



3.4 Impacto del cambio de la referencia

3.4.1 Introducción

El estándar de referencia de HBsAg utilizado para determinar el contenido de HBsAg (HBsAg/proteínas totales) mediante el análisis ELISA RB se ha cambiado en el curso de los estudios de estabilidad. El estándar de referencia AA004 utilizado desde el comienzo del estudio fue reemplazado en agosto de 2009 por el estándar de referencia AC012. El contenido de HBsAg de los lotes AC004 y AC005 hasta 18 los meses se determinó utilizando como estándar de referencia el lote AA004, mientras que para el lote AC007 ese estándar se utilizó hasta los 12 meses inclusive (vea la sección 3.2.S.5 Estándares o materiales de referencia).

Luego del cambio del estándar de referencia de HBsAg, se observó una disminución en el contenido de HBsAg en cada lote AC evaluado durante la estabilidad. Por lo tanto, se llevó a cabo un estudio a fin de determinar si existía una relación entre la antigüedad del estándar de referencia de HBsAg y el contenido de HBsAg (proporción).

Se analizaron los datos históricos obtenidos con 71 lotes de antígenos purificados analizados con los estándares de referencia de HBsAg AC012 o AA004:

- Se trazó una representación gráfica del contenido de HBsAg/proteínas totales de graneles purificados de hepatitis B al momento de la liberación en función de la antigüedad del estándar de referencia de HBsAg y se efectuó un análisis de regresión.
- Luego se efectuó un análisis EWMA (promedio móvil ponderado exponencialmente) para evaluar si la evolución era continua o discontinua.

3.4.2 Impacto de la antigüedad de la referencia sobre el contenido de HBsAg al momento de la liberación

Se utilizaron los siguientes lotes de la tercera serie de producción:

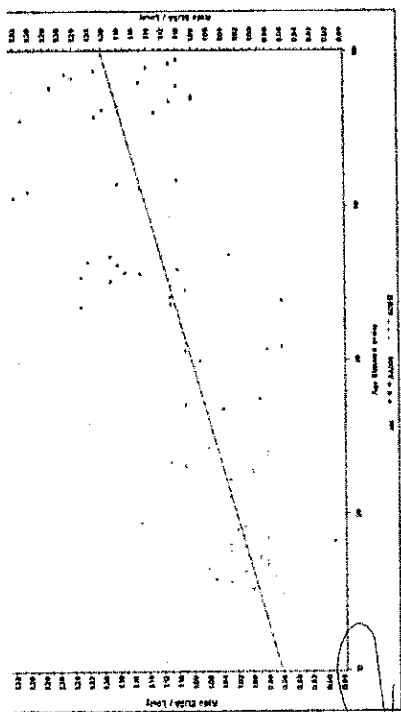
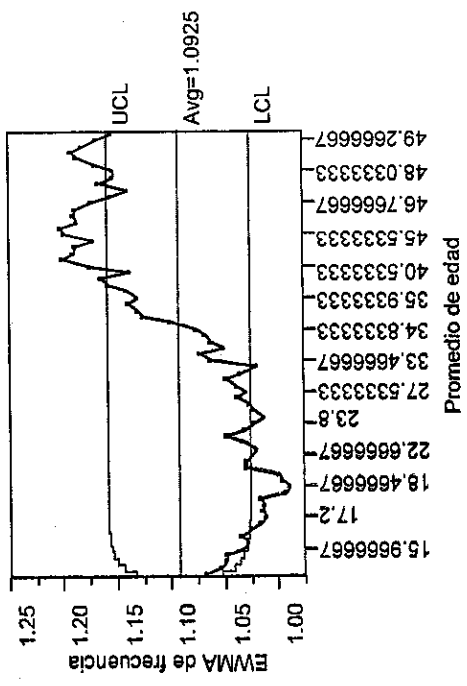
- 44 lotes producidos entre septiembre de 2007 y julio de 2009 y analizados con la referencia AA004;
- 27 lotes producidos entre julio de 2009 y mayo de 2010 y analizados con la referencia AC012.

Los resultados de lote (proporción) obtenidos con los estándares de referencia de HBsAg AC012 o AA004 se analizaron juntos. En total, había 71 resultados de liberación disponibles, que cubrían de 15 a 50 meses de antigüedad del estándar de referencia.

Los resultados del contenido de HBsAg (proporción) al momento de la liberación se presentan en la figura 1.



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

<p>Análisis de regresión: Evolución de los resultados en función de la antigüedad del estándar de referencia de HBsAg</p> 	<p>Gráfico de control EWMA: Comportamiento de los resultados en función de la antigüedad del estándar de referencia de HBsAg (en meses)</p> 
<p>$p < 0,0001 \rightarrow$ Significativo Evolución significativa del contenido de HBsAg (proporción) en función de la antigüedad del estándar de referencia de HBsAg: los resultados obtenidos con un estándar de referencia viejo son mayores que con un estándar de referencia nuevo.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Los resultados son uniformes cuando se obtienen con un estándar de entre 15 y 34 meses de antigüedad aprox. - Se observa una interrupción en el nivel de los resultados de lote alrededor de los 34 meses de antigüedad del estándar de referencia. - Los resultados son uniformes cuando se obtienen con un estándar de entre 34 y 50 meses de antigüedad aprox.

ROXANA MONTEMILOME
 DIRECTORA TÉCNICA
 SANOFI PASTEUR S.A.

EDUARDO
 SANOFI PASTEUR S.A.





El análisis de regresión reveló un aumento significativo en los resultados de lote de la proporción contenido de HBsAg/proteínas totales en función de la antigüedad del estándar de referencia de ELISA.

Además, el análisis EWMA mostró que la evolución es discontinua:

- Se observan resultados uniformes cuando los lotes se liberan con un estándar de referencia de entre 15 y 34 meses de antigüedad aproximadamente.
- Se observa una interrupción en el contenido de HBsAg (proporción) en el momento de la liberación cuando el estándar de referencia utilizado tiene una antigüedad de por lo menos 34 meses.
- Se observan resultados uniformes cuando los lotes se liberan con un estándar de referencia de entre 34 y 50 meses de antigüedad aproximadamente.

3.4.3 Conclusión

Los resultados de este estudio adicional permiten explicar por qué el cambio del estándar de referencia con una antigüedad mayor de 36 meses por un estándar de referencia con una antigüedad de aproximadamente 16 meses durante el estudio de estabilidad de los lotes AC indujo una disminución de la proporción contenido de HBsAg/proteínas totales.

Estos datos respaldan asimismo la utilización de un estándar de referencia de hasta 30 meses.





4 Resultados de los estudios de caracterización de los lotes de la tercera serie de producción

4.1 Peso molecular y tamaño de las partículas

4.1.1 Cromatografía de exclusión por tamaño de alta resolución / dispersión de luz

El peso molecular de las partículas de los lotes de la tercera serie de producción es estable hasta por lo menos 30 meses a $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$. En condiciones aceleradas a $+37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, se observa un leve aumento del peso molecular de las partículas en los lotes de la tercera serie de producción después de 3 meses. Esto corresponde a una ligera agregación de las partículas, como se observa asimismo mediante microscopía electrónica (EM). El estudio se ha llevado a cabo hasta los 6 meses de almacenamiento a $+37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Todos los valores obtenidos en los distintos momentos de medición de estabilidad y con las distintas temperaturas para los lotes de la tercera serie de producción están incluidos en el rango de aceptabilidad [2941 – 8106 kDa], como se define en la sección 3.2.S.3.1 Elucidación de la estructura y otras características.

4.1.2 Microscopía electrónica

El tamaño de las partículas de los lotes de la tercera serie de producción es estable hasta por lo menos 30 meses a $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.

En condiciones aceleradas después de 3 meses a $+37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, las partículas aisladas y de forma redonda tienen el mismo tamaño que en T0. No obstante, en una inspección visual se observa una leve agregación de las partículas (3 partículas o más), lo cual coincide con los resultados obtenidos con HPSEC/LS.

Todos los valores obtenidos en los distintos momentos de medición de estabilidad y con las distintas temperaturas están incluidos en el intervalo definido [18 nm - 33 nm] (vea la sección 3.2.S.3.1 Elucidación de la estructura y otras características).

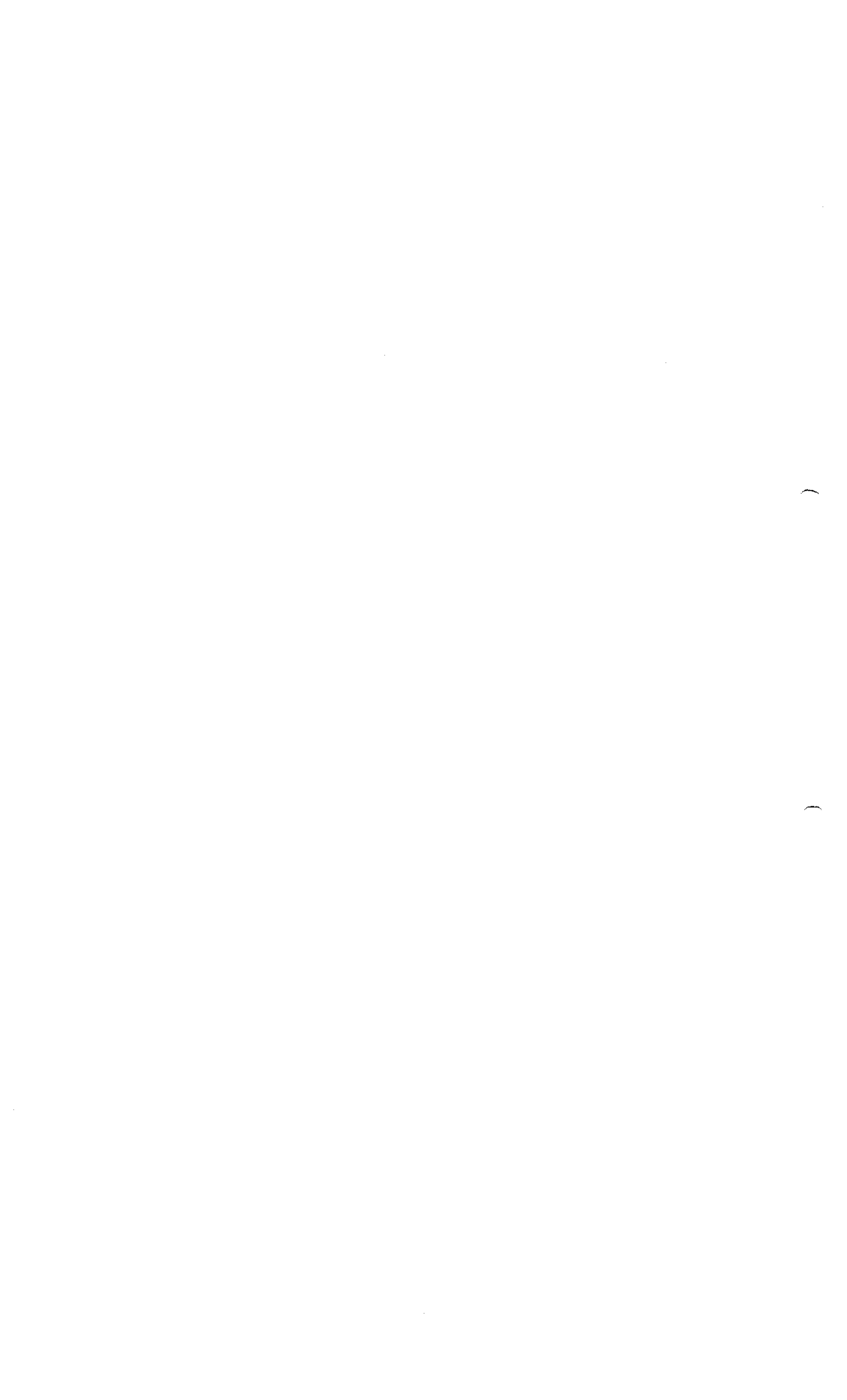
4.2 Lípidos de la partícula

- Lípidos/proteínas totales:

Los resultados se encuentran dentro de las especificaciones de liberación (0,5 – 0,9 mg de lípidos/mg de proteínas totales) y no se observa evolución durante el almacenamiento a $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ durante 30 meses.

- Oxidación de los lípidos:

Los resultados obtenidos con los distintos lotes en distintos momentos de medición de estabilidad y con distintas temperaturas muestran que la concentración de hexanal es muy





baja. En general, la oxidación de los lípidos, según la liberación de hexanal, se mantiene por debajo del 0,1% durante 30 meses a $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ y 6 meses a $+37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

4.3 Antigenicidad de la partícula

Las constantes de asociación y disociación de equilibrio (k_a y k_d) y la constante de equilibrio de afinidad (KD) se determinaron con RF-1 Mab en los lotes de la tercera serie de producción en T0 y después de 30 meses de almacenamiento a $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$. Los valores de k_a , k_d y KD de la partícula hacia RF-1 Mab en los lotes de la tercera serie de producción son estables hasta por lo menos 30 meses a $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.

Todos los valores obtenidos con los lotes de la tercera serie de producción durante el estudio de estabilidad están incluidos en los siguientes rangos de aceptabilidad, teniendo en cuenta la variabilidad del método, como se define en la sección 3.2.S.3.1 Elucidación de la estructura y otras características.

- k_a : $[3,6 \cdot 10^3 - 2,1 \cdot 10^4] \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$
- k_d : $[2,2 \cdot 10^{-4} - 4,0 \cdot 10^{-4}] \text{ s}^{-1}$
- KD: $[1,1 \cdot 10^{-8} - 7,6 \cdot 10^{-8}] \text{ M}$

4.4 Estructura secundaria de la proteína S

Se observa una leve disminución con el tiempo en el porcentaje de hélice α a $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$. Esta disminución es mayor a $+37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, con un aumento concomitante en el porcentaje de lámina β .

No obstante, todos los valores obtenidos con los lotes de la tercera serie de producción durante el estudio de estabilidad están incluidos en el rango de aceptabilidad para el porcentaje de hélice α , tomando en cuenta la variabilidad del método [55,3% - 60,9%] (vea la sección 3.2.S.3.1 Elucidación de la estructura y otras características).

4.5 Estructura terciaria de la proteína S

4.5.1 Fluorescencia intrínseca

Los lotes de la tercera serie de producción son estables durante 30 meses de almacenamiento a $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ respecto del parámetro de fluorescencia máxima de emisión.

Todos los valores obtenidos están incluidos en el rango de aceptabilidad determinado para la fluorescencia máxima de emisión tomando en cuenta la variabilidad del método [328 - 337 nm] (vea la sección 3.2.S.3.1 Elucidación de la estructura y otras características).

4.5.2 Formación de enlaces disulfuro

El valor de tioles libres por proteína S es muy bajo (menos de 0,5 por 14 tioles libres potenciales). Los valores obtenidos (0,2 - 0,3) están en el límite de detección. No se observa ningún cambio cuantificable en un almacenamiento de 6 meses a $+37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y 30 meses a $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.





5 Conclusión general

Los resultados de los estudios de estabilidad en condiciones aceleradas indican un cambio a lo largo del tiempo en las partículas de HBsAg. Además, también se observaron cambios en el tamaño de las partículas durante los estudios de caracterización realizados a $+37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, una ligera agregación de las partículas mediante HPSEC/LS y EM, y un cambio en la estructura secundaria de la proteína S a través de una disminución en el contenido de hélice α . No obstante, los datos generados podrían utilizarse para respaldar posibles desviaciones de temperatura del producto.

Según los resultados del estudio de estabilidad en condiciones a largo plazo, todos los parámetros (incluida la pureza mediante SDS-PAGE) cumplen con las especificaciones durante 30 meses de almacenamiento a $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$. Se observó una reducción del contenido de HBsAg (proporción) después del cambio del estándar de referencia de HBsAg. Un análisis complementario confirma que la antigüedad del estándar de referencia podría haber afectado la proporción contenido de HBsAg/proteínas totales cuando se utiliza un estándar de referencia de más de 34 meses de antigüedad.

Con base en los resultados obtenidos en condiciones aceleradas y a largo plazo, así como durante los estudios de caracterización, se puede solicitar una vida útil de 30 meses para el principio activo, antígeno de superficie de la hepatitis B, almacenado en matraces de vidrio a $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ y también para el estándar de referencia.

Las condiciones de almacenamiento se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5: Resumen de las condiciones de almacenamiento (vida útil declarada a $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$)

Producto almacenado	Sistema de cierre del envase	Vida útil	Condiciones de almacenamiento
Antígeno de superficie de la hepatitis B	Matraces de vidrio (tipo I) sellados con tapas de tereftalato de polibutileno	30 meses	$+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$




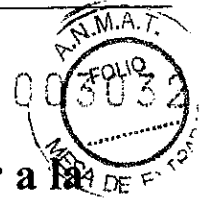


3.2.S.7.2

Protocolo de Estabilidad Posterior a la Aprobación y Compromiso de Estabilidad - HBsAg


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A


CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
GERENTE
SANOFI PASTEUR S.A



Sección 3.2.S.7.2 - Protocolo de estabilidad posterior a la aprobación y compromiso de estabilidad

El estudio de estabilidad 1 realizado en condiciones a largo plazo y que incluye tres lotes de validación de uniformidad de la tercera serie de producción de antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) está en curso.

Sanofi Pasteur se compromete a completar el estudio de estabilidad en curso realizado con HBsAg almacenado en matraces de vidrio (tipo I) sellados con tapas de tereftalato de polibutileno, a $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ durante 36 meses, según se describe en la sección 3.2.S.7.1 Resumen y conclusiones de estabilidad para el principio activo.

En caso de registrarse algún resultado fuera de las especificaciones, se notificará a las autoridades competentes.

Los estudios de estabilidad 2 y 3 realizados en condiciones aceleradas y que incluyen tres lotes de validación de uniformidad de la tercera serie de producción de antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) están completos. Los resultados se presentan en la sección 3.2.S.7.3 Datos de estabilidad.





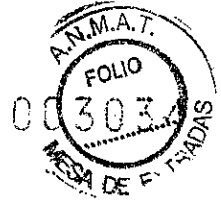
3.2.S.7.3

Datos de Estabilidad - HBsAg


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
GERENTE
SANOFI PASTEUR S.A.



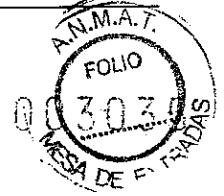


Sección 3.2.S.7.3 - Datos de estabilidad

Índice

Lista de figuras	4
1 Procedimientos analíticos	5
2 Resultados	5
2.1 Estudio de estabilidad 1: condiciones a largo plazo a $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ durante 36 meses.....	5
2.2 Estudio de estabilidad 2: condiciones aceleradas a $+25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 6 meses.....	9
2.3 Estudio de estabilidad 3: condiciones aceleradas a $+37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 3 meses.....	10
3 Datos de respaldo, estudios de caracterización	12
3.1 Método de caracterización	12
3.1.1 Oxidación de los lípidos	12
3.2 Resultados.....	12
3.2.1 Peso molecular y tamaño de las partículas.....	13
3.2.1.1 Cromatografía de exclusión por tamaño de alta resolución / dispersión de luz.....	13
3.2.1.2 Microscopía electrónica (EM).....	13
3.2.2 Lípidos de la partícula	15
3.2.2.1 Proporción lípidos/proteínas totales.....	15
3.2.2.2 Oxidación de los lípidos de la partícula	16
3.2.3 Antigenicidad de la partícula.....	18
3.2.4 Estructura secundaria de la proteína S.....	18
3.2.5 Estructura terciaria de la proteína S.....	19
3.2.5.1 Fluorescencia intrínseca.....	19
3.2.5.2 Formación de enlaces disulfuro	19





Lista de tablas

Tabla 1: Estudio de estabilidad 1: Resultados del lote de uniformidad AC004.....6
Tabla 2: Estudio de estabilidad 1: Resultados del lote de uniformidad AC005.....7
Tabla 3: Estudio de estabilidad 1: Resultados del lote de uniformidad AC007.....8
Tabla 4: Estudio de estabilidad 2: Resultados de estabilidad del lote de uniformidad AC004.....9
Tabla 5: Estudio de estabilidad 2: Resultados del lote de uniformidad AC005.....9
Tabla 6: Estudio de estabilidad 2: Resultados del lote de uniformidad AC007.....10
Tabla 7: Estudio de estabilidad 3: Resultados de estabilidad del lote de uniformidad AC004.....10
Tabla 8: Estudio de estabilidad 3: Resultados del lote de uniformidad AC005.....11
Tabla 9: Estudio de estabilidad 3: Resultados del lote de uniformidad AC007.....11
Tabla 10: Peso molecular en kDa de los lotes de la tercera serie de producción (AC004, AC005 y AC007) almacenados a $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$13
Tabla 11: Peso molecular en kDa de los lotes de la tercera serie de producción (AC004, AC005 y AC007) almacenados a $+37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$13
Tabla 12: Distribución en tamaño (nm) de los lotes de la tercera serie de producción (AC004, AC005 y AC007) almacenados a $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ determinados mediante microscopía electrónica...14
Tabla 13: Distribución en tamaño (nm) de los lotes de la tercera serie de producción (AC004 y AC005) almacenados 3 meses a $+37^{\circ}\text{C}$ determinados mediante microscopía electrónica14
Tabla 14: Proporción lípidos/proteínas totales de los lotes de la tercera serie de producción (AC004, AC005 y AC007) almacenados a $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 16
Tabla 15: Concentración de hexanal y porcentaje de oxidación del lote AC004 almacenado a $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 16
Tabla 16: Concentración de hexanal y porcentaje de oxidación del lote AC004 almacenado a $+37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 16
Tabla 17: Concentración de hexanal y porcentaje de oxidación del lote AC005 almacenado a $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 17
Tabla 18: Concentración de hexanal y porcentaje de oxidación del lote AC005 almacenado a $+37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 17
Tabla 19: Concentración de hexanal y porcentaje de oxidación del lote AC007 almacenado a $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 17
Tabla 20: Concentración de hexanal y porcentaje de oxidación del lote AC007 almacenado a $+37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 17

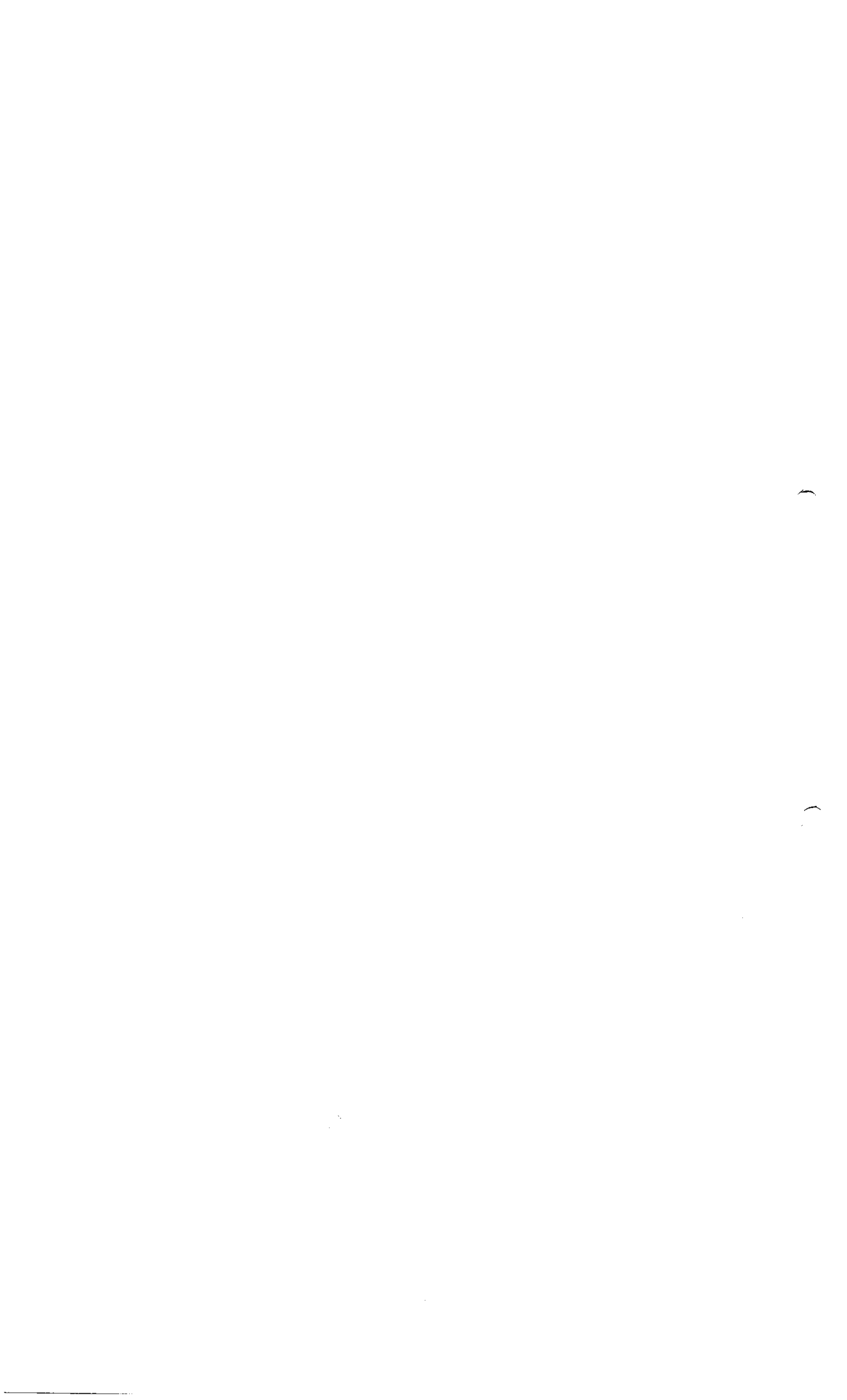




Tabla 21: Constantes de afinidad de los lotes de la tercera serie de producción (AC004, AC005 y AC007) para RF-1 Mab en T0 y después de 30 meses de almacenamiento a $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 18

Tabla 22: Porcentaje de hélice α calculado a partir del espectro FTIR de los lotes de la tercera serie de producción (AC004, AC005 y AC007) almacenados a $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 18

Tabla 23: Porcentaje de hélice α y lámina β calculado a partir del espectro FTIR de los lotes de la tercera serie de producción (AC004 y AC005) almacenados a $+37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 19

Tabla 24: Fluorescencia máxima de emisión (nm) de los lotes de la tercera serie de producción (AC004, AC005 y AC007) almacenados a $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 19

Tabla 25: Cuantificación de tioles libres por proteína S (con y sin SDS) de los lotes de la tercera serie de producción almacenados a $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 20

Tabla 26: Cuantificación de tioles libres por proteína S (con y sin SDS) de los lotes de la tercera serie de producción almacenados a $+37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 21





Lista de figuras

Figura 1: Análisis de microscopía electrónica mediante tinción negativa del lote AC005 después de 3 meses de almacenamiento a $+37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$15





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

1 Procedimientos analíticos

Los procedimientos analíticos aplicados en los tres estudios de estabilidad sobre los tres lotes de uniformidad de la tercera serie de producción del principio activo, antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg), se describen en la sección 3.2.S.4.2 Procedimientos analíticos. Los datos de validación de los procedimientos analíticos se presentan en 3.2.S.4.3 Validación de los procedimientos analíticos.

La determinación de la oxidación de los lípidos se describe en el párrafo 3.1.1. Los otros métodos empleados en los estudios de caracterización se presentan en la sección 3.2.S.3.1 Elucidación de la estructura y otras características.

2 Resultados

2.1 Estudio de estabilidad 1: condiciones a largo plazo a $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ durante 36 meses

Los resultados del estudio de estabilidad 1 que incluye 3 lotes de uniformidad de la tercera serie de producción de HBsAg almacenados en matraces de vidrio a $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ durante 30 meses se presentan de la tabla 1 a la tabla 3.

