión y conclusión.







2 Lotes de uniformidad

Los lotes utilizados en el estudio de uniformidad pertenecen a la familia de lotes de la tercera serie de producción (lotes ACxxx), según la lista de la tabla 1. Estos lotes se produjeron siguiendo el proceso de elaboración que se describe en las secciones 3.2.S.2.2 Cultivo y cosecha celular y 3.2.S.2.2 Reacciones de purificación y modificación.

Tabla 1: Lotes de uniformidad

Lote	Fecha de producción	Planta de producción	Tamaño de lote	Estudio
AC002	07 dic 2007	Pilar (Argentina)	Fermentación industrial = 50 L	Uniformidad del proceso
AC004	26 dic 2007	Pilar (Argentina)	Fermentación industrial = 50 L	Uniformidad del proceso
AC005	29 dic 2007	Pilar (Argentina)	Fermentación industrial = 50 L	Uniformidad del proceso
AC006	04 ene 2008	Pilar (Argentina)	Fermentación industrial = 50 L	Uniformidad del proceso
AC007	22 mar 2008	Pilar (Argentina)	Fermentación industrial = 50 L	Uniformidad del proceso

El estudio de uniformidad se evaluó considerando los lotes AC002 a AC007. A raíz de una falla de los equipos, el lote AC003 fue rechazado y reemplazado por el lote AC007 sin que se afectara la uniformidad:

- Lote AC003: este lote fue rechazado debido a un problema técnico. Se produjo un bloqueo en el filtro de la línea de agua refrigerada, lo cual redujo la velocidad de flujo durante el proceso de fermentación en el fermentador industrial, con el consiguiente aumento de la temperatura. Este problema técnico no está relacionado con el proceso en sí y no se considera que el rechazo del lote AC003 haya afectado la uniformidad.





3 Validación del proceso de fermentación

3.1 Introducción

Esta sección abarca la validación del proceso de fermentación de *Hansenula polymorpha*, desde la preparación del primer precultivo (paso 1.1) hasta la fermentación industrial (paso 1.3) para expresar el gen de HBsAg.

3.2 Principio

Durante el programa de validación, en todos los pasos del proceso de fermentación, todos los parámetros de producción deben circunscribirse a los rangos operativos y los controles durante el proceso deben cumplir con los criterios de aceptación según se describe en las secciones 3.2.S.2.2 Cultivo y cosecha celular y 3.2.S.2.2 Reacciones de purificación y modificación.

Los siguientes capítulos presentan los valores de los parámetros de producción, los resultados de los controles durante el proceso y los resultados de las pruebas adicionales observados durante el proceso de fermentación.

3.3 Parámetros de producción

Los valores de los parámetros de producción registrados durante el proceso de fermentación de *Hansenula polymorpha* se presentan en la tabla 2.

Todos los valores cumplen con los rangos operativos definidos.

3.4 Controles durante el proceso

Los resultados de los controles durante el proceso obtenidos durante el proceso de fermentación de *Hansenula polymorpha* se presentan en la tabla 3.

Todos los resultados cumplen con los criterios de aceptación definidos.

3.5 Prueba adicional

Se llevó a cabo una prueba de caracterización adicional de pureza microscópica al final del segundo precultivo (paso 1.2) con los 5 lotes de uniformidad; vea la tabla 4. Esta prueba adicional se realizó para verificar en forma preliminar que el cultivo celular no estuviera contaminado con otros microorganismos.

Todos los resultados cumplen con los criterios de aceptación definidos.



Tabla 2: Parámetros de producción registrados durante el proceso de fermentación de *Hansenula polymorpha*

Elaboración	Parámetros de producción	Valor objetivo	Rangos operativos	AC002	AC004	AC005	AC006	AC007
Etapa 1.1: 1.º preculativo	Temperatura*	30,0°C	+28,0 a +32,0°C	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0
	Duración*	NA	21-24 h	21	21	21	21	21
	Valor de DO*	NA	4,3 - 7,0	4,9	5,4	5,4	5,7	8,0†
Etapa 1.2: 2.º preculativo	Temperatura*	30,0°C	+28,0 a +32,0°C	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0
	Duración*	NA	43-51 h	46	47	47	47	47
Etapa 1.3: Cultivo industrial Fase de inducción	Temperatura*	30,0°C	+28,0 a +32,0°C	32,0	30,0	30,0	30,0	30,0
	Duración*	NA	20-22 h	20	20	20	20	20
	Agitación	650 rpm	550 - 750 rpm	650	650	650	650	650
	Aireación	75 L/min	65 - 85 L/min	75	75	75	75	75
Etapa 1.3: Cultivo industrial	Duración total*	NA‡	71 - 72 h	71	71	71	71	71

* Los resultados de estos parámetros de producción se presentan para información a fin de respaldar los resultados de validación, pero no formaron parte del estudio de uniformidad.

† Debido a un ensamble incorrecto del envase, se demoró la transferencia del 1.º al 2.º preculativo, motivo por el cual el valor de DO fue mayor. Dado que la inoculación del 2.º preculativo se lleva a cabo de acuerdo con la DO, se adaptó el inóculo y no afectó el paso siguiente.

‡ NA = No se aplica.

ROXANA MONTEILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.







Tabla 3: Resultados de los controles obtenidos durante el proceso de fermentación de *Hansenula polymorpha*

Etapa de elaboración	Prueba	Criterios de aceptación	AC002	AC004	AC005	AC006	AC007
Etapa 1.3: Cultivo industrial	Pureza microbiológica	Cumple (Ausencia de contaminación microbiana)	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
	Identificación de <i>H. polymorpha</i>	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple

Tabla 4: Prueba de caracterización adicional realizada durante el proceso de fermentación de *Hansenula polymorpha*

Etapa de elaboración	Prueba	Criterios de aceptación	AC002	AC004	AC005	AC006	AC007
Etapa 1.2: Segundo precultivo	Pureza microscópica	CumpleCumple	CumpleCumple	CumpleCumple	CumpleCumple	CumpleCumple	CumpleCumple

3.6 Discusión y conclusión

Los valores registrados para los parámetros de producción durante el proceso de fermentación de *Hansenula polymorpha* con 5 lotes industriales se encuentran dentro de los rangos operativos definidos previamente y en particular para la fase de inducción del cultivo industrial (paso 1.3), que es un paso crítico (vea 3.2.S.2.4 Controles de los pasos críticos e intermedios).

Los controles durante el proceso y la prueba adicional cumplen también con los criterios de aceptación definidos previamente.

En conclusión, el proceso de elaboración propuesto para el proceso de fermentación de *Hansenula polymorpha* a escala industrial se considera validado.

