



Tabla 2: Resumen de las distintas características del lote EC005

Características	Métodos	Valor del lote EC005	Valores esperados (rango definido)	Valores observados
Peso molecular de la partícula	HPSEC/LS	3167 kDa	[2941-8106] kDa	NA
Tamaño de la partícula	Microscopía electrónica	20-25 nm	NA	18-33 nm
Densidad de la partícula	Gradiente de sacarosa	1,14	NA	1,12-1,15
Composición de lípidos de la partícula: lípidos totales/proteínas	Gravimetría	1,5	NA	0,72-1,18
Composición de lípidos de la partícula: fosfolípidos/proteínas	Ensayo del fósforo	0,60	NA	0,30-0,54
Composición de lípidos de la partícula: ácidos grasos totales/proteínas	GC	0,64	NA	0,49-0,90
Composición de lípidos de la partícula: triglicéridos/proteínas	TLC, GC	0,03	0,02-0,28	0,02-0,28
Composición de lípidos de la partícula: composición de ácidos	TLC, GC	C16:0 14,6% C18:0 4,6% C18:1 32% C18:2 30%	NA	C16:0 13,2 – 17,8% C18:0 4,0 – 5,3% C18:1 29,1 – 37,2% C18:2 24,8 – 32,4%
Punto isoeléctrico de la partícula	Focalización isoeléctrica capilar	Pico pI: 5,07 pI alto: 5,42 pI bajo: 4,49	Pico pI: [4,81 - 5,76] pI alto: [5,16 - 6,18] pI bajo: [4,49 - 5,52]	NA
Antigenicidad de la partícula Mab 616A15	Resonancia de plasmones superficiales	ka (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ): 5,1 10 <sup>3</sup> kd (s <sup>-1</sup> ): 1,7 10 <sup>-4</sup> KD (M): 3,4 10 <sup>-8</sup>	ka (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ): [3,1 10 <sup>3</sup> - 4,5 10 <sup>4</sup> ] kd (s <sup>-1</sup> ): [1,7 10 <sup>-4</sup> - 8,8 10 <sup>-4</sup> ] KD (M): [6,7 10 <sup>-9</sup> - 1,5 10 <sup>-7</sup> ]	NA
Antigenicidad de la partícula Mab E3H35C16	Resonancia de plasmones superficiales	ka (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ): 1,1 10 <sup>4</sup> kd (s <sup>-1</sup> ): N/A KD (M): N/A	ka (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ): [4,6 10 <sup>3</sup> -2,8 10 <sup>4</sup> ]	NA
Antigenicidad de la partícula Mab RF-1	Resonancia de plasmones superficiales	ka (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ): 1,1 10 <sup>4</sup> kd (s <sup>-1</sup> ): 2,2 10 <sup>-4</sup> KD (M): 1,9 10 <sup>-8</sup>	ka (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ): [3,6 10 <sup>3</sup> -2,1 10 <sup>4</sup> ] kd (s <sup>-1</sup> ): [2,2 10 <sup>-4</sup> -4,0 10 <sup>-4</sup> ] KD (M): [1,1 10 <sup>-8</sup> -7,6 10 <sup>-8</sup> ]	NA
Estructura primaria de la proteína S (peso molecular)	SDS-PAGE en condiciones reductoras	Según lo esperado	NA	NA

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





Características	Métodos	Valor del lote EC005	Valores esperados (rango definido)	Valores observados
Estructura primaria de la proteína S (secuencia N-terminal)	Secuenciación N-terminal	Según lo esperado	NA	NA
Estructura primaria de la proteína S (secuencia de aminoácidos)	Espectrometría de masas	Según lo esperado	NA	NA
Estructura secundaria de la proteína S (contenido de la hélice $\alpha$ )	Espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier	59,9%	[55,3 - 60,9]%	NA
Estructura terciaria de la proteína S	Fluorescencia intrínseca	332 nm	[328 - 337] nm	NA
Enlaces disulfuro de la proteína S (monómero de proteína S libre)	SDS-PAGE en condiciones no reductoras	Según lo esperado	NA	NA
Enlaces disulfuro de la proteína S (cuantificación de tioles libres)	Método de Ellman	Con SDS: 0,38 Sin SDS: 0,34	NA	Con SDS: 0,53-0,76 Sin SDS: 0,38-0,48
Glicosilación potencial de la proteína S (composición de azúcares)	Cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución con detección amperométrica pulsada	Según lo esperado	NA	NA

### Discusión de los resultados

La proporción de lípidos totales/proteína total del lote EC005 es 1,5. La proporción de lípidos totales/proteína total de lotes anteriores de HBsAg estaba comprendida entre 0,72 y 1,18. El lote EC005 puede considerarse similar a los lotes anteriores de HBsAg, tomando en cuenta la variabilidad estimada del método (30% para el ensayo de lípidos totales y 10% para el contenido proteico).

La proporción de fosfolípidos/proteína es 0,6, de acuerdo con lo que ya se observaba en los lotes de HBsAg (0,30 – 0,54) tomando en cuenta la variabilidad estimada del método (15% para el ensayo de fosfolípidos).

El valor de tioles libres por proteína S es 0,34 sin SDS y 0,38 en presencia de SDS. El valor de tioles libres sin SDS puede considerarse similar a los lotes anteriores de HBsAg, tomando en cuenta la variabilidad estimada del método (10%). El valor de tioles libres con SDS es levemente inferior a los lotes anteriores de HBsAg, incluso tomando en cuenta la variabilidad estimada del método (10%). Estos valores son bajos en comparación con los 14 tioles libres potenciales por proteína S (14 residuos de cisteína presentes en la proteína S), lo cual indica que casi todos los enlaces disulfuro se forman al final del proceso de producción. El valor bajo obtenido para el lote EC005 con SDS puede indicar una mayor reticulación interna de la proteína S (enlaces disulfuro presentes en la capa de lípidos).





### Conclusión

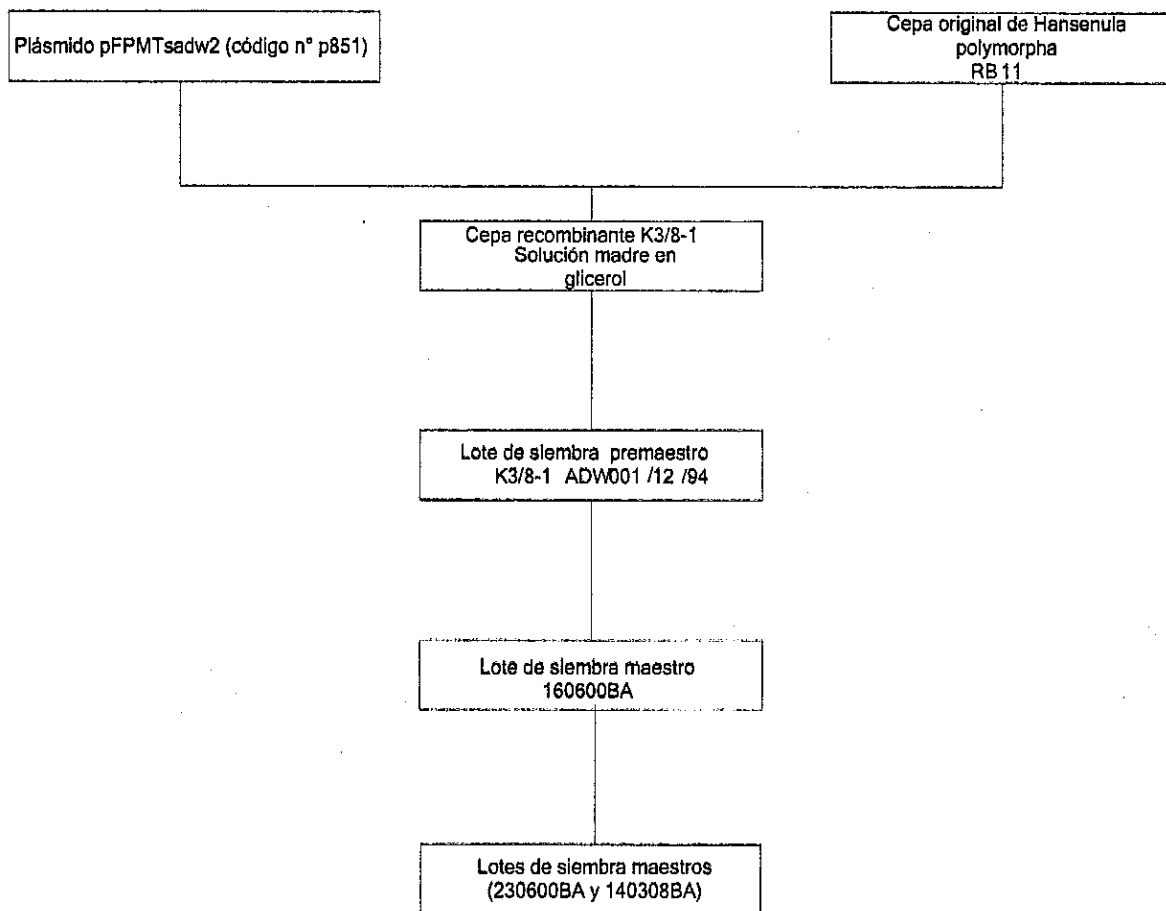
Todos los resultados obtenidos cumplen con los rangos esperados o los valores observados en lotes anteriores de HBsAg y respaldan la estabilidad fenotípica de la cepa de *Hansenula polymorpha*.

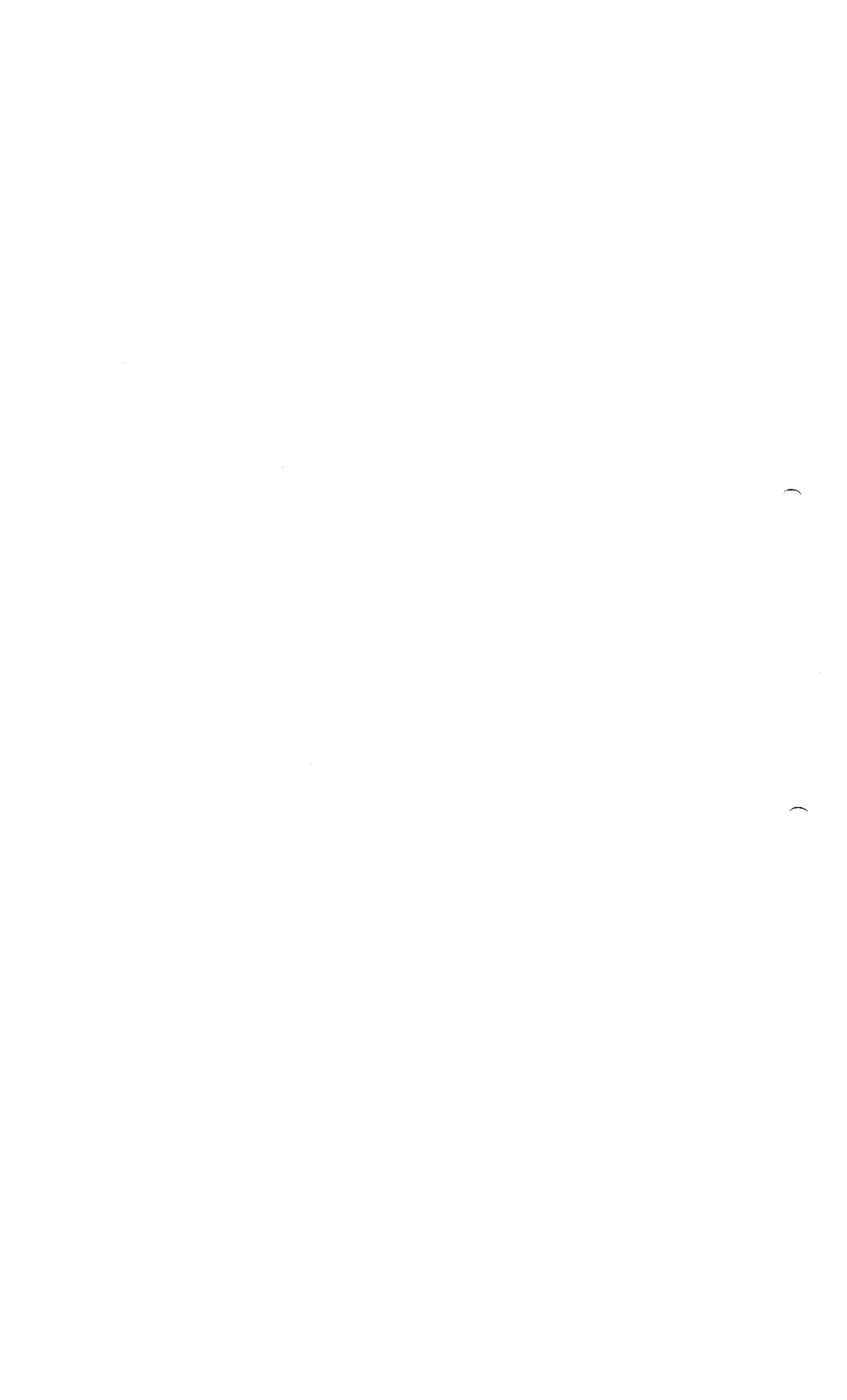
## 2 Panorama del sistema de lotes de siembra

### 2.1 Sistema de lotes de siembra

El HBsAg se produce utilizando el sistema de lotes de siembra de la levadura *Hansenula polymorpha* recombinante que se obtiene tal como se ilustra en la Figura 7.

Figura 7: Sistema de lotes de siembra de *Hansenula polymorpha*





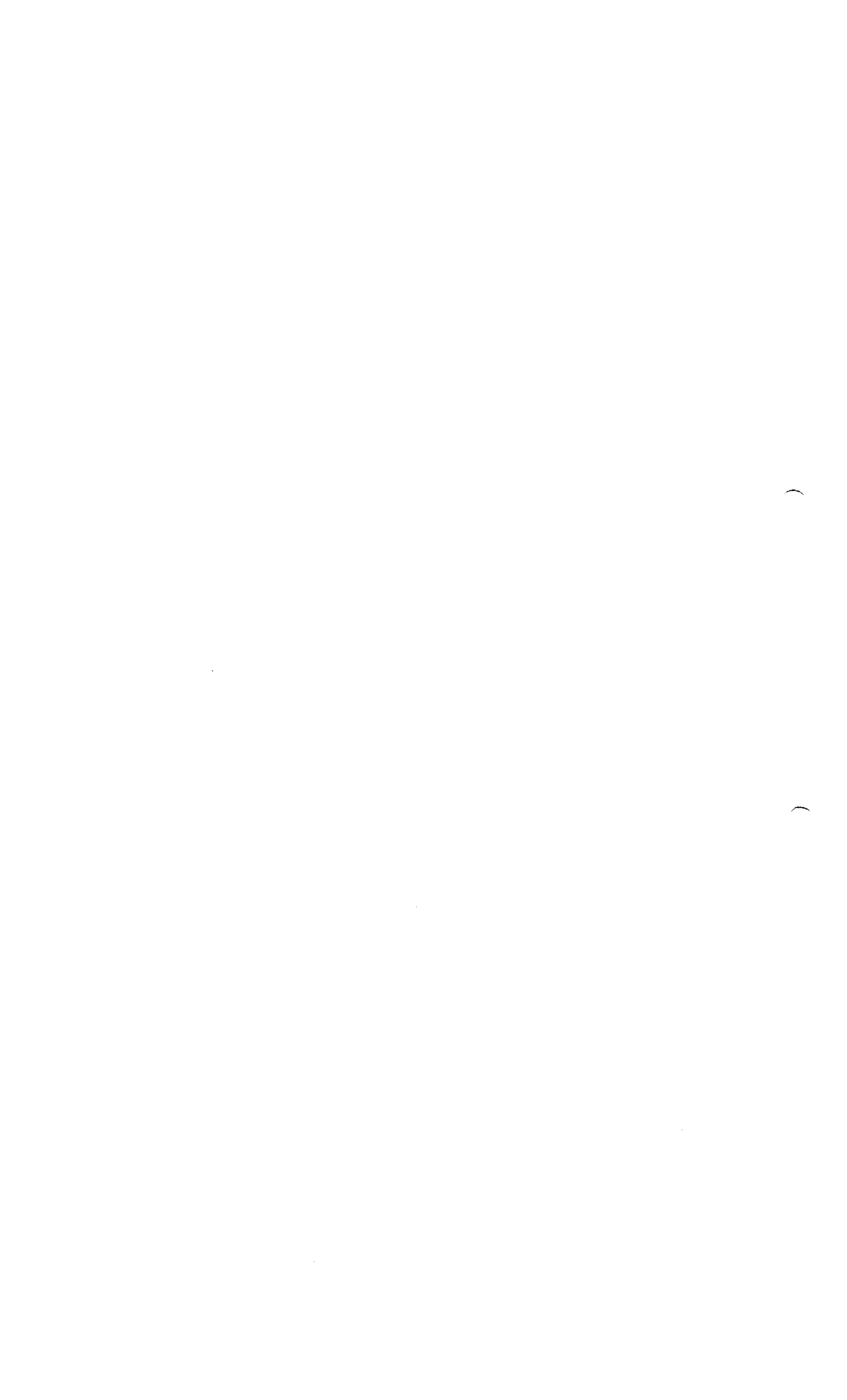


El lote de siembra maestro (MSL) n.º MCB 160600BA fue elaborado por el equipo de Rhein Americana bajo el control de sanofi pasteur en 2000, cuando sanofi pasteur adquirió la empresa Rhein Americana. Se derivó del lote pre-MSL n.º ADW001/12/94. Este lote pre-MSL se obtuvo a partir de la fermentación de la cepa recombinante K3/8-1, producida mediante tecnología de ADN recombinante utilizando un vector plásmido.

La cantidad de ampollas de MSL y viales de WSL elaborados se presentan a continuación en la Tabla 3.

**Tabla 3: Cantidad de ampollas de lotes de siembra maestro y viales de lotes de siembra de trabajo**

	Fecha de elaboración	Paso previo	Cantidad de unidades producidas
Lote de siembra maestro n.º 160600 BA	160600 BA (16 de junio de 2000)	Pre-MSL K3/8-1 ADW001/12/94 (01 de diciembre de 1994)	195 ampollas
Lote de siembra de trabajo n.º 230600 BA	230600 BA (23 de junio de 2000)	MSL 160600 BA (16 de junio de 2000)	389 viales
Lote de siembra de trabajo n.º 140308 BA	140308 BA (14 de marzo de 2008)	MSL 160600 BA (16 de junio de 2000)	479 viales

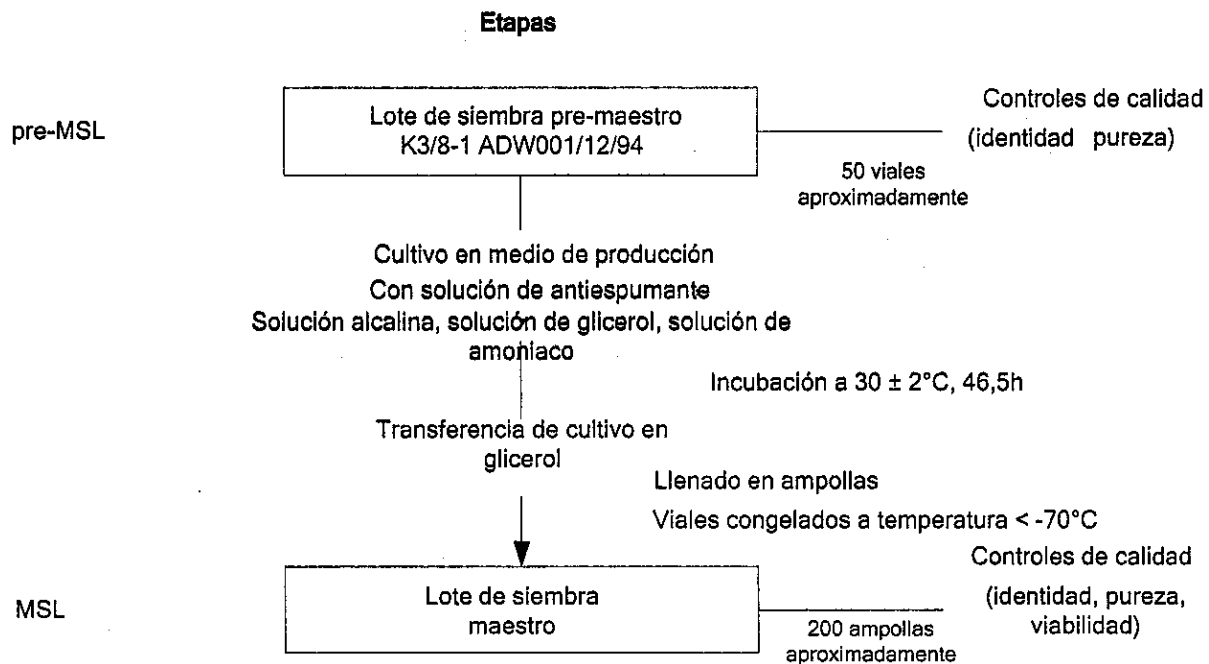




### 3 Preparación del lote de siembra maestro

El lote de siembra maestro (MSL) se elaboró según el diagrama de flujo que se presenta en la Figura 8.

Figura 8: Preparación del lote de siembra maestro



#### 3.1 Medios de crecimiento y reactivos

Los medios de crecimiento utilizados para la producción del lote MSL n.º MCB 160600BA se indican en la Tabla 4. Para mayores detalles, vea la sección 3.2.S.2.2 Cultivo y cosecha celular.



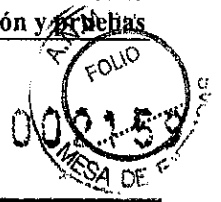


Tabla 4: Componentes de los medios de crecimiento de las siembras maestras

Componentes	Funciones
<b>Medio de producción:</b> - Solución de mezcla de sales - Glicerol al 87% - Agua purificada - Solución de cloruro de calcio - Solución de microelementos - Solución de elementos traza - Solución vitamínica	Cultivo
- Solución antiespumante - Solución alcalina - Glicerol al 87% - Amonio al 25% - Agua purificada	Aditivos de cultivo
- Glicerol	Crioprotector

### 3.2 Producción de lotes de siembra maestros

El inóculo se preparó con 3 crioviales congelados de 1 mL de *Hansenula polymorpha*, correspondientes al lote previo al lote de siembra maestro K3/8-1 ADW001/12/94 (01 de diciembre de 1994); vea la Figura 8.

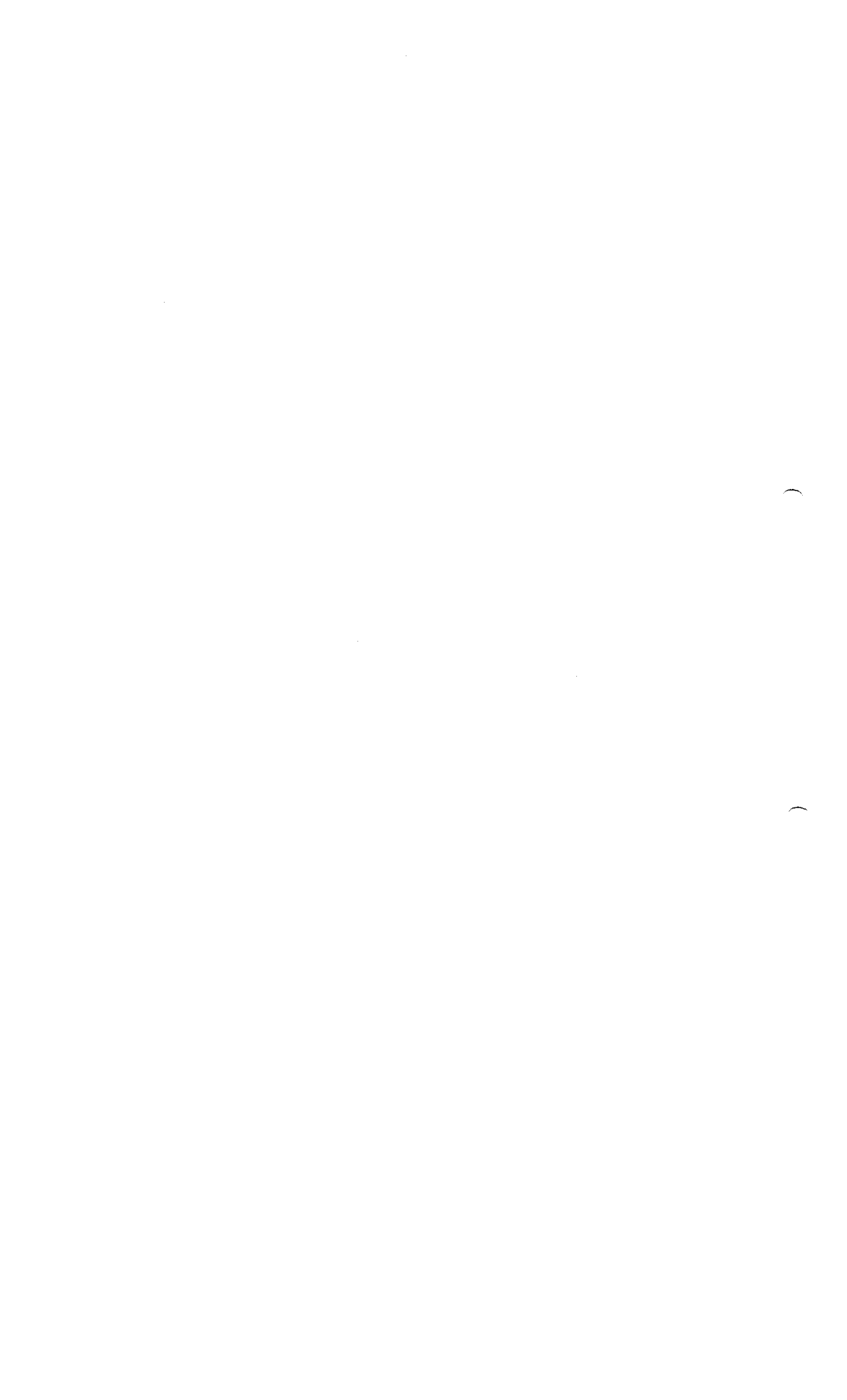
El inóculo del lote pre-MSL se siembra en medio de producción.

El cultivo se incuba a  $+30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante unas 46,5 h, como se describe para el segundo precultivo en la sección 3.2.S.2.2 Cultivo y cosecha celular. La concentración de glicerol y el pH se regulan durante esta incubación mediante los aditivos de cultivo; vea la Tabla 4.

La solución obtenida de este modo se mezcla con glicerol y luego se utiliza para llenar ampollas, las cuales se congelaron a una temperatura inferior a  $-70^{\circ}\text{C}$  el 16 de junio de 2000 en Buenos Aires (lote 16.06.00 BA).

Las ampollas de los lotes de siembra maestros se almacenaron a una temperatura inferior a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Se tomaron ampollas para realizar pruebas de control de calidad, tal como se describe en el apartado 5.





#### 4 Preparación de los lotes de siembra de trabajo

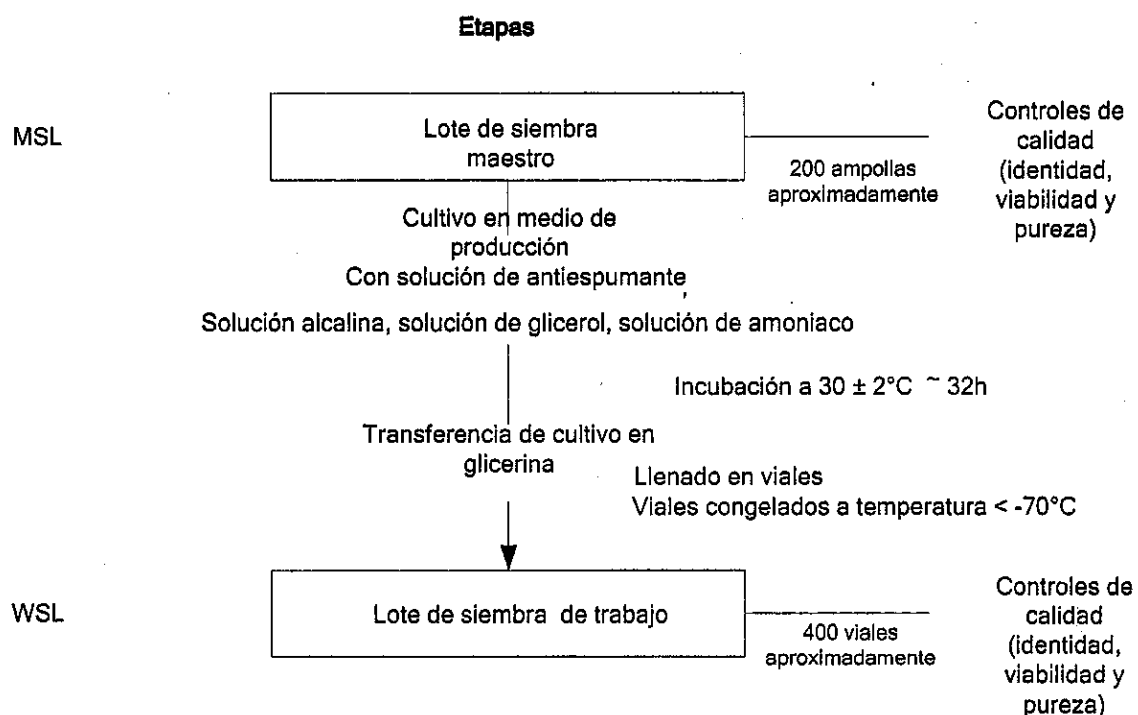
Los lotes de siembra de trabajo (WSL) se elaboran según el diagrama de flujo que se presenta en la Figura 9.

Los medios de crecimiento y los reactivos, así como el proceso de elaboración del WSL a partir de una ampolla de MSL, son idénticos a los aplicables al lote MSL obtenido de tres crioviales pre-MSL; vea el párrafo anterior en la Tabla 4.

Luego, el lote WSL se llenó en crioviales y se almacenó a una temperatura inferior a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Se tomaron viales para realizar pruebas de control de calidad, tal como se describe en el apartado 5.

Figura 9: Preparación de los lotes de siembra de trabajo







## 5 Pruebas de control de calidad de los lotes de siembra

Los controles de calidad realizados con los lotes de siembra (MSL y WSL) de *H. polymorpha* son los siguientes: identidad, pureza y viabilidad. Los objetivos de estos controles son los siguientes:

- Verificar que la cepa sea pura, es decir, que no esté contaminada (sin agentes extraños) después de sembrarse en los medios adecuados.
- Verificar que la cepa preparada pertenezca a la *H. polymorpha* utilizada en la producción del principio activo antígeno de superficie de la hepatitis B.
- Verificar la viabilidad de la cepa.

Las pruebas realizadas en los lotes de siembra de *H. polymorpha*, así como los criterios de aceptación, se presentan en la Tabla 5 y se detallan en los capítulos siguientes.

Tabla 5: Especificación de los lotes MSL y WSL

Controles		Criterios de aceptación
Pureza	Ausencia de contaminantes bacterianos	Cumple
	Ausencia de contaminantes de levaduras y hongos	Cumple
Identidad		Tipo = <i>Hansenula</i> Especie = <i>polymorpha</i>
Viabilidad		Mínimo de $5,0 \cdot 10^4$ UFC/vial

### 5.1 Pruebas de control de calidad

#### 5.1.1 Pureza

Cada MSL o WSL analizado se examina mediante microscopía directa y análisis microbiológicos. Las ampollas y los viales utilizados se inoculan en un medio que permite el crecimiento de microorganismos en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. A fin de inhibir el crecimiento de *Hansenula polymorpha*, estos medios se suplementan con nistatina (un fármaco antifúngico poliénico ante el cual muchas levaduras tienen sensibilidad específica). Se desarrollan cultivos con nistatina a fin de detectar el crecimiento de contaminantes y observar su morfología.

Se realiza una serie de diluciones ( $10^{-1}$  a  $10^{-7}$ ) del lote de siembra en caldo tripticasa-soja (TSB) estéril o en peptona al 0,1% para utilizarse en las siguientes pruebas.





**5.1.1.1 Ausencia de contaminantes bacterianos**

**Finalidad/principio**

La finalidad de esta prueba es verificar la ausencia de contaminantes en el lote de siembra de *H. polymorpha* analizando el patrón de crecimiento en diferentes medios de cultivo.

El principio de esta prueba se basa en la inhibición de *H. polymorpha* mediante la nistatina presente en el medio de cultivo, que sólo permite el crecimiento de contaminantes potenciales.

**Método**

*En medios líquidos*

- Se inoculan dos matraces que contienen TSB + 40 µg/mL de medio de nistatina y dos matraces que contienen medio de tioglicolato + 40 µg/mL de medio de nistatina cada uno con 0,1 mL de la dilución 10<sup>-3</sup> de muestra (para obtener una concentración de ~ 10<sup>6</sup> células/mL de la solución final).

*En medios sólidos*

- Se preparan dos cajas de Petri con agar tríptico de soja (TSA, 20 mL) y 40 µg/mL de nistatina:
  - Se inocula 0,1 mL de la dilución 10<sup>-3</sup> de siembra (para obtener una concentración de ~ 10<sup>6</sup> células/mL en la dilución de muestra).

Las cajas de Petri se incuban a alrededor de +30°C a +35°C durante 14 días y se analizan a diario.

- Se preparan dos cajas de Petri con gérmenes anaeróbicos (20 mL) y 40 µg/mL de nistatina:
  - Se inocula 0,1 mL de la dilución 10<sup>-3</sup> de siembra (para obtener una concentración de ~ 10<sup>6</sup> células/mL en la dilución de muestra).


Las cajas de Petri se incuban a +30°C - 35°C en un dispositivo para cultivos anaeróbicos durante 14 días y se analizan a diario.

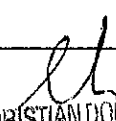
Además, se inocula un matraz que contiene medio TSB o TSA con 0,1 mL de la dilución 10<sup>-3</sup> de muestra (para obtener una concentración de ~ 10<sup>6</sup> células/mL de la solución final).

Además, a continuación se detallan los distintos controles de los medios con y sin nistatina y los controles positivos.

**Tabla 6: Controles realizados durante el ensayo**

Controles	Contenido del cultivo
Controles negativos: control del medio de cultivo con nistatina	TSB/tioglicolato/TSA/agar para gérmenes anaeróbicos con nistatina sin inoculación
Controles negativos: control del medio de cultivo sin nistatina	TSB/tioglicolato/TSA/agar para gérmenes anaeróbicos sin nistatina sin inoculación
Controles negativos: control de la solución de dilución (TSB estéril o peptona estéril al 0,1%)	TSB/tioglicolato/TSA/agar para gérmenes anaeróbicos con nistatina inoculado con 0,1 mL de medio TSB estéril o peptona al 0,1% (solución de dilución)
Control positivo bacteriano de TSB/tioglicolato/TSA	TSB/tioglicolato/medio TSA con nistatina inoculado con 0,1 mL de cultivo de <i>E. coli</i> (100 UFC/mL), o:

  
 ROXANA MONTEMILONE  
 DIRECTORA TÉCNICA  
 SANOFI PASTEUR S.A.

  
 CHRISTIAN DOMÍNGUEZ  
 INGENIERO  
 SANOFI PASTEUR S.A.





Controles	Contenido del cultivo
	Medio TSB inoculado con 0,1 mL de cultivo de <i>S. aureus</i> (100 UFC/mL), medio de tioglicolato inoculado con 0,1 mL de cultivo de <i>C. sperogenes</i> (100 UFC/mL), medio TSA inoculado con 0,1 mL de cultivo de <i>S. aureus</i> (100 UFC/mL).
Control positivo del agar para gérmenes anaeróbicos	Medio agar para gérmenes anaeróbicos con 0,1 mL de <i>C. sperogenes</i> (100 UFC/mL)
Control positivo de <i>H. polymorpha</i>	TSB o TSA sin nistatina inoculado con 0,1 mL de cultivo de control de <i>H. polymorpha</i> (100 UFC/mL)

Los tubos se incuban durante 14 días a alrededor de +30°C a +35°C.

**Criterios de validez**

- Crecimiento visible de los controles positivos
- Ausencia de crecimiento de todos los controles negativos

**Criterios de aceptación**

La prueba es cumple con estos criterios si se observa lo siguiente:

- Ausencia de crecimiento de microorganismos en los distintos medios de cultivo con nistatina;
- Ausencia de contaminantes.

**Resultados esperados**

Después de 14 días de incubación a aproximadamente +30°C a +35°C, los resultados esperados de las pruebas y los controles se resumen en la Tabla 7 y la Tabla 8.



Tabla 7: Crecimiento esperado en los distintos medios

Matraz de cultivo que contiene	TSB o TSA		TSB/nistatina		Tioglicolato/nistatina		TSA/nistatina		Agar para gérmenes anaeróbicos/nistatina	
	0,1 mL de la muestra de <i>H. pol.</i>	TSB + nistatina + 0,1 mL de la muestra de <i>H. pol.</i>	TSB + nistatina + 0,1 mL de la muestra de <i>H. pol.</i> (duplicado)	Tioglic. + nistatina + 0,1 mL de la muestra de <i>H. pol.</i> (duplicado)	Tioglic. + nistatina + 0,1 mL de la muestra de <i>H. pol.</i>	TSA + nistatina + 0,1 mL de la muestra de <i>H. pol.</i>	TSA + nistatina + 0,1 mL de la muestra de <i>H. pol.</i> (duplicado)	Agar + nistatina + 0,1 mL de la muestra de <i>H. pol.</i>	Agar + nistatina + 0,1 mL de la muestra de <i>H. pol.</i> (duplicado)	
Resultado esperado en cada vial analizado	+	-	-	-	-	-	-	-	-	

ROXANA MONTEMILONE  
DIRECTORA TÉCNICA  
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMÍNGUEZ  
APODERADO  
SANOFI PASTEUR S.A.







**Tabla 8: Controles realizados durante el ensayo y resultados esperados**

Controles	Control negativo del medio de cultivo	Control negativo del medio de cultivo + nistatina	Control negativo de la solución de dilución = TSB estéril o peptona estéril al 0,1%	Control positivo bacteriano	Control positivo del agar para gérmenes anaeróbicos	Control positivo
	(TSB, tioglic., TSA, agar para gérmenes anaeróbicos)	(TSB, tioglic., TSA, agar para gérmenes anaeróbicos)	(TSB, tioglic., TSA, agar para gérmenes anaeróbicos)	<i>E. coli</i> en TSB, tioglic. y TSA / + nistatina  O bien  <i>S. aureus</i> en TSB, <i>C. sperogenes</i> en tioglic., <i>S. aureus</i> en TSA	<i>C. sperogenes</i>	<i>H. pol.</i> en TSA o TSB
Resultado esperado en cada vial analizado	-	-	-	+	+	+

**5.1.1.2 Ausencia de contaminación de levaduras y hongos**

**Finalidad/principio**

La finalidad de esta prueba consiste en evaluar la morfología de las colonias desarrolladas y compararla con la de *H. polymorpha*.

Conforme al principio de la prueba, se desarrollan colonias de *H. polymorpha* y otros microorganismos en base nitrogenada para levaduras (YNB)/medio de glucosa y TSA.

**Método**

**PARTE A:**

Se inoculan 10 cajas de Petri que contienen agar YNB/glucosa (20 mL) con 0,1 mL de las diluciones  $10^{-6}$  o  $10^{-7}$  de la ampolla o el vial que se va a analizar. Las cajas se incuban a  $+38^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  y se observan a diario hasta que las colonias sean visibles. Luego se cuentan las colonias.

Los controles de los medios y los controles positivos se detallan a continuación en la Tabla 9.

