



## 1 Descripción de los lotes

### 1.1 Lotes de uniformidad utilizados para elaborar el producto medicinal formulado optimizado

En la Tabla 1 se presentan tres lotes de granel de polisacárido conjugado de *Haemophilus* b (PRP-T). Estos lotes se utilizaron en la producción de la formulación optimizada de los lotes de producto medicinal incluidos en los estudios clínicos. Se eligieron al azar y son representativos de los lotes destinados a la comercialización.

**Tabla 1: Descripción de lotes de 3 lotes de uniformidad utilizados en los estudios clínicos**

| Número de lote | Tamaño del lote (mL) | Fecha de elaboración | Planta de producción | Uso del lote |
|----------------|----------------------|----------------------|----------------------|--------------|
| FA316432       | 27 345               | 13 junio 2008        | Marcy l'Etoile       | Producción   |
| FA328210       | 22 517               | 22 oct 2008          | Marcy l'Etoile       | Producción   |
| FA328213       | 30 798               | 23 oct 2008          | Marcy l'Etoile       | Producción   |

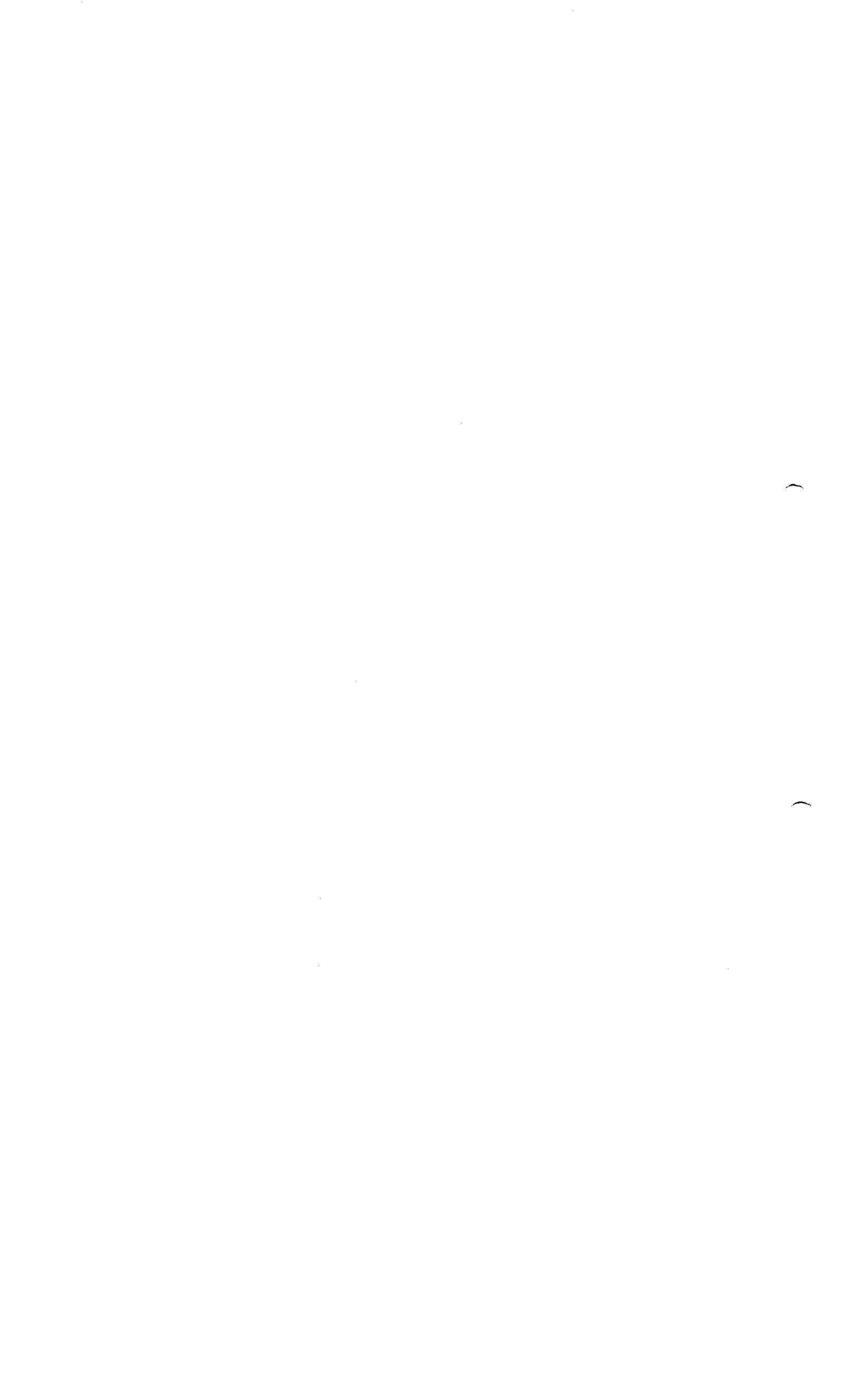
### 1.2 Lotes de producción actuales

En la Tabla 2 se presentan tres lotes industriales de PRP-T. Se eligieron al azar y por lo tanto representan de forma adecuada los lotes de producción actuales.

**Tabla 2: Descripción de lotes de los 3 lotes de producción de PRP-T**

| Número de lote | Tamaño del lote (mL) | Fecha de elaboración | Planta de producción | Uso del lote |
|----------------|----------------------|----------------------|----------------------|--------------|
| FA381843*      | 36 815               | 10 mar 2010          | Marcy l'Etoile       | Producción   |
| FA382491       | 36 053               | 19 mar 2010          | Marcy l'Etoile       | Producción   |
| FA384370       | 33 721               | 01 abr 2010          | Marcy l'Etoile       | Producción   |

\* Este lote de PRP-T se elaboró a partir del nuevo MSL FA340193.





## 2 Tablas de resumen de los análisis de lotes

### 2.1 Datos de calidad de los lotes de uniformidad

Los resultados del control de calidad de 3 lotes de uniformidad de PRP-T se presentan en la Tabla 3.

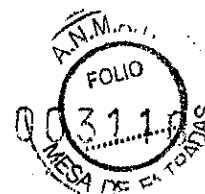
**Tabla 3: Datos de análisis de lote para los lotes de PRP-T utilizados en estudios clínicos**

| Pruebas                                                                                                   | Criterios de aceptación                                                                                                              | FA316432 | FA328210 | FA328213 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|----------|----------|
| Contenido de fósforo                                                                                      | Para calcular el contenido de polisacárido ( $\mu\text{g/mL}$ )                                                                      | 15,5     | 16,8     | 20,1     |
| Contenido de polisacárido                                                                                 | Para información; el contenido de polisacárido PRP-T se utiliza para la formulación del producto final a granel ( $\mu\text{g/mL}$ ) | 184,52   | 200,00   | 207,14   |
| Proporción polisacárido/proteína                                                                          | 0,33 – 0,55                                                                                                                          | 0,38     | 0,44     | 0,45     |
| Distribución del tamaño molecular*:<br>- LP-SEC: polisacárido eluido antes de $K_D$ 0,20 (método inicial) | $\geq 60\% \dagger$                                                                                                                  | 62,3     | 76,7     | 76,5     |
| Contenido de polisacárido libre (PRP depolimerizado)                                                      | $\leq 20\%$                                                                                                                          | < 4      | < 4      | < 4,2    |
| Contenido de proteína tetánica libre                                                                      | $\leq 1\%$                                                                                                                           | < 1      | < 1      | < 1      |
| Contenido de EDAC residual mediante colorimetría (método inicial)*                                        | < 10 $\mu\text{mol/L}$                                                                                                               | < 10     | < 10     | < 10     |
| Contenido de fenol residual mediante colorimetría (método inicial)*                                       | < 1 $\mu\text{g/mL}$                                                                                                                 | < 1      | < 1      | < 1      |
| Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica                                                                | Sin crecimiento microbiano                                                                                                           | Cumple   | Cumple   | Cumple   |
| Medición del pH                                                                                           | 6,5-7,5                                                                                                                              | 7,08     | 7,02     | 7,09     |
| Contenido de sacarosa                                                                                     | Para información (g/l)                                                                                                               | 81,39    | 84,18    | 86,31    |

\* Estas pruebas fueron los métodos analíticos de liberación utilizados en el momento en que se realizaron los análisis de estos lotes (que también se utilizan en el marco de los estudios de estabilidad) y se presentan en la sección 3.2.S.7.3 Datos de estabilidad.

† El criterio de aceptación fue el criterio de aceptación vigente en el momento en que se realizaron los análisis.





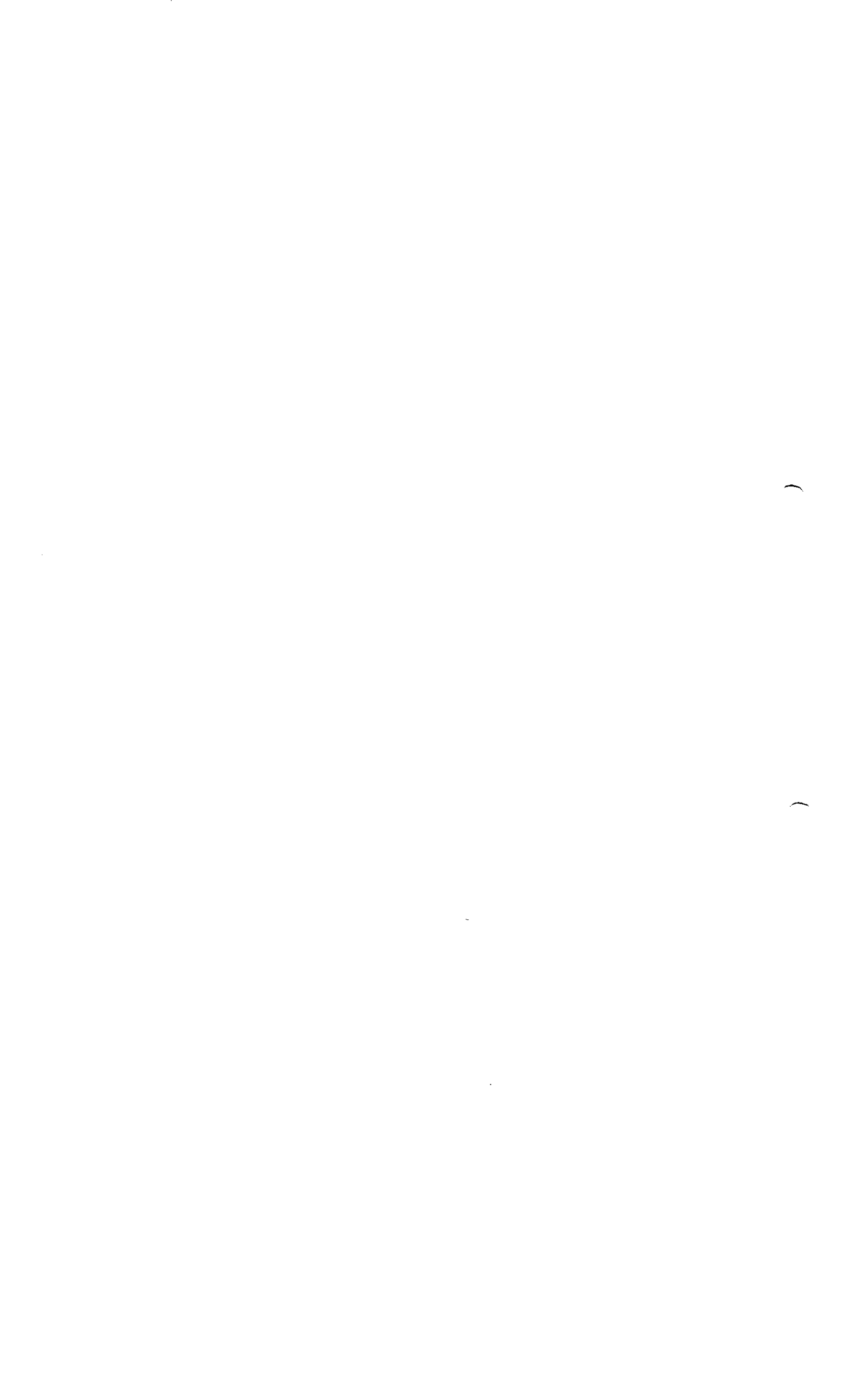
## 2.2 Datos de calidad de los lotes de producción de PRP-T actuales

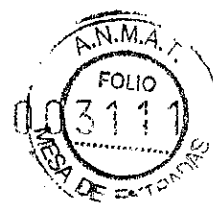
Los resultados del control de calidad de 3 lotes actuales de PRP-T se presentan en la Tabla 4.

**Tabla 4: Datos de los análisis de lote de 3 lotes de producción actuales**

| Pruebas                                                                                                              | Criterios de aceptación                                                                                                              | FA381843*                      | FA382491                        | FA384370                       |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| Contenido de fósforo                                                                                                 | Para calcular el contenido de polisacárido ( $\mu\text{g/mL}$ )                                                                      | 19,0                           | 20,6                            | 22,7                           |
| Contenido de polisacárido                                                                                            | Para información; el contenido de polisacárido PRP-T se utiliza para la formulación del producto final a granel ( $\mu\text{g/ml}$ ) | 226,19                         | 245,24                          | 270,24                         |
| Proporción polisacárido/proteína                                                                                     | 0,33 - 0,55                                                                                                                          | 0,41                           | 0,41                            | 0,45                           |
| Distribución del tamaño molecular; coeficiente de partición $K_D$ , radio hidrodinámico $R_h$ y peso molecular $M_w$ | $K_D \leq 0,37$<br>$R_h \geq 30 \text{ nm}$<br>$M_w \geq 4,2 \cdot 10^6 \text{ Da}$                                                  | 0,29<br>39<br>$8,5 \cdot 10^6$ | 0,25<br>47<br>$11,4 \cdot 10^6$ | 0,29<br>40<br>$8,0 \cdot 10^6$ |
| Contenido de polisacárido libre (PRP depolimerizado)                                                                 | $\leq 20 \%$                                                                                                                         | < 3,7                          | < 3,2                           | 3,3                            |
| Contenido de proteína tetánica libre                                                                                 | $\leq 1\%$                                                                                                                           | < 1                            | < 1                             | < 1                            |
| Prueba de límite de EDAC residual                                                                                    | < 10 $\mu\text{mol/L}$                                                                                                               | < 10                           | < 10                            | < 10                           |
| Prueba de límite de EDU residual                                                                                     | < 10 $\mu\text{mol/L}$                                                                                                               | < 10                           | < 10                            | < 10                           |
| Prueba de límite de fenol residual                                                                                   | < 1 $\mu\text{g/mL}$                                                                                                                 | < 1                            | < 1                             | < 1                            |
| Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica                                                                           | Sin crecimiento microbiano                                                                                                           | Cumple                         | Cumple                          | Cumple                         |
| Medición del pH                                                                                                      | 6,5-7,5                                                                                                                              | 7,06                           | 7,07                            | 7,09                           |
| Contenido de sacarosa                                                                                                | Para información (g/l)                                                                                                               | 82,97                          | 84,27                           | 83,07                          |

\* Este lote de PRP-T se elaboró a partir del nuevo MSL FA340193.





### 3.2.S.4.4

### Análisis de Lote - HBsAg

  
ROXANA MONTEMILONE  
DIRECTORA TÉCNICA  
SANGRE PASTEUR S.A.

  
CHRISTIAN DIMAS  
GERENTE  
SANGRE PASTEUR S.A.





## Sección 3.2.S.4.4 - Análisis de lote


### Índice

|                                                                  |           |
|------------------------------------------------------------------|-----------|
| Lista de tablas .....                                            | 3         |
| Lista de figuras .....                                           | 4         |
| <b>1 Descripción de los lotes y análisis de lote .....</b>       | <b>5</b>  |
| 1.1 Lotes de la segunda serie de producción.....                 | 7         |
| 1.2 Lotes de la tercera serie de producción.....                 | 9         |
| 1.3 Lotes para comercialización .....                            | 11        |
| <b>2 Procedimientos analíticos históricos y validación .....</b> | <b>12</b> |
| 2.1 Contenido de HBsAg; ELISA Monolisa Plus.....                 | 12        |
| 2.1.1 Resumen de los procedimientos analíticos.....              | 12        |
| 2.1.1.1 Principio .....                                          | 12        |
| 2.1.1.2 Equipo .....                                             | 12        |
| 2.1.1.3 Reactivos .....                                          | 13        |
| 2.1.1.4 Procedimiento operativo .....                            | 13        |
| 2.1.1.5 Lectura, cálculos y resultados .....                     | 15        |
| 2.1.1.6 Criterios de validez .....                               | 15        |
| 2.1.2 Validación del procedimiento analítico.....                | 15        |
| 2.1.2.1 Especificidad .....                                      | 16        |
| 2.1.2.2 Linealidad.....                                          | 16        |
| 2.1.2.3 Exactitud .....                                          | 18        |
| 2.1.2.4 Precisión.....                                           | 19        |
| 2.1.2.5 Conclusión.....                                          | 20        |
| 2.2 Identificación del HBsAg: Western blot.....                  | 21        |
| 2.2.1 Resumen de los procedimientos analíticos.....              | 21        |
| 2.2.1.1 Principio .....                                          | 21        |
| 2.2.1.2 Equipo .....                                             | 21        |
| 2.2.1.3 Reactivos .....                                          | 22        |
| 2.2.1.4 Procedimientos operativos .....                          | 22        |
| 2.2.1.5 Lectura, cálculos y resultados .....                     | 23        |
| 2.2.1.6 Criterios de validez .....                               | 24        |





|         |                                                            |    |
|---------|------------------------------------------------------------|----|
| 2.2.2   | Validación del análisis Western Blot.....                  |    |
| 2.2.2.1 | Especificidad .....                                        | 24 |
| 2.2.2.2 | Conclusión.....                                            | 25 |
| 2.3     | Análisis de polipéptidos.....                              | 25 |
| 2.3.1   | Resumen de los procedimientos analíticos.....              | 25 |
| 2.3.1.1 | Principio .....                                            | 25 |
| 2.3.1.2 | Equipos.....                                               | 26 |
| 2.3.1.3 | Reactivos .....                                            | 26 |
| 2.3.1.4 | Procedimiento operativo .....                              | 27 |
| 2.3.1.5 | Lecturas, cálculos y resultados.....                       | 28 |
| 2.3.1.6 | Criterios de validez .....                                 | 29 |
| 2.3.2   | Validación del análisis de polipéptidos .....              | 29 |
| 2.3.2.1 | Especificidad .....                                        | 29 |
| 2.3.2.2 | Conclusión.....                                            | 30 |
| 2.4     | Contenido de bromuros.....                                 | 30 |
| 2.4.1   | Resumen del procedimiento analítico de Sanofi Pasteur..... | 32 |
| 2.4.1.1 | Principio .....                                            | 32 |
| 2.4.1.2 | Equipo .....                                               | 32 |
| 2.4.1.3 | Reactivos .....                                            | 33 |
| 2.4.1.4 | Procedimiento operativo .....                              | 33 |
| 2.4.1.5 | Lecturas, cálculos y resultados.....                       | 33 |
| 2.4.1.6 | Criterios de validez .....                                 | 34 |
| 2.4.2   | Validación del contenido de bromuros.....                  | 34 |
| 2.4.2.1 | Especificidad .....                                        | 35 |
| 2.4.2.2 | Linealidad.....                                            | 36 |
| 2.4.2.3 | Exactitud .....                                            | 37 |
| 2.4.2.4 | Precisión .....                                            | 39 |
| 2.4.2.5 | Límite de cuantificación.....                              | 40 |
| 2.4.2.6 | Conclusión.....                                            | 41 |

  
ROXANA MONTEMILONE  
DIRECTORA TÉCNICA  
SANOFI PASTEUR S.A.

  
CHRISTIAN DOMÍNGUEZ  
INGENIERO  
SANOFI PASTEUR S.A.





## Lista de tablas

|                                                                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 1: Evolución de los criterios de aceptación.....                                                         | 6  |
| Tabla 2: Descripción de los lotes de la segunda serie de producción.....                                       | 7  |
| Tabla 3: Resultados analíticos de los lotes de la segunda serie de producción.....                             | 8  |
| Tabla 4: Descripción de los lotes de la tercera serie de producción.....                                       | 9  |
| Tabla 5: Resultados analíticos de los lotes de la tercera serie de producción.....                             | 10 |
| Tabla 6: Descripción de los lotes para comercialización.....                                                   | 11 |
| Tabla 7: Resultados analíticos de los lotes para comercialización.....                                         | 11 |
| Tabla 8: Contenido de HBsAg, resumen de validación.....                                                        | 16 |
| Tabla 9: Linealidad: Concentración medida frente a concentración teórica (µg/mL).....                          | 17 |
| Tabla 10: Linealidad: Ecuación de la recta de regresión.....                                                   | 17 |
| Tabla 11: Exactitud: Porcentaje de recuperación promedio por nivel de concentración.....                       | 19 |
| Tabla 12: Precisión: Concentración de HBsAg (µg/mL).....                                                       | 20 |
| Tabla 13: Precisión: Características de repetibilidad y precisión intermedia.....                              | 20 |
| Tabla 14: Identificación mediante Western Blot, resumen de validación.....                                     | 24 |
| Tabla 15: Especificidad.....                                                                                   | 25 |
| Tabla 16: Demostración de especificidad del análisis de polipéptidos.....                                      | 30 |
| Tabla 17: Comparación de ambos métodos para contenido de bromuros y validaciones.....                          | 31 |
| Tabla 18: Contenido de bromuros, resumen de validación.....                                                    | 35 |
| Tabla 19: Linealidad, concentraciones medidas frente a concentraciones teóricas (mg/L).....                    | 36 |
| Tabla 20: Linealidad: Ecuación de la recta de regresión.....                                                   | 36 |
| Tabla 21: Exactitud: Recuperación promedio para cada nivel de concentración.....                               | 38 |
| Tabla 22: Exactitud: Recuperación porcentual promedio y límites de confianza del 95 %.....                     | 38 |
| Tabla 23: Precisión: Contenido de bromuros (mg/mL).....                                                        | 39 |
| Tabla 24: Precisión: Características de repetibilidad y precisión intermedia.....                              | 39 |
| Tabla 25: Límite de cuantificación: Precisión, concentración de bromuros (mg/L).....                           | 40 |
| Tabla 26: Límite de cuantificación: Precisión, características de repetibilidad y de precisión intermedia..... | 41 |

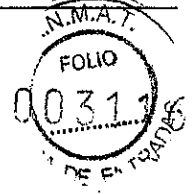




## Lista de figuras

Figura 1: Linealidad, contenido de HBsAg.....18  
Figura 2: Linealidad: Gráfico de linealidad del contenido de bromuros.....37





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

## 1 Descripción de los lotes y análisis de lote

Se presentan los datos de análisis de lote del antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) correspondientes a 14 lotes industriales obtenidos de la segunda y la tercera serie de producción y controlados con 3 perfiles de liberación distintos. De hecho, durante el desarrollo farmacéutico del HBsAg (vea la sección 3.2.S.2.6 Desarrollo del proceso de elaboración), el perfil de liberación evolucionó, motivo por el cual se presentan 3 perfiles de liberación distintos en la tabla 1 de esta sección. La justificación de la evolución de los criterios de aceptación se presenta en la sección 3.2.S.4.5 Justificación de las especificaciones.



003117  
E.F. T.M.B. S.C.

Tabla 1: Evolución de los criterios de aceptación

| Pruebas                                    | Criterios de aceptación aplicados a los lotes de la segunda serie de producción                                                                                       | Criterios de aceptación aplicados a los lotes de la tercera serie de producción                                                                                                                 | Criterios de aceptación aplicados al producto comercializado                                                        |
|--------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Aspecto                                    | Solución opalescente, levemente turbia y amarillenta que ocasionalmente muestra precipitación                                                                         | Solución opalescente, levemente turbia y amarillenta                                                                                                                                            | Solución opalescente, levemente turbia y amarillenta                                                                |
| Medición de pH                             | 6,0 - 8,0                                                                                                                                                             | 6,0 - 8,0                                                                                                                                                                                       | 6,5 - 7,5                                                                                                           |
| Contenido proteico                         | 0,75 - 1,75 mg/mL                                                                                                                                                     | 0,75 - 1,75 mg/mL                                                                                                                                                                               | 1,05 - 1,80 mg/mL                                                                                                   |
| Identificación del HBsAg*                  | Bandas principales: monómero alrededor de 23 kDa y bandas que corresponden al dímero de 47 kDa y 50 kDa (bandas simples o dobles)<br>Posible presencia de trímero†    | Bandas mayoritarias: monómero alrededor de 23 kDa y bandas que corresponden al dímero alrededor de 46 kDa (bandas simples o dobles)<br>Eventualmente, presencia de trímero alrededor de 65 kDa† | Identificación: Positiva<br>Bandas principales de peso molecular de alrededor de 23 kD, 46 kD y eventualmente 65 kD |
| Contenido de HBsAg                         | 3 - 9 mg/mL‡                                                                                                                                                          | ≥ 0,7 mg de HBsAg/mg de proteínas totales§                                                                                                                                                      | ≥ 0,7 mg de HBsAg/mg de proteínas totales§                                                                          |
| Contenido de carbohidratos                 | 30 - 60 µg de carbohidratos/mg de proteínas totales                                                                                                                   | ≤ 60 µg de carbohidratos/mg de proteínas totales                                                                                                                                                | ≤ 50 µg de carbohidratos/mg de proteínas totales                                                                    |
| Contenido de lípidos                       | 0,3 - 1,4 mg de lípidos/mg de proteínas totales                                                                                                                       | 0,3 - 1,4 mg de lípidos/mg de proteínas totales                                                                                                                                                 | 0,5 - 0,9 mg de lípidos/mg de proteínas totales                                                                     |
| Pureza                                     | ≥ 95 %                                                                                                                                                                | ≥ 95 %                                                                                                                                                                                          | ≥ 95 %                                                                                                              |
| Porcentaje de monómero libre de HBsAg      | No se realizó.                                                                                                                                                        | ≤ 3 %                                                                                                                                                                                           | ≤ 3 %                                                                                                               |
| Análisis de polipéptidos                   | Presencia: monómero de 23 kDa, dímero de 47 + 50 kDa (bandas observadas simples o dobles).<br>Presencia o ausencia de banda a los 16, 19, 29, 31, 34, 56, 61 y 69 kDa | No se realizó.                                                                                                                                                                                  | No se realiza.                                                                                                      |
| Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica | Ausencia de crecimiento microbiano                                                                                                                                    | Ausencia de crecimiento microbiano                                                                                                                                                              | Ausencia de crecimiento microbiano                                                                                  |
| Contenido de bromuros                      | <10 mg/L                                                                                                                                                              | <10 mg/L                                                                                                                                                                                        | No se realiza.                                                                                                      |
| Endotoxinas bacterianas                    | No se realizó.                                                                                                                                                        | No se realizó.                                                                                                                                                                                  | < 10 UE/dosis<br>(10 UE/10 µg de proteínas)                                                                         |

\* Identificación realizada mediante la combinación de ELISA RB y la prueba de pureza en el producto para comercialización.

† Prueba realizada mediante un análisis Western blot; las especificaciones se actualizaron sobre la base de los resultados históricos y conforme a la evolución de la metodología (vea la sección 3.2.S.2.6 Desarrollo del proceso de elaboración).

‡ Prueba realizada con el kit ELISA Monolisa Plus.

§ Cuantificación con ELISA RB expresada mediante la proporción HBsAg/proteína.





Se presentan los resultados de los siguientes lotes:

- 6 lotes de la segunda serie de producción utilizados en estudios clínicos y/o de estabilidad;
- 5 lotes de la tercera serie de producción utilizados en la validación de la uniformidad (vea la sección 3.2.S.2.5 Validación y/o evaluación del proceso) y estudios clínicos;
- 3 lotes controlados según las especificaciones declaradas que se describen en la sección 3.2.S.4.1 Especificación.

### 1.1 Lotes de la segunda serie de producción

La descripción de 6 lotes de la segunda serie de producción utilizados en estudios de uniformidad, clínicos y de estabilidad se presenta en la tabla 2.

**Tabla 2: Descripción de los lotes de la segunda serie de producción**

| Número de lote | Fecha de elaboración | Planta de producción | Escala del lote (litros) | Uso del lote                                       |
|----------------|----------------------|----------------------|--------------------------|----------------------------------------------------|
| AA001*         | 26 abr 2005          | Pilar                | Industrial               | Estudios de uniformidad, clínicos y de estabilidad |
| AA002†         | 10 mayo 2005         | Pilar                | Industrial               | Estudios de uniformidad, clínicos y de estabilidad |
| AA003‡         | 24 mayo 2005         | Pilar                | Industrial               | Estudios de uniformidad, clínicos y de estabilidad |
| AA004*         | 08 jun 2005          | Pilar                | Industrial               | Estudios de uniformidad y clínicos                 |
| AA005†         | 21 jun 2005          | Pilar                | Industrial               | Estudios de uniformidad y clínicos                 |
| AA007‡         | 19 jul 2005          | Pilar                | Industrial               | Estudios de uniformidad y clínicos                 |

\* Lotes utilizados en los estudios clínicos: A3L11 (estudio de uniformidad clínica), A3L17 y A3L22

† Lotes utilizados en los estudios clínicos: A3L11, A3L12, A3L15 y A3L21

‡ Lote utilizado en el estudio clínico: A3L11



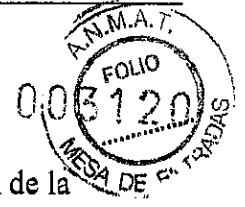


Los datos de liberación de los 6 lotes de la segunda serie de producción se presentan en la tabla 3.

**Tabla 3: Resultados analíticos de los lotes de la segunda serie de producción**

| Pruebas                                                             | Criterios de aceptación                                                                                                                                           | AA001     | AA002     | AA003     | AA004     | AA005     | AA007     |
|---------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Aspecto                                                             | Solución opalescente, levemente turbia y amarillenta que ocasionalmente muestra precipitación                                                                     | Cumple    | Cumple    | Cumple    | Cumple    | Cumple    | Cumple    |
| Medición de pH                                                      | 6,0 – 8,0                                                                                                                                                         | 7,0       | 7,0       | 7,0       | 7,0       | 7,0       | 7,0       |
| Contenido proteico                                                  | 0,75 – 1,75 mg/mL                                                                                                                                                 | 1,32      | 1,31      | 1,47      | 1,34      | 1,59      | 1,37      |
| Identificación del HBsAg                                            | Bandas principales: monómero alrededor de 23 kDa y bandas que corresponden al dímero de 47 kDa y 50 kDa (bandas simples o dobles)<br>Posible presencia de trímero | Cumple    | Cumple    | Cumple    | Cumple    | Cumple    | Cumple    |
| Contenido de HBsAg                                                  | 3 – 9 mg/mL                                                                                                                                                       | 6         | 5         | 6         | 6         | 8         | 7         |
| Contenido de carbohidratos                                          | 30 - 60 µg de carbohidratos/mg de proteínas totales                                                                                                               | 33        | 34        | 34        | 32        | 34        | 36        |
| Contenido de lípidos                                                | 0,3 – 1,4 mg de lípidos/mg de proteínas totales                                                                                                                   | 0,6       | 0,8       | 0,6       | 0,6       | 0,7       | 0,6       |
| Pureza                                                              | ≥ 95 %                                                                                                                                                            | 95        | 97        | 97        | 98        | 98        | 96        |
| Análisis de polipéptidos                                            |                                                                                                                                                                   |           |           |           |           |           |           |
| Monómero de MW 23 kDa                                               | Presencia                                                                                                                                                         | Presencia | Presencia | Presencia | Presencia | Presencia | Presencia |
| Dímero de MW 47 kDa, 50 kDa (bandas observadas juntas o separadas): | Presencia                                                                                                                                                         | Presencia | Presencia | Presencia | Presencia | Presencia | Presencia |
| MW 16 kDa                                                           | Presencia o ausencia                                                                                                                                              | Presencia | Presencia | Presencia | Presencia | Presencia | Presencia |
| MW 19 kDa                                                           |                                                                                                                                                                   | Presencia | Presencia | Presencia | Presencia | Presencia | Presencia |
| MW 29 kDa                                                           |                                                                                                                                                                   | Presencia | Presencia | Ausencia  | Presencia | Presencia | Ausencia  |
| MW 31 kDa                                                           |                                                                                                                                                                   | Presencia | Presencia | Presencia | Presencia | Presencia | Presencia |
| MW 34 kDa                                                           |                                                                                                                                                                   | Presencia | Presencia | Presencia | Presencia | Presencia | Presencia |
| MW 56 kDa                                                           |                                                                                                                                                                   | Presencia | Presencia | Presencia | Presencia | Presencia | Presencia |
| MW 61 kDa                                                           |                                                                                                                                                                   | Ausencia  | Ausencia  | Ausencia  | Presencia | Presencia | Presencia |
| MW 69 kDa                                                           |                                                                                                                                                                   | Presencia | Presencia | Presencia | Presencia | Presencia | Presencia |
| Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica                          | Ausencia de crecimiento microbiano                                                                                                                                | Cumple    | Cumple    | Cumple    | Cumple    | Cumple    | Cumple    |
| Contenido de bromuros                                               | < 10 mg/l (límite de cuantificación)                                                                                                                              | < 10      | < 10      | < 10      | < 10      | < 10      | < 10      |





## 1.2 Lotes de la tercera serie de producción

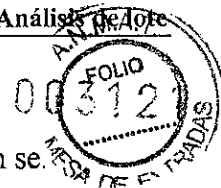
La descripción de 5 lotes de la tercera serie de producción utilizados en la validación de la uniformidad y en estudios clínicos se presenta en la tabla 4.

**Tabla 4: Descripción de los lotes de la tercera serie de producción**

| Número de lote | Fecha de elaboración | Planta de producción | Escala del lote (litros) | Uso del lote                                       |
|----------------|----------------------|----------------------|--------------------------|----------------------------------------------------|
| AC002*         | 07 dic 2007          | Pilar                | Industrial               | Estudios de uniformidad y clínicos                 |
| AC004*         | 26 dic 2007          | Pilar                | Industrial               | Estudios de uniformidad, de estabilidad y clínicos |
| AC005*         | 29 dic 2007          | Pilar                | Industrial               | Estudios de uniformidad, de estabilidad y clínicos |
| AC006          | 04 ene 2008          | Pilar                | Industrial               | Estudios de uniformidad                            |
| AC007*         | 22 mar 2008          | Pilar                | Industrial               | Estudios de uniformidad, de estabilidad y clínicos |

\* Lotes utilizados en el estudio clínico A3L24





Los datos de liberación de los 5 lotes de uniformidad de la tercera serie de producción se presentan en la tabla 5.

**Tabla 5: Resultados analíticos de los lotes de la tercera serie de producción**

| Pruebas                                    | Criterios de aceptación                                                                                                                                                                        | AC002  | AC004  | AC005  | AC006  | AC007  |
|--------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Aspecto                                    | Solución opalescente, levemente turbia y amarillenta                                                                                                                                           | Cumple | Cumple | Cumple | Cumple | Cumple |
| Medición de pH                             | 6,0 – 8,0                                                                                                                                                                                      | 6,9    | 6,9    | 6,9    | 6,9    | 6,9    |
| Contenido proteico                         | 0,75 – 1,75 mg/mL                                                                                                                                                                              | 1,49   | 1,46   | 1,45   | 1,39   | 1,45   |
| Identificación del HBsAg                   | Bandas mayoritarias: monómero alrededor de 23 kDa y bandas que corresponden al dímero alrededor de 46 kDa (bandas simples o dobles)<br>Eventualmente, presencia de trímero alrededor de 65 kDa | Cumple | Cumple | Cumple | Cumple | Cumple |
| 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                                     | ≥ 95 %                                                                                                                                                                                         | 97     | 96     | 96     | 98     | 97     |
| Porcentaje de monómero libre de HBsAg      | ≤ 3 %                                                                                                                                                                                          | Cumple | Cumple | Cumple | Cumple | Cumple |
| Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica | Ausencia de crecimiento microbiano                                                                                                                                                             | Cumple | Cumple | Cumple | Cumple | Cumple |
| Contenido de bromuros                      | <10 mg/L                                                                                                                                                                                       | < 10   | < 10   | < 10   | < 10   | < 10   |

\* Prueba realizada con el kit ELISA Rhein Biotech.

ROXANA MONTEMILONE  
DIRECTORA TÉCNICA  
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMÍNGUEZ  
GERENTE  
SANOFI PASTEUR S.A.





### 1.3 Lotes para comercialización

La descripción de 3 lotes que posiblemente se comercialicen controlados según la especificación declarada se presenta en la tabla 6.

**Tabla 6: Descripción de los lotes para comercialización**

| Número de lote | Fecha de elaboración | Planta de producción | Escala del lote (litros) | Uso del lote |
|----------------|----------------------|----------------------|--------------------------|--------------|
| AC089          | 10 ago 2010          | Pilar                | Industrial               | Producción   |
| AC090          | 17 ago 2010          | Pilar                | Industrial               | Producción   |
| AC091          | 24 ago 2010          | Pilar                | Industrial               | Producción   |

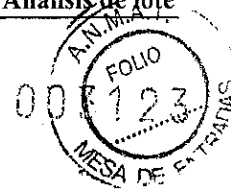
Los datos de liberación de estos 3 lotes que posiblemente se comercialicen se presentan en la tabla 7.

**Tabla 7: Resultados analíticos de los lotes para comercialización**

| Pruebas                                    | Criterios de aceptación                                                                 | AC089    | AC090    | AC091    |
|--------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|----------|----------|----------|
| Aspecto                                    | Solución opalescente, levemente turbia y amarillenta                                    | Cumple   | Cumple   | Cumple   |
| Medición de pH                             | 6,5 – 7,5                                                                               | 6,9      | 6,9      | 6,9      |
| Contenido proteico                         | 1,05 – 1,80 mg/mL                                                                       | 1,59     | 1,50     | 1,49     |
| Identificación del HBsAg                   | Identificación: Positiva                                                                | Positiva | Positiva | Positiva |
|                                            | Bandas principales de peso molecular de alrededor de 23 kD, 46 kD y eventualmente 65 kD | Cumple   | Cumple   | Cumple   |
| Contenido de HBsAg*                        | Contenido: $\geq 0,7$ mg de HBsAg/mg de proteínas totales                               | 1,0      | 1,1      | 1,1      |
| Contenido de carbohidratos                 | $\leq 50$ $\mu$ g de carbohidratos/mg de proteínas totales                              | 30       | 30       | 31       |
| Contenido de lípidos                       | 0,5 – 0,9 mg de lípidos/mg de proteínas totales                                         | 0,7      | 0,7      | 0,7      |
| Pureza                                     | $\geq 95$ %                                                                             | 96       | 96       | 96       |
| Porcentaje de monómero libre de HBsAg      | $\leq 3$ %                                                                              | Cumple   | Cumple   | Cumple   |
| Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica | Ausencia de crecimiento microbiano                                                      | Cumple   | Cumple   | Cumple   |
| Endotoxinas bacterianas                    | $< 10$ UE/dosis (10 UE/10 $\mu$ g de proteínas)                                         | $< 10$   | $< 10$   | $< 10$   |

\* Prueba realizada con el kit ELISA Rhein Biotech.





## 2 Procedimientos analíticos históricos y validación

A continuación se describen los procedimientos analíticos que se aplican solamente a los lotes de la segunda y la tercera serie de producción, y no a los lotes comerciales, con su validación. Los procedimientos analíticos utilizados para controlar los lotes para comercialización se describen en la sección 3.2.S.4.2 Procedimientos analíticos.

### 2.1 Contenido de HBsAg; ELISA Monolisa Plus

#### 2.1.1 Resumen de los procedimientos analíticos

Este análisis ELISA basado en un kit comercial se utilizó para determinar el contenido de HBsAg de los lotes de la segunda serie de producción. Dado que el proveedor lo discontinuó, se reemplazó por un análisis ELISA RB interno en la especificación de liberación declarada.

##### 2.1.1.1 Principio

El método Monolisa Plus es un método inmunoenzimático que utiliza 2 anticuerpos monoclonales distintos:

- El primer anticuerpo monoclonal (Ac1) fijado en la placa captura las partículas de HBsAg;
- El segundo anticuerpo monoclonal (Ac2) unido a una enzima de peroxidasa también reconoce las partículas de HBsAg.

Estos 2 Ac monoclonales se obtienen contra distintos epítomos de la partícula de HBsAg.

La cantidad de enzima de peroxidasa unida al complejo (Ac1-HBsAg-Ac2) se mide después de una incubación con un sustrato de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y cromógeno o-fenilendiamina (OPD).

La intensidad de la coloración se mide a 490 nm. Es proporcional a la cantidad de HBsAg presente en la muestra.

##### 2.1.1.2 Equipo

- Equipo estándar de laboratorio
- Microplacas de 96 pocillos para ELISA
- Lector y sistema de lavado ELISA
- Incubadora: +37°C ± 1°C





### 2.1.1.3 Reactivos

- Albúmina de suero bovino (BSA);
- Referencia: estándar de referencia interno de HBsAg calibrado respecto de una referencia de lote heteróloga;
- Control interno: lote de producción de HBsAg;
- Solución de cloruro de sodio 4 M;
- Ortofenil diamina , dihidrocloruro;
- Kit Monolisa Plus;
- Tween 20;
- Tampón fosfato 1 M, pH 7,4: fosfato dipotásico dihidrogenado, fosfato potásico dihidrogenado;
- Tampón PBS 0,1 M;
- Solución de lavado: Tampón PBS 0,01 M – Tween 20 0,1 %;
- Solución diluyente: Tampón PBS 0,01 M – Tween 20 0,1 % – BSA 1 %;
- Tampón citrato 0,05 M, pH 5,6 – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,03 %: citrato trisódico dihidrato, ácido cítrico monohidrato, agua purificada, peróxido de hidrógeno;
- Solución de detención: ácido sulfúrico 4 N.

### 2.1.1.4 Procedimiento operativo

#### *Cobertura de las microplacas*

Prepare una dilución adecuada del anticuerpo Ac1 en tampón PBS.

Vierta este preparado en cada pocillo, cubra la microplaca e incúbela toda la noche a +5°C ±3°C.

Lave las placas con tampón de lavado.

#### *Bloqueo de microplacas*

Vierta el tampón de bloqueo en cada pocillo, cubra la microplaca e incúbela 1 hora a +37°C ± 1°C.

Lave las placas con tampón de lavado.





**Preparación de las diluciones**

- Se preparan diluciones de la muestra de HBsAg que se va a analizar, por ejemplo, de la siguiente manera:  
Dilución 1: se diluyen 50 µL de la muestra de HBsAg con solución diluyente hasta 1000 µL.  
Dilución 2: se diluyen 100 µL de la dilución 1 con solución diluyente hasta 1000 µL.  
Dilución 3: se diluyen 100 µL de la dilución 2 con solución diluyente hasta 1000 µL.  
Dilución 4: se diluyen 100 µL de la dilución 3 con solución diluyente hasta 1000 µL.  
Dilución 5: se diluyen 200 µL de la dilución 4 con solución diluyente hasta 2000 µL.  
Dilución 6: se diluyen 1000 µL de la dilución 5 con solución diluyente hasta 2000 µL.  
Dilución 7: se diluyen 1000 µL de la dilución 6 con solución diluyente hasta 2000 µL.
- Se preparan las mismas diluciones para el control interno. Se deposita solamente la dilución 6.
- Se diluye el estándar de referencia de HBsAg con solución diluyente, por ejemplo, de la siguiente manera:  
Dilución 1: se diluyen 50 µL del estándar de referencia de HBsAg con solución diluyente hasta 1000 µL.  
Dilución 2: se diluyen 100 µL de la dilución 1 con solución diluyente hasta 1000 µL.  
Dilución 3: se diluyen 100 µL de la dilución 2 con solución diluyente hasta 1000 µL.  
Dilución 4: se diluyen 100 µL de la dilución 3 con solución diluyente hasta 1000 µL.  
Dilución 5: se diluyen 200 µL de la dilución 4 con solución diluyente hasta 2000 µL.  
Dilución 6: 500 µL de la dilución 5 + 500 µL de la dilución 7.  
Dilución 7: se diluyen 1000 µL de la dilución 5 con solución diluyente hasta 2000 µL.  
Dilución 8: se diluyen 500 µL de la dilución 7 con solución diluyente hasta 1000 µL.  
Dilución 9: se diluyen 500 µL de la dilución 8 con solución diluyente hasta 1000 µL.  
Dilución 10: se diluyen 500 µL de la dilución 9 con solución diluyente hasta 1000 µL.  
Las diluciones 5, 6, 7, 8, 9 y 10 se depositan para obtener una curva de calibración.

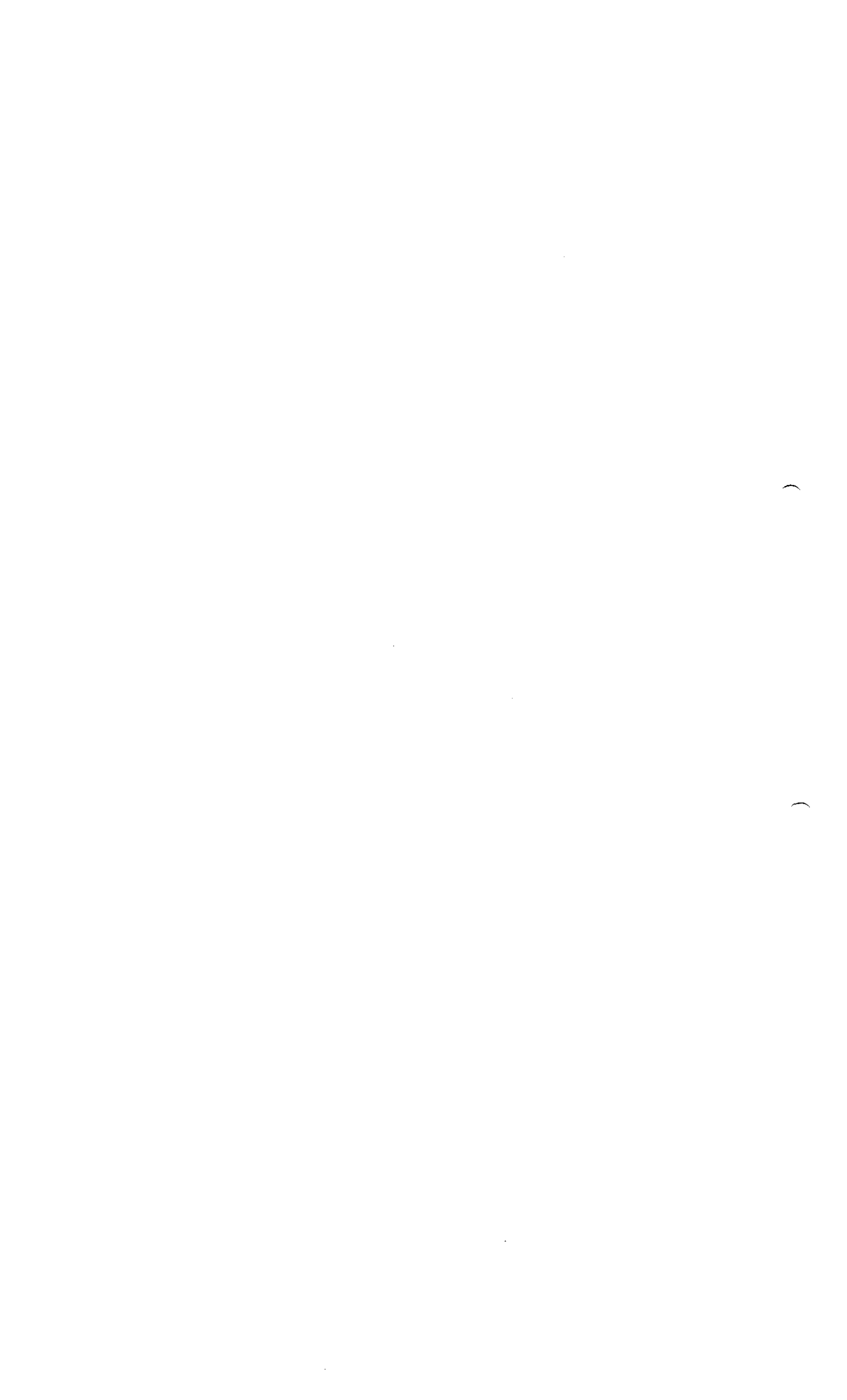
**Distribución de las diluciones**

Vierta la solución diluyente, el control interno, cada dilución de la muestra de prueba, el control interno y la solución de estándar de referencia en cada pocillo. Se cubre la microplaca y se incuba durante 90 minutos a +37°C ± 1°C.

**Adición del segundo anticuerpo**

Lave la placa con solución de lavado.

Diluya la solución conjugada del Kit con la solución diluyente para obtener una DO en 490 nm entre el punto más bajo y el más alto de la curva estándar. Por ejemplo, diluya 100 µL de conjugado con 10 mL de solución diluyente.



Vierta el conjugado diluido en cada pocillo, cubra la microplaca e incúbela 90 minutos a  $+37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .



#### **Revelado del cromógeno**

Lave las placas con tampón de lavado.

Vierta la solución del cromógeno en cada pocillo. Incúbela 30 minutos a oscuras a temperatura ambiente.

#### **Detención de la reacción**

Agregue ácido sulfúrico a cada pocillo para detener la reacción.

#### **2.1.1.5 Lectura, cálculos y resultados**

Se registra la densidad óptica (DO) de cada pocillo a 490 nm en el modo de lectura dual, con la longitud de onda de referencia a 655 nm.

Se determina la ecuación de la regresión lineal de la curva de calibración del estándar.

Se calcula el contenido de HBsAg (ng/mL) de la muestra y el control interno mediante la siguiente fórmula:

$$x = \frac{(y - b)}{a}$$

Donde:

- x = contenido de HBsAg en ng/mL;
- y = lectura de la absorbancia;
- b = intersección con el origen de la regresión lineal;
- a = pendiente de la regresión lineal.

Considerando las diluciones realizadas, el contenido de HBsAg de la muestra pura se expresa en mg/mL.

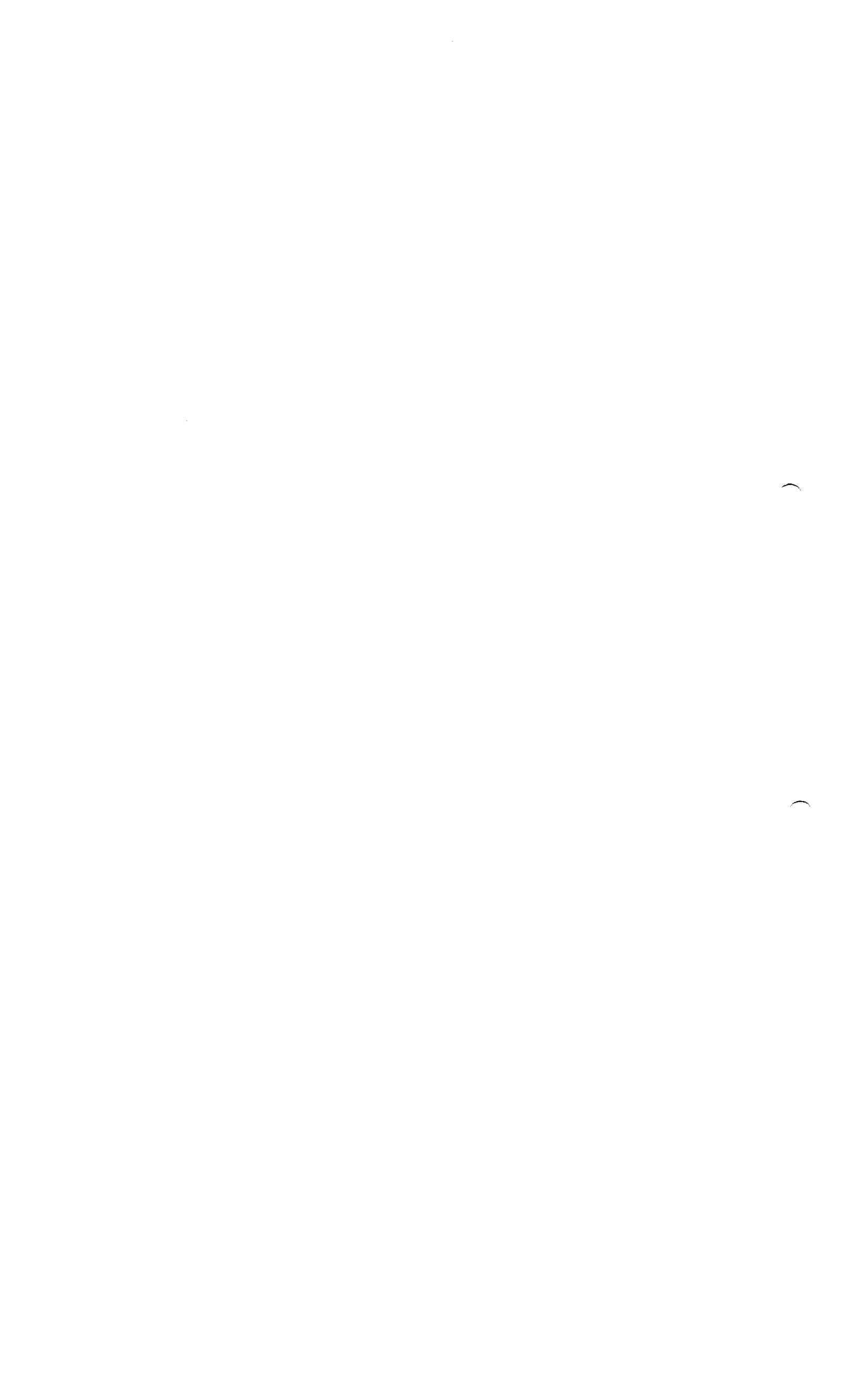
#### **2.1.1.6 Criterios de validez**

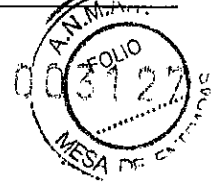
- El coeficiente de correlación de la curva de calibración debe ser  $\geq 0,98$ .
- El valor del control interno debe encontrarse dentro de los límites del gráfico de control.
- El % de desviación estándar relativa entre los resultados de diluciones independientes de la muestra de análisis debe ser  $\leq 15 \%$ .

#### **2.1.2 Validación del procedimiento analítico**

Este capítulo describe la validación del ELISA del HBsAg realizado con el kit Monolisa plus. Dado que el método es cuantitativo, las características estudiadas son especificidad, linealidad, exactitud y precisión, conforme a la guía de la ICH.

El procedimiento analítico se describe en el capítulo 2.1.1.





Los resultados de la validación se resumen en la tabla 8.

**Tabla 8: Contenido de HBsAg, resumen de validación**

| Características      | Criterios de aceptación                                                                                                           | Resultados                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Especificidad</b> | Comparación entre la cantidad de antígeno medida y la cantidad teórica de antígeno                                                | La especificidad se evaluó a través de la exactitud.<br>El valor 100 % está dentro del intervalo de confianza del 95 % de la recuperación promedio.                                                                                                                                                                                |
| <b>Linealidad</b>    | $P_{linealidad} < 0,01$<br>$P_{desviación\ de\ la\ linealidad} > 0,05$                                                            | Después de un ajuste lineal de $Y =$ concentración de HBsAg encontrada en función de $X =$ concentración de HBsAg teórica, en un sistema log-log, se observa la siguiente relación:<br>$Y = 0,27 + 0,93X$<br>Rango de linealidad: [5360 - 8410] $\mu\text{g/mL}$ equivalente a [4806 - 7147] $\mu\text{g/mg}$ de proteínas totales |
| <b>Exactitud</b>     | La recuperación porcentual promedio calculada para los 4 niveles de concentración teóricos se encuentra entre el 80 % y el 120 %. | La recuperación porcentual promedio y sus límites de confianza del 95 % son los siguientes:<br>101 % [98 - 103] %                                                                                                                                                                                                                  |
| <b>Precisión</b>     | Sin definir                                                                                                                       | Intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia para 1 corrida con 1 medición realizada del modo habitual: $\pm 0,033$ es decir, $x/\pm 1,08$ en expresión aritmética                                                                                                                                                   |

### 2.1.2.1 Especificidad

El diseño experimental fue el siguiente: 2 operadores realizaron 3 series separadas, en 3 días diferentes.

Cada corrida incluía un rango de 5 concentraciones de HBsAg. Se agregó a una cantidad fija de muestra de HBsAg 5 niveles incrementales de estándar de HBsAg.

La especificidad se evaluó a través de los resultados obtenidos en cuanto a la exactitud (vea el párrafo 2.1.2.3).

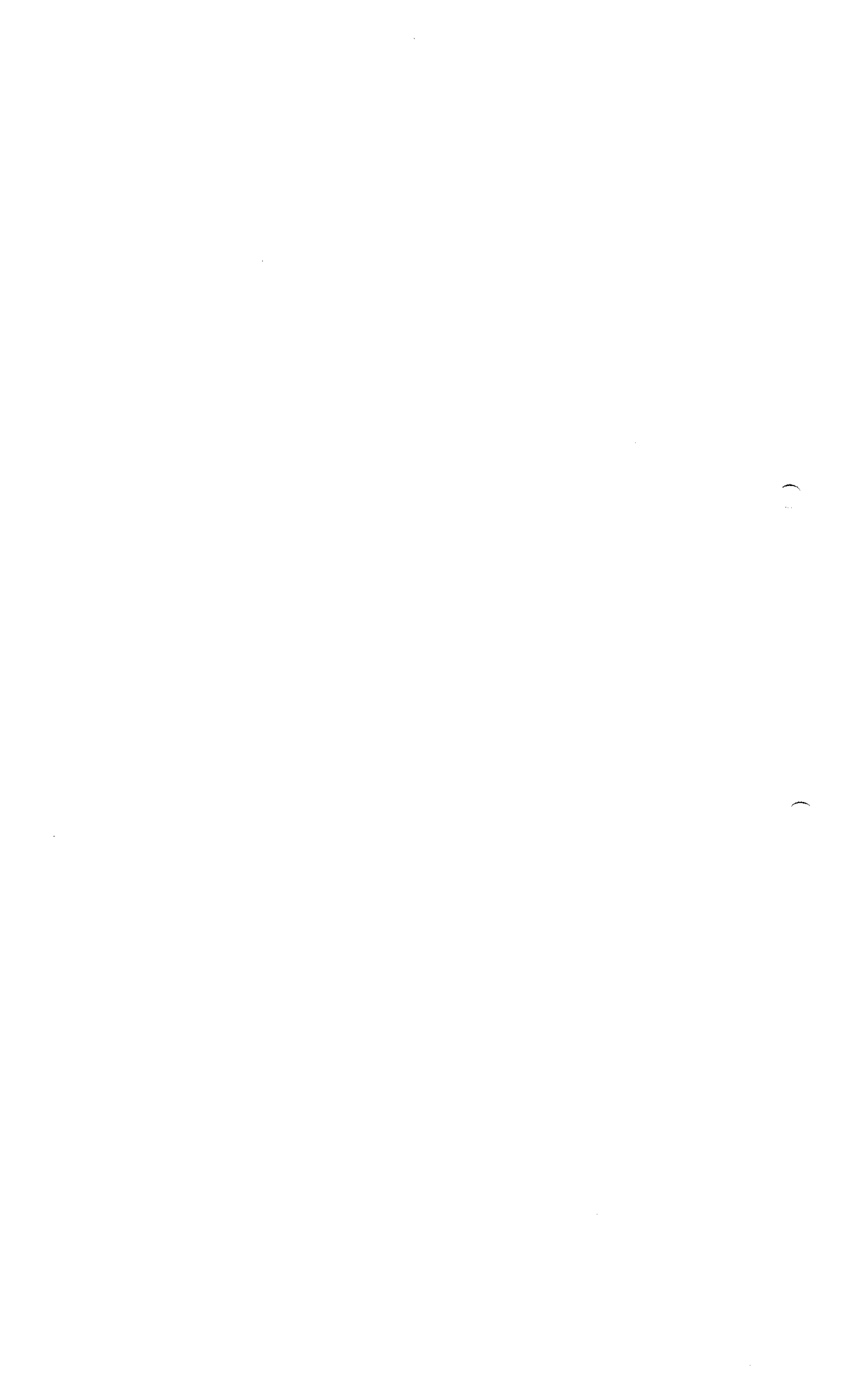
### 2.1.2.2 Linealidad

El diseño experimental fue el siguiente: 2 operadores realizaron 3 series separadas, en 3 días diferentes.

Cada corrida incluía un rango de 5 concentraciones de HBsAg. A una cantidad fija de muestra de HBsAg se le agregaron 5 niveles incrementales de estándar de HBsAg.

#### 2.1.2.2.1 Resultados analíticos

Los datos sometidos a análisis son el contenido de HBsAg (muestra con agregado), expresado en  $\mu\text{g/mL}$ , y se presentan en la tabla 9.





**Tabla 9: Linealidad: Concentración medida frente a concentración teórica (µg/mL)**

| % de agregado de HBsAg | Cantidad teórica (muestra + agregado) µg/mL | Cantidad medida (muestra + agregado) µg/mL |         |         |
|------------------------|---------------------------------------------|--------------------------------------------|---------|---------|
|                        |                                             | Serie 1                                    | Serie 2 | Serie 3 |
| 0                      | 6080                                        | 6331                                       | 6102    | 6546    |
| 5                      | 6384                                        | 6253                                       | 5890    | 6307    |
| 10                     | 6688                                        | 7258                                       | 6562    | 6752    |
| 15                     | 6992                                        | 7559                                       | 6866    | 6832    |
| 20                     | 7296                                        | 7251                                       | 7128    | 7499    |

**2.1.2.2.2 Análisis**

La linealidad en el rango elegido se analiza mediante los siguientes pasos:

- La homogeneidad de las varianzas límite se verifica mediante la prueba de Cochran.
- La dependencia entre la concentración teórica y la concentración medida de HBsAg, y la linealidad de esta relación, se analizan mediante una regresión lineal no ponderada utilizando el método de los cuadrados mínimos. Debe mostrar una pendiente significativa y una desviación no significativa de la linealidad.

La ecuación de la recta de regresión se presenta en la tabla 10.

**Tabla 10: Linealidad: Ecuación de la recta de regresión**

| Ecuación de la recta de regresión                                    | Coefficiente de correlación lineal | Rango de linealidad en µg/mL |
|----------------------------------------------------------------------|------------------------------------|------------------------------|
| $Y = (0,27 \pm 1,55) + (0,93 \pm 0,41) \cdot X$                      | $R^2 = 0,8093$                     | [5360 - 8410]                |
| Donde: X = log concentración teórica<br>Y = log concentración medida |                                    |                              |
| $P_{\text{linealidad}} < 0,01$                                       |                                    |                              |
| $P_{\text{desviación de la linealidad}} > 0,05$                      |                                    |                              |

