



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

Pruebas*	Criterios de aceptación*	AC002	AC004	AC005	AC006	AC007
Aspecto	Solución opalescente, levemente turbia y amarillenta	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Medición del pH	6,0 – 8,0	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9
Contenido proteico, método de Lowry	0,75 – 1,75 mg/mL	1,49	1,46	1,45	1,39	1,45
Contenido de HBsAg	≥ 0,7 mg de HBsAg/mg de proteínas totales	1,1	1,1	1,0	1,0	1,2
Contenido de carbohidratos	≤ 60 µg de carbohidratos/mg de proteínas totales	39	33	33	35	32
Contenido de lípidos	0,3 – 1,4 mg de lípidos/mg de proteínas totales	0,8	0,8	0,8	0,7	0,8
Pureza mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras	≥ 95 %	97	96	96	98	97
Porcentaje de monómero libre (SDS-PAGE en condiciones reductoras)	≤ 3 %	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Identificación del antígeno de HBs (Western blot)	Bandas mayoritarias: monómero alrededor de 23 kDa y bandas que corresponden al dímero alrededor de 46 kDa (observadas juntas o separadas) Eventualmente, presencia de trímero alrededor de 65 kDa	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica	Ausencia de crecimiento microbiano	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Contenido de bromuros (mg/L)	< 10 mg/L (límite de cuantificación)	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10

* Pruebas y criterios de aceptación vigentes al momento de la liberación de los lotes de uniformidad





5.7 Discusión y conclusión

Los valores registrados para los parámetros de producción de los pasos del proceso de purificación y maduración del 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 fase de elución de la cromatografía de intercambio iónico (paso 2.1), ultracentrifugación (paso 2.3), cromatografía de filtración en gel (paso 2.6), filtración final (paso 2.7) y maduración (paso 3).

Los resultados de los controles durante el proceso cumplen con los criterios de aceptación definidos previamente.

Los resultados adicionales registrados cumplen con los rangos operativos o criterios de aceptación previamente definidos.

Por último, los resultados de control de calidad de los 5 lotes de uniformidad cumplen con los criterios de aceptación.

En conclusión, el proceso de elaboración propuesto para la purificación y maduración del HBsAg a escala industrial se considera validado y reproducible.





6 Evaluación del rendimiento del proceso

6.1 Rendimiento del proceso en 30 lotes

El rendimiento del proceso se evalúa en una cantidad representativa de 30 lotes de producción, incluidos los 5 lotes de uniformidad, considerando la cantidad obtenida en gramos de HBsAg en los distintos pasos del proceso de elaboración; vea la tabla 12.

Tabla 12: Contenido de HBsAg por paso

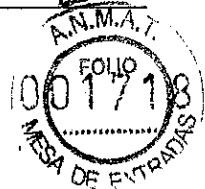
Paso	Cantidad de lotes	Promedio de HBsAg (g)	Desviación estándar (g)
Extracto celular crudo (paso 1.5)	30	25,6082	3,56803
Sobrenadante de PEG (paso 1.6)	30	16,3009	2,19311
Desorbato clarificado (paso 1.9)	30	11,8105	1,19883
Fracción de IEC concentrada (paso 2.2)	30	8,7189	0,94038
Agrupamiento de KBr diafiltrado (paso 2.4)	30	7,2894	1,34328
Antígeno de HBs purificado final (paso 3)	30	5,2076	1,17929

Este estudio, realizado con 30 lotes de la familia de la tercera serie de producción, confirma la uniformidad del rendimiento a través del proceso de elaboración del HBsAg.

6.2 Conclusión

La uniformidad de rendimiento del proceso se demuestra a lo largo de todo el proceso de elaboración del HBsAg. Por consiguiente, se justifica que ya no se realice un control de rutina del rendimiento durante la elaboración de cada lote comercial de HBsAg.





7 Conclusión

Los resultados presentados en esta sección demuestran que el proceso de elaboración para obtener el antígeno de HBs purificado final queda validado en todas las etapas: fermentación, cosecha, purificación y maduración de *Hansenula polymorpha*. Todos los parámetros del proceso, controles durante el proceso, pruebas adicionales y resultados de liberación de lote cumplen con los rangos operativos o los criterios de aceptación definidos.

La validación de la eliminación de las impurezas se ha demostrado en la sección 3.2.S.3.2 Impurezas y el proceso se considera eficiente para eliminar las impurezas provenientes del proceso de elaboración o de las materias primas.

Por último, se ha demostrado asimismo la uniformidad de rendimiento del proceso de elaboración.

En conclusión, la uniformidad de la producción de los lotes de antígeno de hepatitis B (HBsAg) de la familia de la tercera serie de producción, de acuerdo con el proceso de elaboración descrito en las secciones 3.2.S.2.2 Cultivo y cosecha celular y 3.2.S.2.2 Reacciones de purificación y modificación, se considera demostrada y reproducible.





8 Validación de la limpieza y estudio de la vida útil de la columna de cromatografía de intercambio iónico (IEC)

8.1 Validación de la limpieza de la columna de IEC

La finalidad de este estudio de validación consiste en demostrar la eficiencia, reproducibilidad y control del proceso de limpieza, proceso de sanitización y proceso de almacenamiento de la columna de cromatografía IEC.

8.1.1 Principio de validación de la limpieza

El proceso de limpieza, sanitización y almacenamiento que se utilizará para la columna de IEC rellena con resina DEAE se describe en la sección 3.2.S.2.2 Reacciones de purificación y modificación.

Luego de su uso, la columna de IEC se sanitiza en forma sucesiva con NaOH 0,5 M, se regenera con tampón de regeneración y se limpia con NaOH 0,5 M. Luego, el proceso de regeneración/limpieza se completa con un tampón con alto contenido de sal. La finalidad de este proceso es eliminar las impurezas fijadas a la resina DEAE. Posteriormente, la columna de IEC se almacena en isopropanol al 20% antes de su próximo uso.

La validación del proceso de limpieza se efectuó con 4 lotes industriales: AC017, AC018, AC019 y AC020, y con 1 lote técnico: EC001.

Estos lotes se produjeron en condiciones industriales y no se informó ningún desvío del protocolo de validación de limpieza.

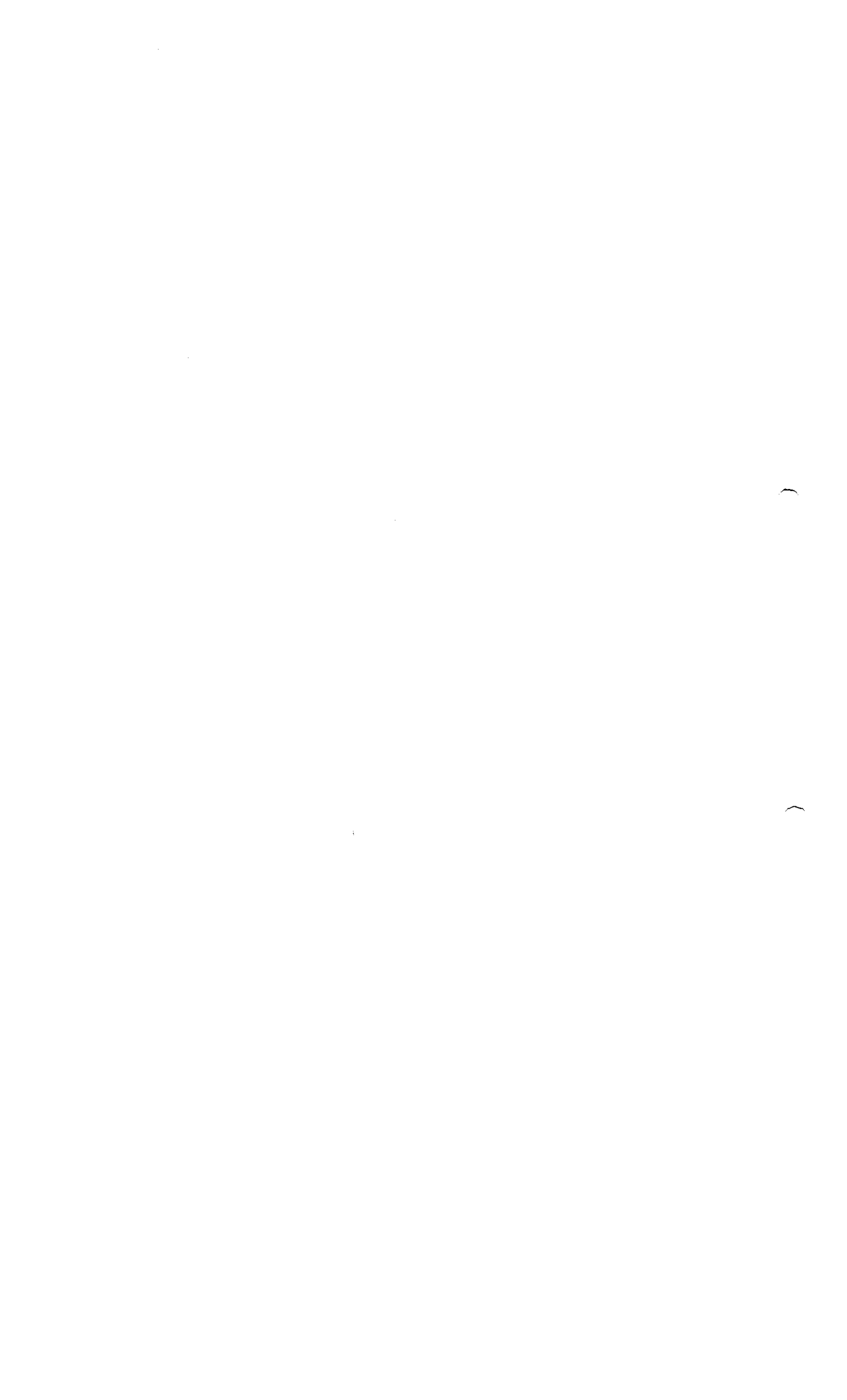
Se utilizó un método de matriz para determinar la prueba que se realizaría con cada lote, como se resume en la tabla 13.

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

Prueba	AC017 elaborado el 29 abr 08	AC018 elaborado el 6 mayo 08	AC019 elaborado el 13 mayo 08	AC020 elaborado el 20 mayo 08	EC001 elaborado el 27 mayo 08
A	*	X†	X	X	/
B	X	X	X	/	/
C	/	X	X	X	/
D	/	/	/	/	X

* Prueba no realizada

† Prueba realizada





Cada prueba se describe a continuación:

• **Prueba A, verificación química:**

Se midieron los valores de TOC y conductividad en tres fases del proceso de IEC.

- La prueba de TOC se realizó para detectar trazas potenciales del agente de almacenamiento (isopropanol) y el criterio de aceptación ≤ 25 ppm se basó en datos históricos;
- La prueba de conductividad se realizó para detectar la presencia potencial del agente de limpieza (NaOH) y el criterio de aceptación se basó en la conductividad de la solución utilizada para cada paso del procedimiento de IEC.

• **Prueba B, verificación del proceso de sanitización:**

Luego de la sanitización, mediante un monitoreo microbiológico (gérmenes aeróbicos), se verifica que todas las partes del sistema de la columna de cromatografía (patín y columna cromatográfica) cumplan con los criterios de aceptación predefinidos.

• **Prueba C, verificación del proceso de limpieza:**

Luego del almacenamiento, mediante un monitoreo microbiológico (gérmenes aeróbicos y endotoxinas), se verifica que todas las partes del sistema de la columna de cromatografía (patín y columna cromatográfica) cumplan con los criterios de aceptación predefinidos.

• **Prueba D, verificación del tiempo máximo de almacenamiento:**

Mediante un monitoreo microbiológico (gérmenes aeróbicos y endotoxinas), se verifica que después de un tiempo máximo de almacenamiento de 30 días todas las partes del sistema de la columna de cromatografía (patín y columna cromatográfica) sigan cumpliendo con los criterios de aceptación predefinidos.

En las pruebas B, C y D, el criterio de aceptación de:

- monitoreo microbiológico ≤ 10000 UFC/100 mL se basó en los criterios de aceptación del agua purificada;
- endotoxinas $\leq 2,5$ UI/mL se basó en criterios internos.

Las pruebas A, B y C se llevaron a cabo para asegurar que el procedimiento de almacenamiento de rutina actual de 6 días es adecuado, mientras que la prueba D se realizó para evaluar un tiempo máximo de almacenamiento, actualmente estimado en 30 días.





8.1.2 Resultados de validación de la limpieza

8.1.2.1 Prueba A: Verificación química

Los resultados obtenidos para los lotes AC018, AC019 y AC020 se informan en la tabla 14

Tabla 14: Resultados de la validación química de la limpieza

Fase de toma de muestras	Prueba	Criterios de aceptación	AC018	AC019	AC020
Después de la sanitización de la IEC	TOC	≤25 ppm	18,9	20,4	16,5
Después de la equilibración de la IEC con tampón de carga	Conductividad	< 2,0 mS/cm	1,391	1,393	1,384
Durante la equilibración con tampón de alto contenido de sal	Conductividad	< 50,0 mS/cm	47,024	48,183	47,334

Todos los resultados cumplen con los criterios de aceptación predefinidos.

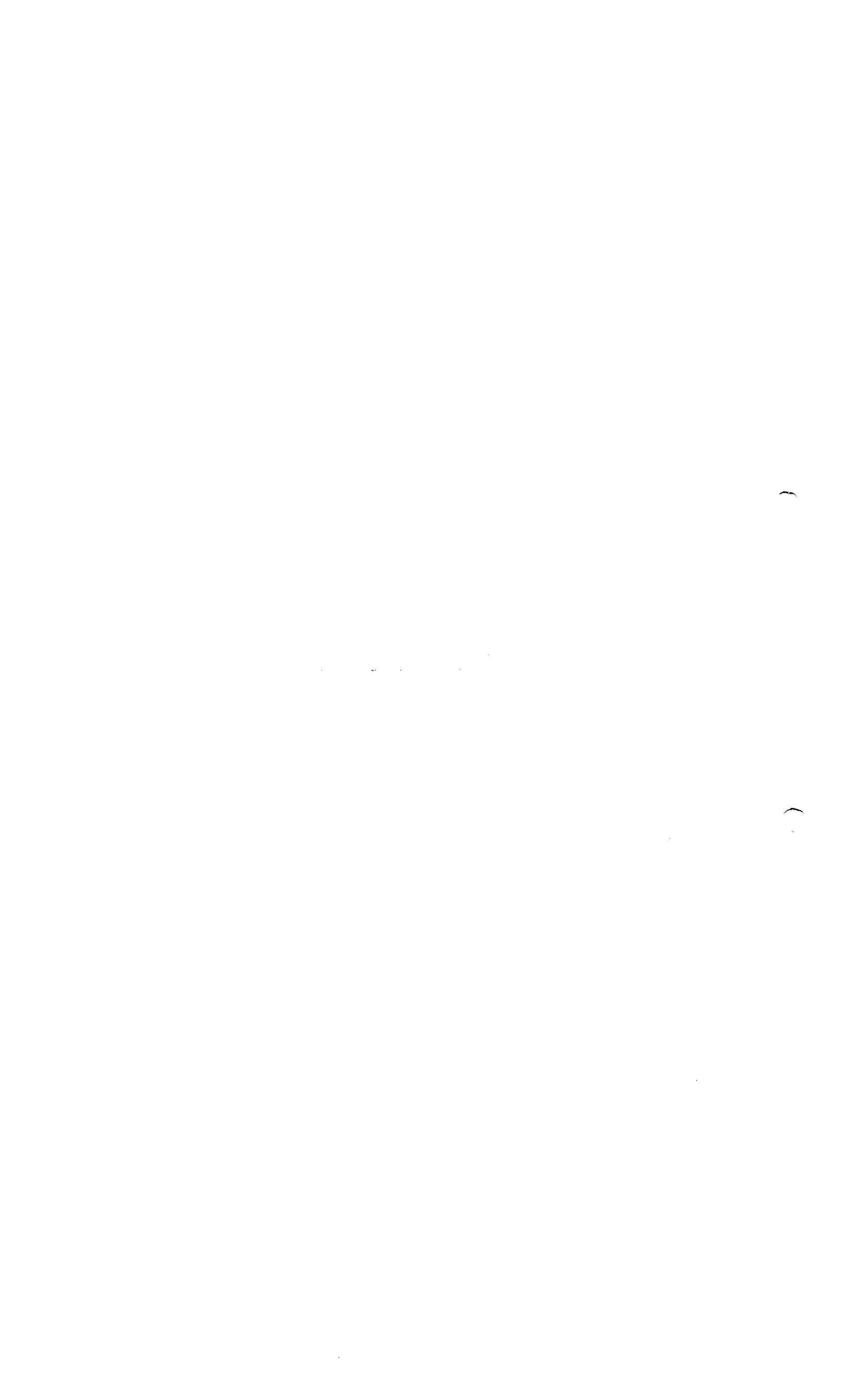
8.1.2.2 Prueba B: Verificación del proceso de sanitización

Esta prueba se llevó a cabo con los lotes AC017, AC018 y AC019. Los resultados se presentan en la tabla 15.

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

Fase de toma de muestras	Prueba	Criterios de aceptación	AC017		AC018		AC019	
			Patín	Columna	Patín	Columna	Patín	Columna
Después de la sanitización de la IEC	Gérmenes aeróbicos	≤ 10000 UFC/100 mL	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1

Todos los resultados cumplen con los criterios de aceptación predefinidos.





8.1.2.3 Prueba C: Verificación del proceso de limpieza

Esta prueba se llevó a cabo con los lotes AC018, AC019 y AC020. Los resultados se presentan en la tabla 16.

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

Fase de toma de muestras	Prueba	Criterios de aceptación	AC018		AC019		AC020	
			Patín	Columna	Patín	Columna	Patín	Columna
Después del almacenamiento de la IEC	Gérmenes aeróbicos	≤ 10000 UFC/100 mL	35	< 1	21	< 1	187	< 1
	Endotoxinas	≤ 2,5 UI/mL	< 0,05	< 1,00	< 0,05	< 1,00	< 0,05	< 1,00

Todos los resultados cumplen con los criterios de aceptación predefinidos.

8.1.2.4 Prueba D: Verificación del tiempo máximo de almacenamiento

Esta prueba se realizó con el lote EC001. Los resultados se presentan en la tabla 17.

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

Fase de toma de muestras	Prueba	Criterios de aceptación	EC001	
			Patín	Columna
Después del tiempo máximo de almacenamiento del material de la IEC (30 días)	Gérmenes aeróbicos	≤ 10000 UFC/100 mL	128	< 1
	Endotoxinas	≤ 2,5 UI/mL	< 0,05	/*

* /: Esta prueba no se realizó debido a un error de planificación/humano (no se tomó la muestra). No obstante, cuando se volvió a realizar la prueba de endotoxinas en el momento del tiempo máximo de almacenamiento (30 días) de la columna, se obtuvo un resultado que cumplía con los criterios correspondientes.

Todos los resultados del estudio de validación cumplen con los criterios de aceptación predefinidos y confirman un tiempo máximo de almacenamiento de 30 días para el material de IEC (patín y columna de cromatografía).





8.1.3 Conclusión

Todos los resultados obtenidos durante el estudio de validación del sistema de IEC (patín y columna de cromatografía) confirman lo siguiente:

- El procedimiento de limpieza es adecuado para la limpieza de rutina del sistema de IEC y cumple con todos los criterios de aceptación predefinidos;
- El procedimiento de sanitización es adecuado para el uso de rutina del sistema de IEC y cumple con todos los criterios de aceptación predefinidos;
- El procedimiento de almacenamiento de rutina es adecuado para un almacenamiento de 6 días y cumple con todos los criterios de aceptación predefinidos;
- Se evaluó el almacenamiento durante un máximo de 30 días y los resultados cumplieron con los criterios de aceptación. Por lo tanto, es probable que vuelva a evaluarse en el futuro la extensión del tiempo de almacenamiento de rutina.

8.2 Estudio de la vida útil de la columna de IEC

8.2.1 Principio de validación del estudio de la vida útil

La finalidad de este estudio es determinar mediante una validación concurrente realizada a escala industrial la cantidad máxima de ciclos de la resina DEAE utilizada en el paso de IEC del proceso de elaboración del HBsAg.

La vida útil se analizó considerando distintos atributos que indican el desempeño de la columna, como la cantidad de HBsAg, proporción A280 nm/A260 nm de la fracción de IEC, factor de purificación (igual a la proporción de la pureza después y antes de la IEC), HETP, presión y otros parámetros que se resumen a continuación. El rendimiento de la columna se evaluó mediante los gráficos de control de estos parámetros.

A continuación se presenta el estudio que valida la cantidad máxima de ciclos. Este estudio se llevó a cabo con 31 lotes industriales: 30 lotes comerciales desde el lote AC039 hasta el AC068 y 1 lote técnico EC005.



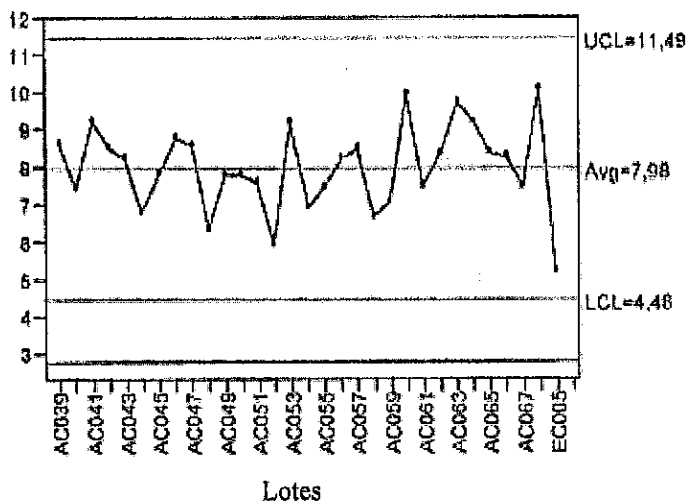
8.2.2 Resultados de los parámetros del proceso incluidos en la validación de la vida útil

Los resultados de los parámetros del proceso estudiados durante la validación de la vida útil se presentan gráficamente de la figura 1 a la figura 8.

En estas figuras:

- La línea verde representa el promedio (Avg) de los resultados obtenidos con los lotes considerados;
- Los límites de confianza: límite superior de control (UCL) y límite inferior de control (LCL), correspondientes a $Avg \pm 3SD$ (donde SD representa la desviación estándar de los resultados obtenidos con los lotes considerados), se indican con líneas rojas;
- La línea negra representa los criterios de aceptación del parámetro del proceso considerado, cuando tales criterios de aceptación hayan sido definidos previamente;
- Las cifras que marcan los puntos rojos se relacionan con el control del proceso estadístico.

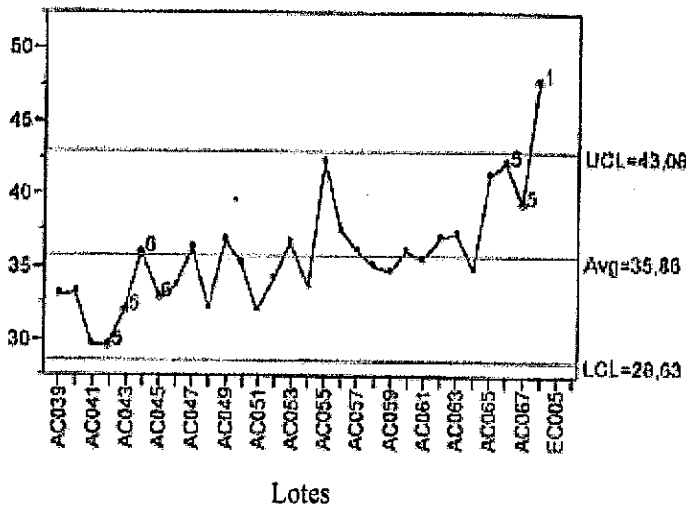
Figura 1: Cantidad de HBsAg (g) obtenido después del paso de IEC



Todos los resultados se encuentran dentro de los límites de confianza de los 31 lotes considerados.

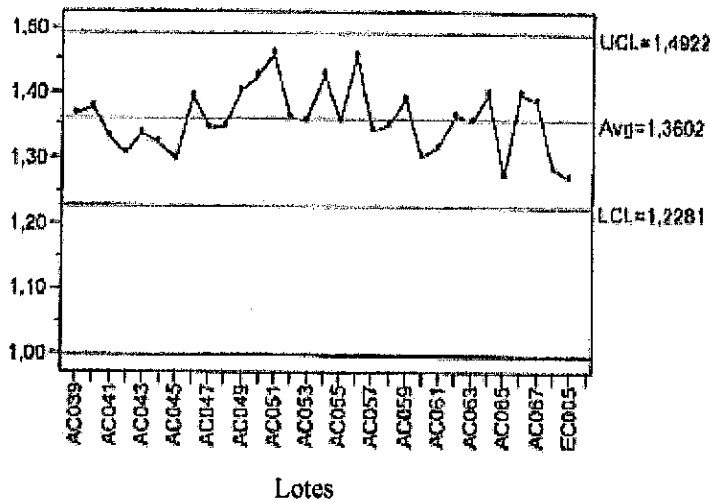


Figura 2: Cantidad de proteínas (%) obtenida después del paso de IEC



Todos los resultados se encuentran dentro de los límites de confianza, salvo el lote AC068. La cantidad de proteínas obtenidas del lote EC005 no se tomó en cuenta. En el lote AC068, el volumen de la fracción de IEC y la presión interna de la columna fueron más altos y quedaron fuera de los rangos de producción. Estos resultados se interpretaron como una obstrucción de la columna y una limpieza previa deficiente.

Figura 3: Proporción de absorbancia A280 nm/A260 nm obtenida en el producto después del paso de IEC



Todos los resultados se encuentran dentro de los límites de confianza de los 31 lotes considerados.

