



4 Validación del proceso de cosecha

4.1 Introducción

Esta sección cubre la validación de los pasos de cosecha de HBsAg, desde el lavado celular (paso 1.4) hasta la clarificación (paso 1.9) para obtener un producto desorbato clarificado.

4.2 Principio

Durante el programa de validación, en todos los pasos del proceso de cosecha, 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.

El siguiente capítulo presenta los valores de los parámetros de producción, los resultados de los controles durante el proceso y los resultados de las pruebas adicionales del proceso de cosecha.

4.3 Parámetros de producción

Los valores de los parámetros de producción estudiados durante el proceso de cosecha del HBsAg se presentan en la tabla 5.

Todos los valores cumplen con los rangos operativos definidos.

4.4 Controles durante el proceso

Los resultados de los controles durante el proceso obtenidos durante el proceso de cosecha de HBsAg se presentan en la tabla 6.

Todos los resultados cumplen con los criterios de aceptación definidos.

4.5 Prueba adicional

Los resultados de una prueba adicional realizada al final de este paso de clarificación se presentan en la tabla 7

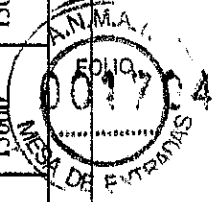
Esta prueba adicional, la proporción de absorbancia A_{280nm}/A_{260nm} , se lleva a cabo con vistas a verificar la eficiencia del paso de clarificación.

Todos los resultados cumplen con los criterios de aceptación definidos.



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

Pasos críticos de elaboración	Parámetros de producción	Valor objetivo	Rangos operativos	AC002	AC004	AC005	AC006	AC007
Etapa 1.4: Lavado celular	Temperatura* (3.º ciclo de lavado)	NA†	4,0°C a 15,0°C	7,0	7,6	7,8	8,5	7,2
	pH final*	> 6,5	NA†	6,9	6,9	6,8	6,8	6,8
	Conductividad final*	< 6,0 mS/cm	NA†	4,9	5,0	4,9	4,7	4,4
Etapa 1.5: Fragmentación celular	Temperatura	NA	4,0°C a 15,0°C	11,2 a 12,6	10,4 a 11,0	9,4 a 11,4	11,1 a 12,2	11,3 a 12,3
	Concentración de la solución de inhibidor de proteasa	0,56 g/Kg DCW†	0,43 - 0,67 g/Kg	0,56	0,56	0,56	0,56	0,56
	Presión	1550 Bar	1500 - 1600 bar	1530 a 1560	1540 a 1550	1530 a 1550	1550	1525 a 1550
	Concentración de la solución detergente§	0,102 g/g DCW†	0,063 - 0,120 g/g	0,102	0,102	0,101	0,102	0,102
Etapa 1.6: Precipitación de PEG	Concentración final de PEG§	0,85 g/g DCW†	0,70 - 1,00 g/g	0,85	0,85	0,84	0,85	0,85
	Temperatura*	NA†	4,0°C a 15,0°C	8,2	8,2	6,1	7,6	8,8
	Duración de la precipitación*	NA†	12 - 24 h	17	16	14	17	16
	Concentración final de dióxido de silicio coloidal	1,0 - 1,6% (p/p)	0,8 - 1,6% (p/p)	1,3	1,2	1,3	1,3	1,5
Etapa 1.7: Adsorción y lavado	Temperatura*	NA†	4,0°C a 15,0°C	8,4	7,9	7,0	7,4	8,2
	Duración de la adsorción	NA†	12 - 24 h	18	18	18	18	18
	Duración de la desorción a la temperatura de desorción	90 min	90-100 min	91	91	93	93	92
Etapa 1.8: Desorción	Velocidad de centrifugación	15000 rpm (≈ 22400 g)	NA	15000	15000	15000	15000	15000



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



Pasos críticos de elaboración	Parámetros de producción	Valor objetivo	Rangos operativos	AC002	AC004	AC005	AC006	AC007
	Temperatura*	10°C	4°C a 15°C	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
	Velocidad de flujo	100 mL/min	Rango operativo: 100 – 150 mL/min	108	120	100	100	106

* 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.

† NA: No se aplica.

‡ DCW: Peso celular seco

§ CPP (parámetros críticos del proceso), según se definen en la sección 3.2.S.2.6 Desarrollo del proceso de elaboración.

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

Paso de elaboración	Prueba	Criterios de aceptación	AC002	AC004	AC005	AC006	AC007
Etapa 1.6: Precipitación de PEG	pH final del sobrenadante	6,0 - 7,0	6,4	6,3	6,2	6,4	
	pH	8,1 - 8,5 (objetivo = 8,3)	0 min	8,2	8,1	8,2	8,2
90 min*			8,2	8,1	8,1	8,3	

* Control durante el proceso adicional realizado solamente en el marco del estudio de uniformidad

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINIGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.





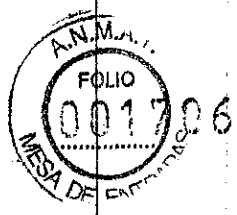


Tabla 7: Resultados de la prueba adicional durante el proceso de cosecha de HBsAg

Paso de elaboración	Parámetros de producción	Valor objetivo	Criterios de aceptación	AC002	AC004	AC005	AC006	AC007
Etapas 1.9: Clarificación	Proporción mínima A280 nm/A260 nm*	NA†	≥ 0,9	1,0	1,1	1,1	1,1	1,2

† NA: No se aplica.
 * A = absorbancia


 ROXANA MONTEMILONE
 DIRECTORA TÉCNICA
 SANOFI PASTEUR S.A.

 CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
 PROPIETARIO
 SANOFI PASTEUR S.A.





4.6 Discusión y conclusión

Los valores registrados para los parámetros de producción durante el proceso de cosecha de HBsAg en 5 lotes industriales se encuentran dentro de los límites de los rangos operativos previamente definidos, y en particular en relación con los pasos críticos, identificados en la sección 3.2.S.2.4 Controles de los pasos críticos e intermedios como fragmentación celular (paso 1.5), precipitación de PEG (paso 1.6), adsorción y lavado (paso 1.7) y desorción (paso 1.8).

Los resultados de 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 cosecha de HBsAg a escala industrial se considera validado.





5 Validación del proceso de purificación y maduración

5.1 Introducción

Esta sección cubre la validación del proceso de purificación y maduración del HBsAg, desde la cromatografía de intercambio iónico (paso 2.1) a la maduración (paso 3) para obtener el antígeno de HBs final purificado.

5.2 Principio

Durante el programa de validación, en todos los pasos del proceso de purificación y maduración, 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.

El siguiente capítulo presenta los valores de los parámetros de producción, los resultados de los controles durante el proceso y los resultados adicionales del proceso de purificación y maduración.

Los 5 lotes de HBsAg de uniformidad obtenidos (fin de la etapa 3) se analizaron finalmente de acuerdo con las especificaciones de liberación vigentes al momento de realizarse este estudio de uniformidad.

5.3 Parámetros de producción

Los valores de los parámetros de producción registrados durante el proceso de purificación y maduración del HBsAg se presentan en la tabla 8.

Todos los valores cumplen con los rangos operativos definidos.

5.4 Controles durante el proceso

Los resultados de los controles durante el proceso obtenidos en el proceso de purificación y maduración del HBsAg se presentan en la tabla 9.

Todos los resultados cumplen con los criterios de aceptación definidos.

5.5 Resultados adicionales

Los valores de los parámetros de producción adicionales observados durante la concentración de la fracción de IEC (paso 2.2), concentración del agrupamiento de KBr diafiltrado (paso 2.5), filtración final (paso 2.7) y los resultados de las pruebas adicionales realizadas durante el proceso de purificación y maduración se presentan en la tabla 10. Estos datos adicionales se utilizaron





durante el estudio de validación del proceso de purificación y maduración con vistas a verificar la eficiencia de los pasos estudiados.

Todos los resultados cumplen con los rangos operativos o los criterios de aceptación definidos.

5.6 Pruebas de control de calidad

Las características de los lotes de uniformidad de HBsAg se analizaron de acuerdo con las especificaciones de liberación vigentes al momento del estudio de uniformidad, a fin de evaluar la calidad del principio activo obtenido (vea la tabla 11).

Todos los resultados cumplen con los criterios de aceptación.


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.

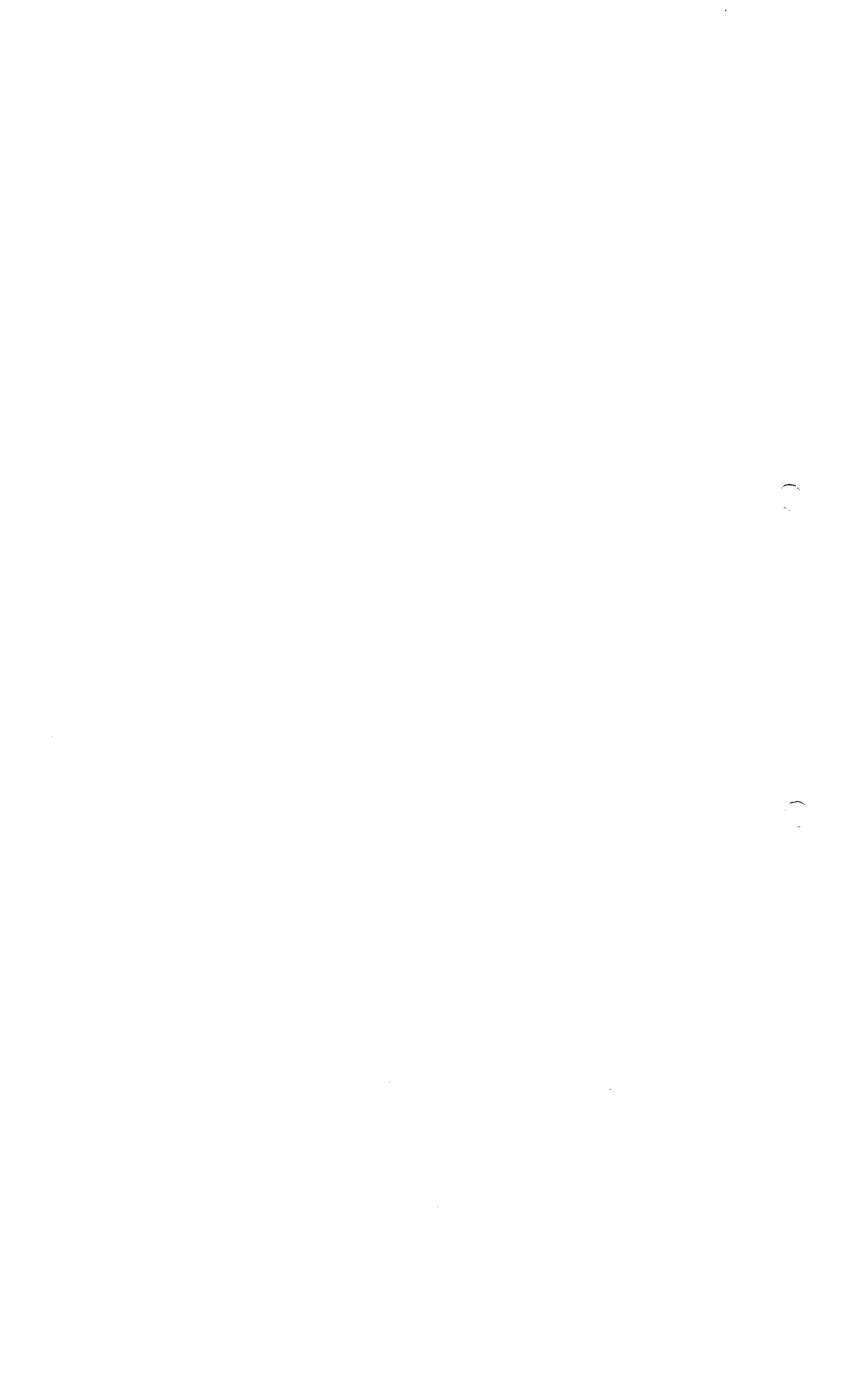


Tabla 8: Parámetros de producción registrados durante el proceso de purificación y maduración del HBsAg

Pasos críticos de elaboración	Parámetros de producción	Valor objetivo	Rangos operativos	AC002	AC004	AC005	AC006	AC007
Etapa 2.1: Cromatografía de intercambio iónico	Tipo de resina: DEAE*	NA†	NA†	DEAE	DEAE	DEAE	DEAE	DEAE
	Volumen de la columna	NA†	9-11 litros	10	10	10	10	10
	Conductividad del tampón de elución	NA†	21-23 mS/cm	22	23	22	21	22
	pH del tampón de elución	NA†	8,5-8,6	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5
	Conductividad al inicio de la recolección de la fracción†	NA†	≥ 2 mS/cm	2	2	2	2	2
	A _{280nm} S al inicio de la recolección de la fracción	NA†	≥ 4,5 UA**	5,1	5,0	5,0	5,1	5,0
	A _{280nm} al final de la recolección de la fracción†	1,5	≥ 1,2 UA**	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
	Temperatura de almacenamiento de la fracción	5°C	2-8°C	5	5	5	6	5
	Duración del almacenamiento de la fracción	NA†	≤ 80 h	65	65	65	65	65
	Peso final concentrado antes del lavado	NA†	100 g - 200 g	141,9	116,8	103,9	112,1	133,4
Etapa 2.2: Concentración de la fracción de IEC	Velocidad de centrifugación	31000 rpm (≈ 95700 g)	NA†	31000	31000	31000	31000	31000
	Duración de la centrifugación	65 h	60-70 h	67	68	68	68	68
Etapa 2.3: Ultracentrifugación	Velocidad de centrifugación de descarga	2000 rpm	NA†	2000	2000	2000	2000	2000
	Índice de refracción ajustado de la solución HBs/KBr	1,3625	1,3615 - 1,3625	1,3625	1,3623	1,3625	1,3625	1,3623
	Volumen de elución al inicio de la recolección de la fracción	100 mL	≥ 75 mL	100	100	100	100	100
	Volumen de elución al final de la recolección de la fracción	1000 mL	≤ 1050 mL	900	900	1000	1000	900

ROXANA MONTEMILONE CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
DIRECTORA TÉCNICA MODERADO
SANOFI PASTEUR S.A. SANOFI PASTEUR S.A.





Pasos críticos de elaboración	Parámetros de producción	Valor objetivo	Rangos operativos	AC002	AC004	AC005	AC006	AC007
Etapa 2.4: Diafiltración	Valor de corte de la membrana	100 Kd	NA†	100	100	100	100	100
	Naturaleza de la membrana	PES††	NA†	PES	PES	PES	PES	PES
	Volumen del tampón desalinizante	NA†	≥ 12 litros	12	12	12	12	12
	Temperatura de almacenamiento de la fracción	5°C	2 - 8°C	5,4	5,5	5,5	5,5	5,5
	Duración del almacenamiento de la fracción	NA†	≤ 96 h	67	89	88	66	89
	Tipo de gel	HMP††	NA†	HMP	HMP	HMP	HMP	HMP
Etapa 2.6: Cromatografía de filtración en gel	Diámetro de la columna	14 cm	NA†	14	14	14	14	14
	Carga de muestra	230 - 270 g	200 - 400 gSS	237	257	248	248	260
	Volumen equivalente de columna pasado al inicio de la recolección de la fracción†	0,43	≥ 0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43
	A _{280nm} al final de la recolección de la fracción†	1,1 UA**	≥ 1,0 UA**	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1
Etapa 2.7: Filtración final	Concentración ajustada***	1,50 mg/mL	Rango operativo: 0,75 - 1,75 mg/mL.†††	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50
Etapa 3: Maduración	Duración	17 días	14 - 21†††	17	21	17	17	17

* DEAE = resina dietilaminoetilo

† NA: No se aplica.

†† CPP (parámetros críticos del proceso), según se definen en la sección 3.2.S.2.6 Desarrollo del proceso de elaboración.

§ A = absorbancia

** UA = unidades de absorción

††† PES = polietersulfona

HMP = polímero metacrílico hidroxilado

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
COORDINADOR
SANOFI PASTEUR S.A.





sanofi pasteur

Antígeno de superficie de la hepatitis B

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

§§ Rango definido en el momento del estudio de uniformidad

*** CPP (parámetro crítico del proceso), según se define en la sección 3.2.S.2.6 Desarrollo del proceso de elaboración.

††† Rango operativo válido al momento del estudio de validación

‡‡‡ Este rango operativo de la duración de la maduración era el que estaba vigente al momento de realizarse el estudio de uniformidad y no concuerda exactamente con la duración de la maduración declarada en la sección 3.2.S.2.2 Reacciones de purificación y modificación. Vea las explicaciones sobre esta evolución de la maduración en la sección 3.2.S.2.6 Desarrollo del proceso de elaboración.


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.

A. 0305014

Información: confidencial/proprietaria

Página 20 de 44





Tabla 9: Resultados de los controles durante el proceso de purificación y maduración del HBsAg

Paso de elaboración	Prueba	Criterios de aceptación	AC002	AC004	AC005	AC006	AC007
Etapa 2.1: Cromatografía de intercambio iónico	pH	8,1 - 8,5	8,2	8,2	8,2	8,2	8,2
	Conductividad	5,9 - 6,9 mS/cm (objetivo = 6,4 mS/cm)	6,6	6,8	6,5	6,6	6,6
	DO _{600 nm} del desorbato clarificado/DO _{600 nm} del desorbato crudo*	≤ 0,62 UA	0,54	0,50	0,44	0,47	0,53
Etapa 2.4: Diafiltración	Pureza	≥ 75 %	85	86	87	91	87
	Contenido de HBsAg total	≥ 4,57 g	7,6	8,4	8,8	8,9	8,9
	Concentración de KBrf	< 10 mg/L (límite de cuantificación)	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Etapa 2.6: Cromatografía de filtración en gel	Carga microbiana	≤ 500 UFC/100 mL	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
Etapa 3: Maduración	Monómero libre a los 14 días§	≤ 3 %	< 2	3	< 2	< 2	< 2

* Los criterios de aceptación de este control durante el proceso no estaban definidos al momento de realizarse el estudio de uniformidad, pero los resultados cumplen con los criterios de aceptación actuales.

† La concentración de KBrf estaba definida como control durante el proceso al momento de efectuarse el estudio de uniformidad, pero actualmente no lo es.

‡ UFC = unidad formadora de colonias

§ Este control durante el proceso se determinó después de 14 días al momento de realizarse el estudio de uniformidad. Esto no concuerda exactamente con la duración de la maduración declarada en la sección 3.2.S.2.2 Reacciones de purificación y modificación. Vea las explicaciones sobre esta evolución de la duración de la maduración en la sección 3.2.S.2.6 Desarrollo del proceso de elaboración.

ROXANA MONTEILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.



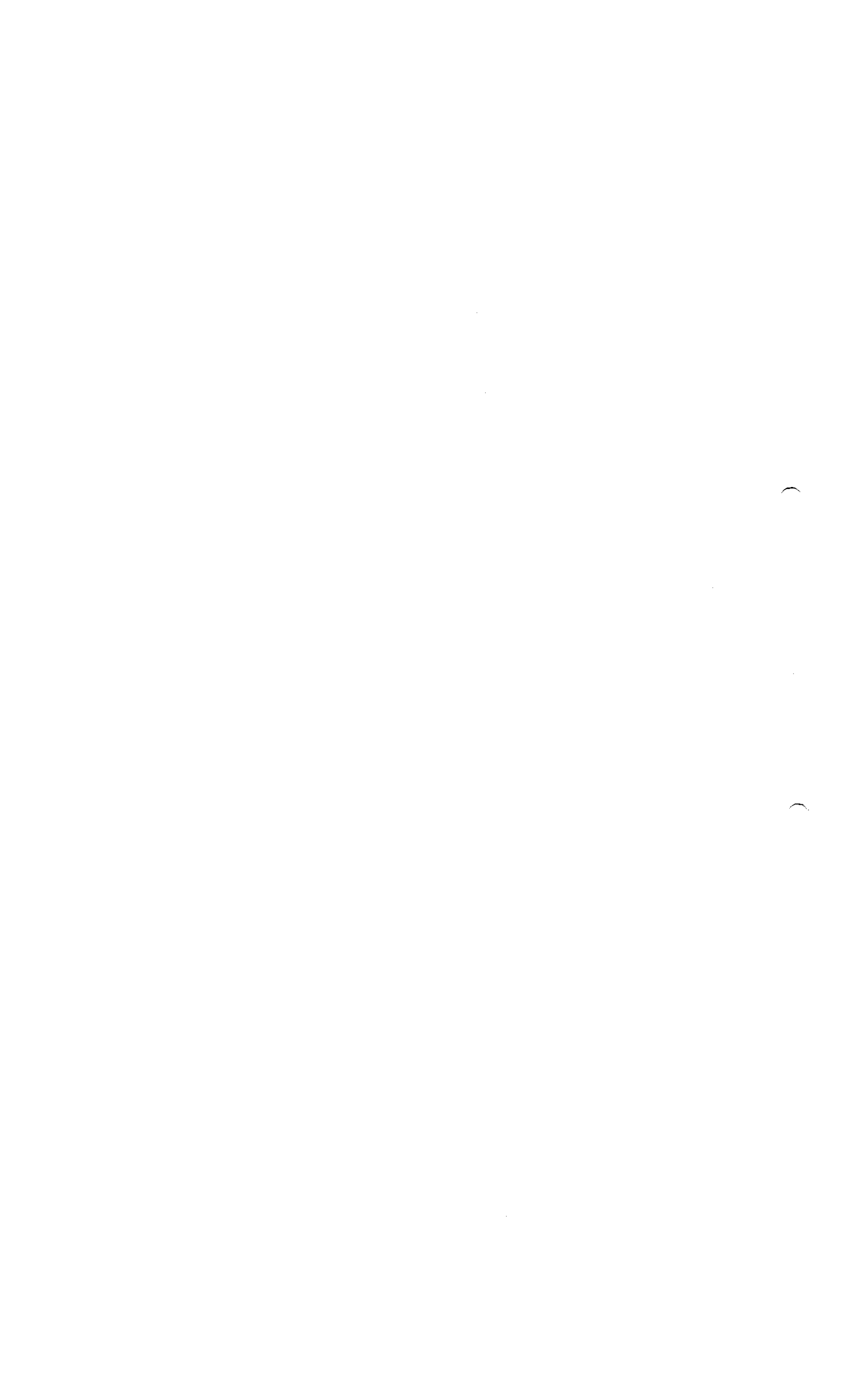




Tabla 10: Resultados adicionales para los parámetros de producción y pruebas realizadas durante el proceso de purificación y maduración del HBsAg

Paso de elaboración	Parámetros de producción	Valor objetivo	Criterios	AC002	AC004	AC005	AC006	AC007
Etapa 2.1: Cromatografía de intercambio iónico	Proporción A280 nm/A260 nm*	NA†	Criterios de aceptación: ≥ 1,0 UA‡	1,3	1,4	1,3	1,4	1,5
Etapa 2.4: Diafiltración	Proporción A280 nm/A260 nm*	NA†	Criterios de aceptación: ≥ 1,5 UA‡	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6
	Pureza	NA†	Criterios de aceptación: ≥ 90 %	94	93	94	95	95
	Contenido de HBsAg total	NA†	Criterios de aceptación: ≥ 1483 mg	5193	6355	4795	5885	6171
Etapa 2.5: Concentración del agrupamiento de KBr diafiltrado	Peso mínimo del concentrado antes del lavado	100,0 g	Rango operativo: ≥ 90,0 g	116,7	105,2	110,3	101,7	109,3
Etapa 2.6: Cromatografía de filtración en gel	Proporción A280 nm/A260 nm*	NA†	Criterios de aceptación: ≥ 1,5 UA‡	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6
Etapa 2.7: Filtración final	Punto de burbujeo de la unidad de filtración	NA†	Criterios de aceptación: ≥ 3450 mbar	3450	3500	3600	3700	3600
	Tamaño de poro del filtro	0,22 µm	NA†	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22
	Naturaleza de la membrana del filtro	PVDF§	NA†	PVDF	PVDF	PVDF	PVDF	PVDF

* A = absorbancia

† NA = No se aplica.

‡ UA = unidades de absorción

§ PVDF = fluoruro de polivinilideno

