



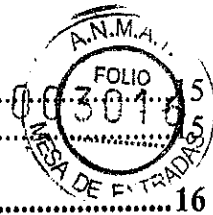
Sección 3.2.S.7.1 - Resumen y conclusiones de estabilidad

Índice

Lista de tablas	3
Lista de figuras	4
1 Introducción	5
2 Protocolo del estudio	6
2.1 Lotes analizados.....	6
2.2 Parámetros estudiados y criterios de aceptación.....	6
2.2.1 Estudios de caracterización	7
3 Resultados del estudio de estabilidad de la ICH	9
3.1 Estudio de estabilidad 1: condiciones a largo plazo (+5°C ± 3°C durante 36 meses)	9
3.2 Estudio de estabilidad 2: condiciones aceleradas (+25°C ± 2°C durante 6 meses).....	9
3.3 Estudio de estabilidad 3: condiciones aceleradas (+37°C ± 2°C durante 3 meses).....	10
3.4 Impacto del cambio de la referencia	11
3.4.1 Introducción.....	11
3.4.2 Impacto de la antigüedad de la referencia sobre el contenido de HBsAg al momento de la liberación	11
3.4.3 Conclusión.....	13
4 Resultados de los estudios de caracterización de los lotes de la tercera serie de producción	14
4.1 Peso molecular y tamaño de las partículas	14
4.1.1 Cromatografía de exclusión por tamaño de alta resolución / dispersión de luz	14
4.1.2 Microscopía electrónica.....	14
4.2 Lípidos de la partícula.....	14
4.3 Antigenicidad de la partícula	15
4.4 Estructura secundaria de la proteína S	15
4.5 Estructura terciaria de la proteína S	15

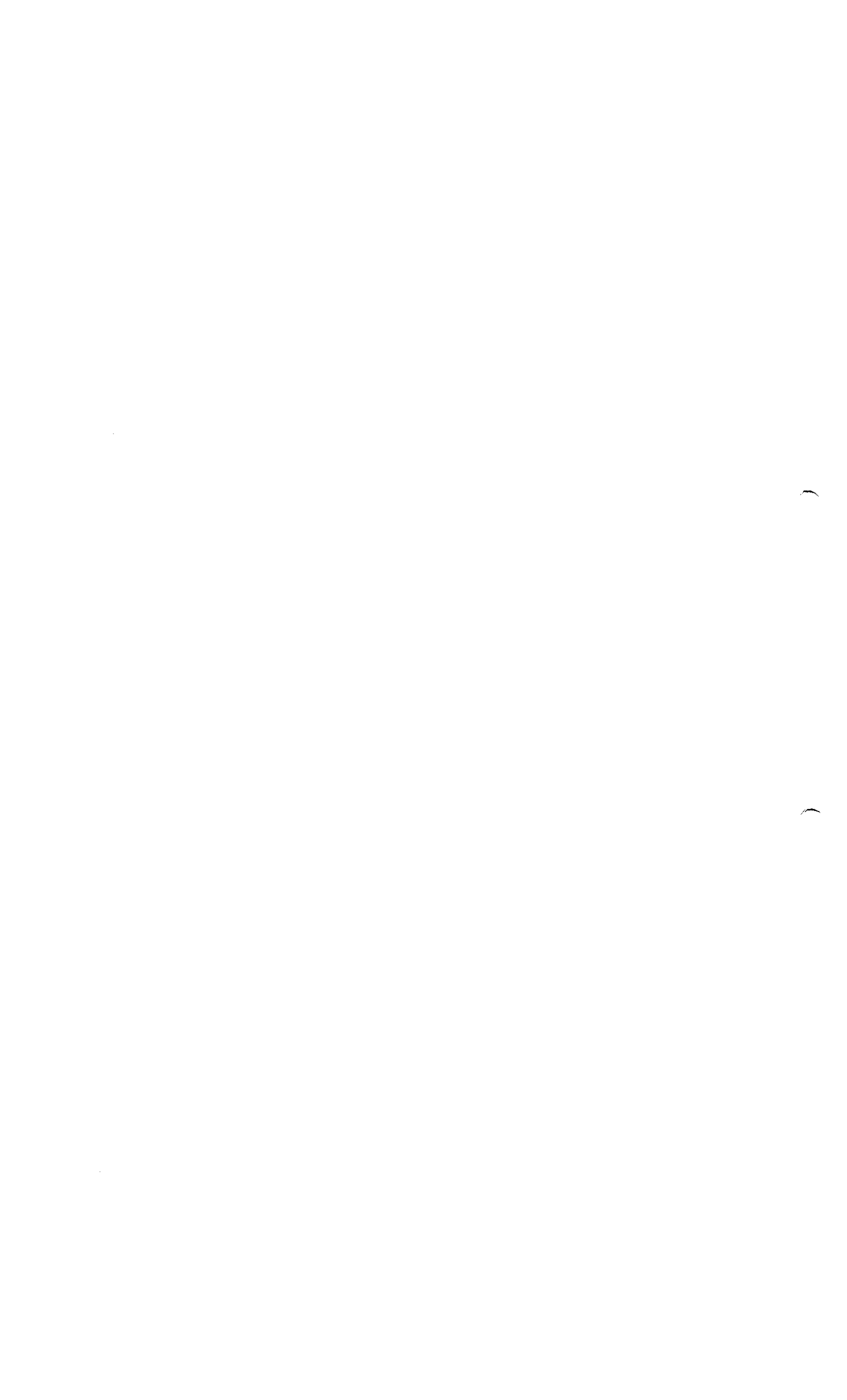


4.5.1 Fluorescencia intrínseca
4.5.2 Formación de enlaces disulfuro
5 Conclusión general 16



ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
GERENTE
SANOFI PASTEUR S.A.





Lista de tablas

Tabla 1: Panorama de los estudios de estabilidad realizados con el antígeno de superficie de la hepatitis B.....5

Tabla 2: Lotes utilizados en los estudios de estabilidad 1, 2 y 3 y estudios de caracterización.....6

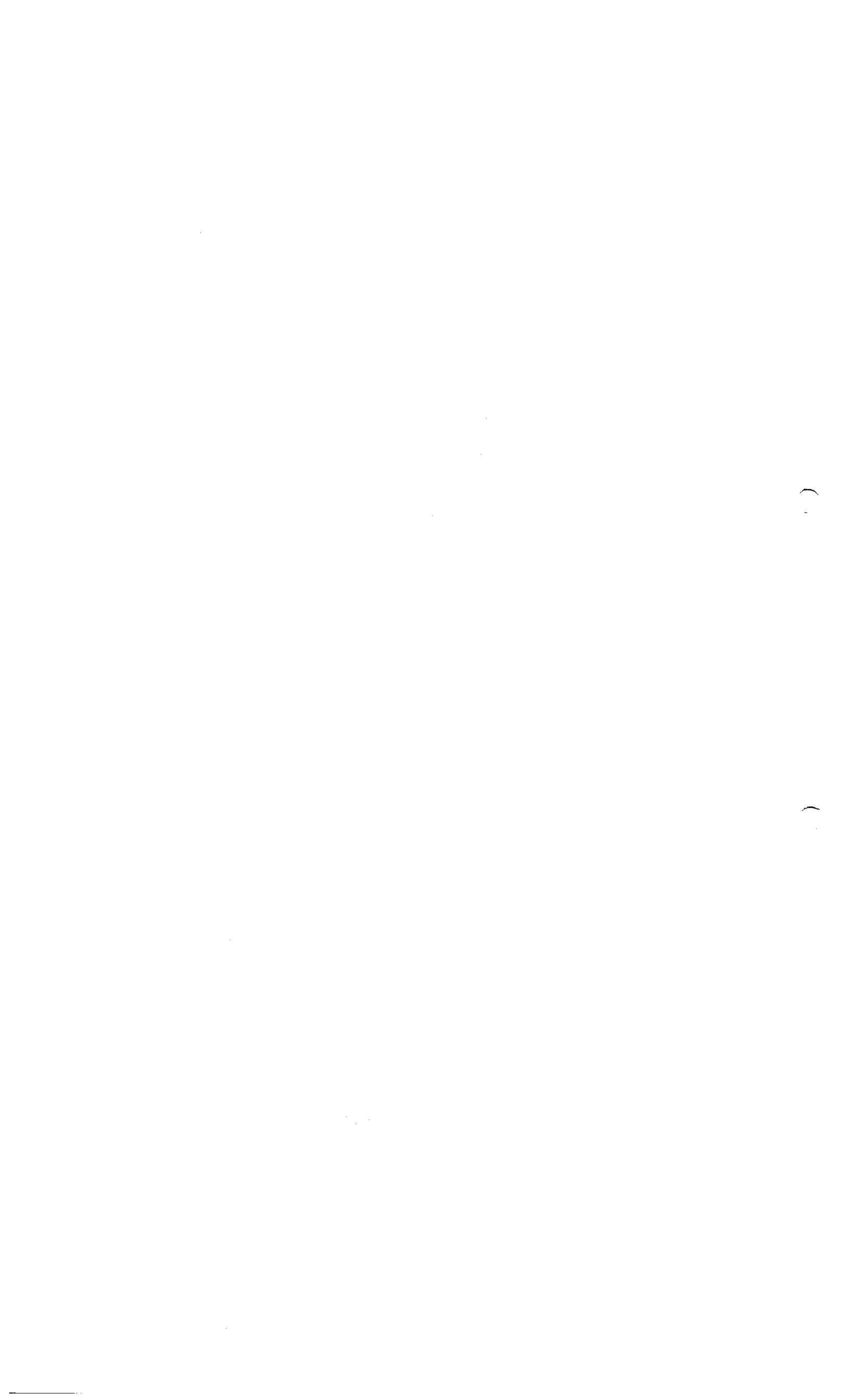
Tabla 3: Parámetros de estudio y criterios de aceptación para el estudio de estabilidad 1 del antígeno de superficie de la hepatitis B.....7

Tabla 4: Resumen de los métodos de caracterización utilizados para el seguimiento de la estabilidad.....8

Tabla 5: Resumen de las condiciones de almacenamiento (vida útil declarada a +5°C ± 3°C).....16

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DAMAZO
SECRETARIO
SANOFI PASTEUR S.A.





Lista de figuras

Figura 1: Evolución de los resultados de la proporción de contenido de HBsAg según la antigüedad del estándar de referencia de HBsAg.....12


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.


CHRISTIAN COMPADRE
GERENTE
SANOFI PASTEUR S.A.





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

1 Introducción

Esta sección presenta los estudios de estabilidad realizados con el principio activo, antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg). Los estudios de estabilidad se están efectuando con 3 lotes de la tercera serie de producción de HBsAg utilizados en la validación de uniformidad.

Se están realizando tres estudios de estabilidad en condiciones de la ICH a fin de documentar y respaldar la vida útil del principio activo:

- Estudio 1: condiciones a largo plazo a $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ durante 36 meses;
- Estudio 2: condiciones aceleradas a $+25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 6 meses;
- Estudio 3: condiciones aceleradas a $+37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 3 meses.

El estudio de estabilidad 1 está en curso. Están disponibles los resultados después de 30 meses de almacenamiento del principio activo.

Los estudios de estabilidad 2 y 3 están terminados.

Los detalles de estos estudios de estabilidad se resumen en la tabla 1.

Tabla 1: Panorama de los estudios de estabilidad realizados con el antígeno de superficie de la hepatitis B

Estudio	Número de lote	Diseño del estudio (condiciones de almacenamiento y momentos de medición)	Estado	Objetivo
Estudio 1	AC004	$+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ (T0, T3, T6, T9, T12, T18, T24 y T36 meses)	En curso	Estudio de estabilidad a largo plazo para respaldar la vida útil del principio activo
	AC005			
	AC007			
Estudio 2	AC004	$+25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (T0, T1, T3 y T6 meses)	Completado	Estudio de estabilidad para respaldar una investigación en caso de falla o desvío de la temperatura de almacenamiento del principio activo HBsAg y para identificar las características que limitan la calidad
	AC005			
	AC007			
Estudio 3	AC004	$+37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (T0, T1 y T3 meses)	Completado	Estudio de estabilidad para respaldar una investigación en caso de falla o desvío de la temperatura de almacenamiento del principio activo HBsAg y para identificar las características que limitan la calidad
	AC005			
	AC007			

Los resultados de estos estudios de estabilidad se presentan en la sección 3.2.S.7.3 Datos de estabilidad.

Además, se han efectuado estudios de caracterización con los mismos tres lotes almacenados a $+5^{\circ}\text{C}$ durante 30 meses y a $+37^{\circ}\text{C}$ durante 6 meses a fin de documentar la estructura de la partícula de HBsAg.



2 Protocolo del estudio

2.1 Lotes analizados

La información sobre los 3 lotes de validación de la uniformidad de HBsAg incluidos en los estudios de estabilidad y los estudios de caracterización se resume en la tabla 2.

Tabla 2: Lotes utilizados en los estudios de estabilidad 1, 2 y 3 y estudios de caracterización

Número de lote	Fecha de elaboración	Lugar de elaboración	Tamaño de lote	Sistema de cierre del envase	Uso del lote
AC004	26 dic 2007	Pilar	Industrial: escala de fermentación de 50 litros	Matraces de vidrio (tipo I) sellados con tapas de tereftalato de polibutileno*	Lote de uniformidad
AC005	29 dic 2007	Pilar	Industrial: escala de fermentación de 50 litros	Matraces de vidrio (tipo I) sellados con tapas de tereftalato de polibutileno*	Lote de uniformidad
AC007	22 mar 2008	Pilar	Industrial: escala de fermentación de 50 litros	Matraces de vidrio (tipo I) sellados con tapas de tereftalato de polibutileno*	Lote de uniformidad

* Los estudios de estabilidad se han llevado a cabo con el tamaño de acondicionamiento primario que representa el peor caso.

2.2 Parámetros estudiados y criterios de aceptación

Los parámetros estudiados y los criterios de aceptación se presentan en la tabla 3 y corresponden a los aplicables al comienzo de los estudios de estabilidad.





Tabla 3: Parámetros de estudio y criterios de aceptación para el estudio de estabilidad del antígeno de superficie de la hepatitis B

Prueba	Métodos	Criterios de aceptación	Momentos de medición (meses)		
			Estudio 1	Estudio 2	Estudio 3
Aspecto	Interno: Comparación visual entre HBsAg y agua purificada	Solución opalescente, levemente turbia y amarillenta	T0 - T3 - T6 - T9 - T12 - T18 - T24 - T36	T0 - T1 - T3 - T6	T0 - T1 - T3
Medición de pH	Ph. Eur. 2.2.3, edición actual Determinación potenciométrica	6,0 - 8,0*			
Contenido proteico	Ph. Eur. 2.5.33 (método 2), edición actual Método de Lowry	0,75 - 1,75 mg/ml*			
Contenido de HBsAg†	Interno: ELISA Rhein Biotech (RB)	≥ 0,7 mg de HBsAg/mg de proteínas totales			
Pureza	Interno: SDS-PAGE en condiciones reductoras (tinción con azul de Coomassie)	≥ 95%			
Porcentaje de monómero libre de HBsAg	Interno: SDS-PAGE en condiciones no reductoras (tinción con azul de Coomassie)	≤ 3%			
Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica	Ph. Eur. 2.6.1, edición actual Filtración por membrana	Ausencia de crecimiento microbiano	T0 - T36	NR‡	NR

* Criterios de aceptación aplicables al momento de realizarse los estudios de estabilidad; actualmente son otros.

† El estándar de referencia para el contenido de HBsAg se cambió en T24 para los lotes AC004 y AC005, y en T18 meses para el lote AC007 (vea la sección 3.2.S.5 Estándares o materiales de referencia).

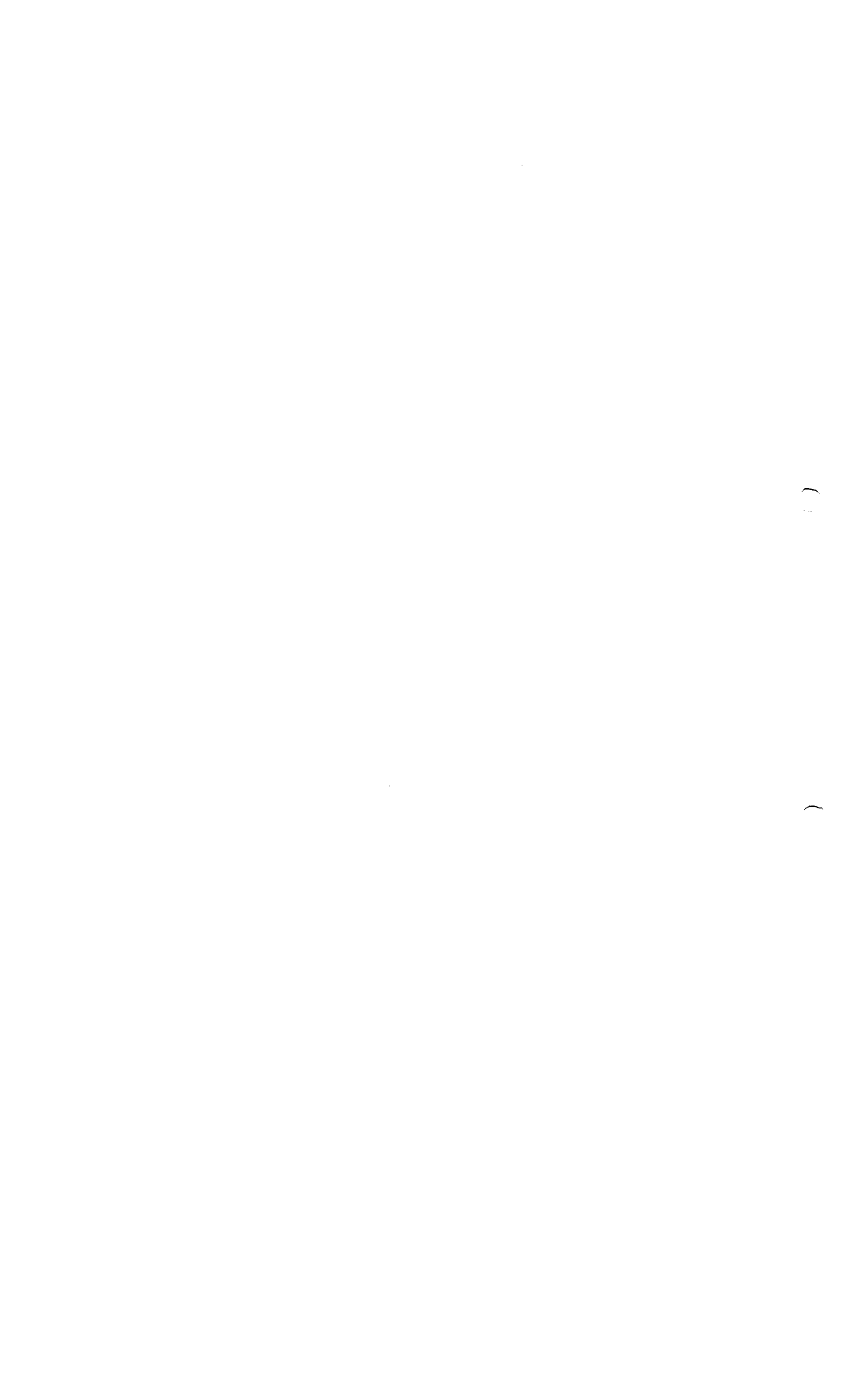
‡ 'NR' equivale a No realizado.

Los parámetros de estudio aplicados durante los estudios de estabilidad están basados en pruebas de liberación (vea la sección 3.2.S.4.1 Especificaciones) salvo los que corresponden a carbohidratos y lípidos, dado que son impurezas relacionadas con el proceso que no se espera que evolucionen con el tiempo.

Los lípidos no formaban parte de los estudios de estabilidad de la ICH; no obstante, se hizo un seguimiento de la proporción lípidos/proteínas totales y la oxidación de los lípidos (hexanal) en los estudios de caracterización.

2.2.1 Estudios de caracterización

Se desarrollaron métodos bioquímicos, inmunoquímicos y biofísicos para caracterizar y documentar la estructura de la partícula de HBsAg (vea la sección 3.2.S.3.1 Elucidación de la estructura y otras características).



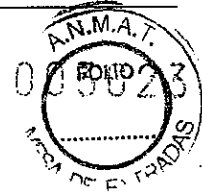


Algunos de estos métodos de caracterización se eligieron para hacer un seguimiento de la estabilidad de los lotes de la tercera serie de producción en distintos momentos de medición y temperaturas. Estos métodos se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4: Resumen de los métodos de caracterización utilizados para el seguimiento de la estabilidad

Prueba	Métodos	Condiciones de almacenamiento	Momentos de medición (meses)
Peso molecular de la partícula	HPSEC/LS	+5°C ± 3°C	Para AC004 y AC005: T0 - T6 - T18 - T25 - T30 Para AC007: T0 - T18 - T25 - T30
		+37°C ± 2°C	Para AC004 y AC005: T0 - T3 - T6 Para AC007: T0 - T1 - T3
Tamaño de la partícula	Microscopía electrónica	+5°C ± 3°C	T0 - T6 - T24 - T30
		+37°C ± 2°C	Para AC004 y AC005: T3
Proporción lípidos/proteínas totales	Titulación mediante análisis colorimétrico	+5°C ± 3°C	Para AC004 y AC005: T0 - T9 - T12 - T18 - T24 - T30 Para AC007: T0 - T6 - T9 - T12 - T18 - T24 - T30
Oxidación de lípidos de la partícula (liberación de hexanal)	Cromatografía de gas	+5°C ± 3°C	Para AC004: T0 - T2 - T5 - T18 - T26 Para AC005: T0 - T2 - T5 - T11 - T18 - T26 Para AC007: T0 - T2 - T5 - T11 - T24
		+37°C ± 2°C	T0 - T1 - T3 - T6
Antigenicidad de la partícula	Resonancia de plasmones superficiales	+5°C ± 3°C	T0 - T30
Estructura secundaria de la proteína S (contenido de la hélice α)	Espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier	+5°C ± 3°C	T0 - T6 - T12 - T18 - T24 - T30
		+37°C ± 2°C	Para AC004 y AC005: T0 - T1 - T3
Estructura terciaria de la proteína S	Fluorescencia intrínseca	+5°C ± 3°C	T0 - T30
Estructura terciaria de enlaces disulfuro de la proteína S (cuantificación de tioles libres)	Método de Ellman	+5°C ± 3°C	T0 - T6 - T12 - T18 - T24 - T30
		+37°C ± 2°C	T0 - T2 - T4 - T7





3 Resultados del estudio de estabilidad de la ICH

Los resultados de los estudios de estabilidad realizados con el HBsAg se presentan en la sección 3.2.S.7.3 Datos de estabilidad.

3.1 Estudio de estabilidad 1: condiciones a largo plazo (+5°C ± 3°C durante 36 meses)

Durante 30 meses de almacenamiento a +5°C ± 3°C, el aspecto y la pureza del principio activo siguen cumpliendo con la especificación.

Durante 30 meses de almacenamiento a +5°C ± 3°C, se observa una leve disminución de los valores de pH (0,2 unidad de pH); no obstante, todos los resultados siguen cumpliendo con las especificaciones. Además, si consideramos la especificación ajustada actual (6,5 a 7,5, vea la sección 3.2.S.4.1 Especificaciones), los resultados siguen cumpliendo con las especificaciones.

Durante 30 meses de almacenamiento a +5°C ± 3°C, el contenido proteico se mantiene estable; todos los resultados cumplen con las especificaciones. Además, si consideramos las especificaciones ajustadas actuales (1,05 a 1,80 mg/ml, vea la sección 3.2.S.4.1 Especificaciones), los resultados siguen cumpliendo con las especificaciones.

Con respecto al contenido de HBsAg (proporción), todos los resultados de los momentos de medición cumplen con la especificación durante 30 meses. Además, no se observaron tendencias en el conjunto de datos de cada lote hasta el momento de medición de 24 meses (lotes AC004 y AC007) y de 18 meses (lote AC007). Luego de estos momentos de medición respectivos (24 o 18 meses), se observó una disminución del contenido de HBsAg en los 3 lotes, seguida por una tendencia estabilizada en los resultados de los momentos de medición posteriores. Se investigó esta disminución y se atribuyó probablemente al reemplazo del estándar de referencia utilizado para el análisis, lo cual se comenta en mayor detalle en el inciso 3.4.

Durante 30 meses de almacenamiento a +5°C ± 3°C, los resultados de porcentaje de monómero libre de HBsAg cumplen con la especificación (≤ 3%) y se mantienen por debajo del límite de detección del 2%.

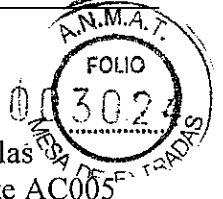
La prueba de esterilidad bacteriana y fúngica se realiza al comienzo y al final del estudio de estabilidad (T36 meses). No se observó contaminación microbiana en T0.

3.2 Estudio de estabilidad 2: condiciones aceleradas (+25°C ± 2°C durante 6 meses)

Durante 6 meses de almacenamiento a +25°C ± 2°C, el aspecto del principio activo sigue cumpliendo con la especificación.

Los valores de pH cumplen con las especificaciones y se mantienen estables durante 6 meses a +25°C ± 2°C. Además, si consideramos las especificaciones ajustadas actuales (6,5 a 7,5), los resultados siguen cumpliendo con las especificaciones.





La pureza cumple con las especificaciones en los 3 lotes cuando se almacenan 1 mes a $+25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. No obstante, a los 3 meses y 6 meses, se observan resultados fuera de las especificaciones en el lote AC004. A los 6 meses, no se pudo calcular la pureza del lote AC005 porque parte de la muestra quedó adherida en el pocillo sin migrar en el gel al aplicarse las condiciones de electroforesis de rutina, lo cual indica una modificación del HBsAg. En el lote AC007, los resultados se mantienen dentro de las especificaciones.

Se observa un leve aumento del contenido proteico en 6 meses a $+25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$; sin embargo, todos los resultados cumplen con la especificación. Además, si consideramos las especificaciones ajustadas actuales (1,05 a 1,80 mg/ml), los resultados siguen cumpliendo con las especificaciones.

Durante 6 meses de almacenamiento a $+25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, el contenido (proporción) de HBsAg cumple con las especificaciones.

Durante 6 meses de almacenamiento a $+25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, los resultados de porcentaje de monómero libre de HBsAg cumplen con las especificaciones y se mantienen por debajo del límite de detección del 2%.

3.3 Estudio de estabilidad 3: condiciones aceleradas ($+37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 3 meses)

Durante 3 meses de almacenamiento a $+37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, el aspecto del principio activo sigue cumpliendo con las especificaciones.

Se observa una leve disminución de los valores de pH (0,2 unidad de pH) en 3 meses a $+37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$; sin embargo, todos los resultados siguen cumpliendo con las especificaciones. Además, si consideramos la especificación ajustada actual (6,5 a 7,5), los resultados siguen cumpliendo con las especificaciones.

En T1 mes a $+37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, no se pudo calcular el lote AC005 porque parte de la muestra quedó adherida en el pocillo sin migrar en el gel al aplicarse las condiciones de electroforesis de rutina. Los resultados de pureza de los otros 2 lotes cumplen con las especificaciones. Sin embargo, después de 3 meses a $+37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, no pudo evaluarse la pureza de los 3 lotes debido al mismo fenómeno (la muestra queda adherida en el pocillo).

Se observa un leve aumento del contenido proteico en 3 meses a $+37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$; sin embargo, todos los resultados cumplen con la especificación. Además, si consideramos la especificación ajustada actual (1,05 a 1,80 mg/ml), los resultados siguen cumpliendo con la especificación.

No se observa ningún cambio en el contenido de HBsAg (proporción) en 3 meses a $+37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Todos los resultados cumplen con la especificación.

Durante 3 meses de almacenamiento a $+37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, los resultados de porcentaje de monómero libre de HBsAg cumplen con las especificaciones y se mantienen por debajo del límite de detección del 2%.

