



2 Definición de lotes y escala

2.1 Definición del tamaño del lote

Un lote del principio activo antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) es la cantidad de antígeno purificado, producido por la fermentación de la levadura *Hansenula polymorpha*.

El tamaño del lote industrial de fermentación del HBsAg es de aproximadamente 50 litros. Este tamaño de lote industrial corresponde a alrededor de 50 generaciones celulares obtenidas durante los pasos de fermentación.

Actualmente, un lote de HBsAg típicamente corresponde a alrededor de 5 g de proteínas.

2.2 Sistema de numeración de lotes

Los lotes MSL y WSL se numeran mediante un sistema manual:

MCB DDMYYBA → MCB indica 'banco maestro de células' (también denominado lote de siembra maestro, MSL), *DD* indica el día, *MM* el mes, *YY* el año y *BA* indica Buenos Aires.

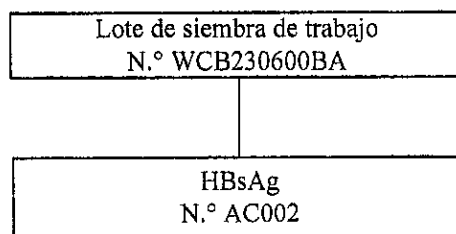
WCB DDMYYBA → WCB indica 'banco de células de trabajo' (también denominado lote de siembra de trabajo, WSL), *DD* indica el día, *MM* el mes, *YY* el año y *BA* indica Buenos Aires.

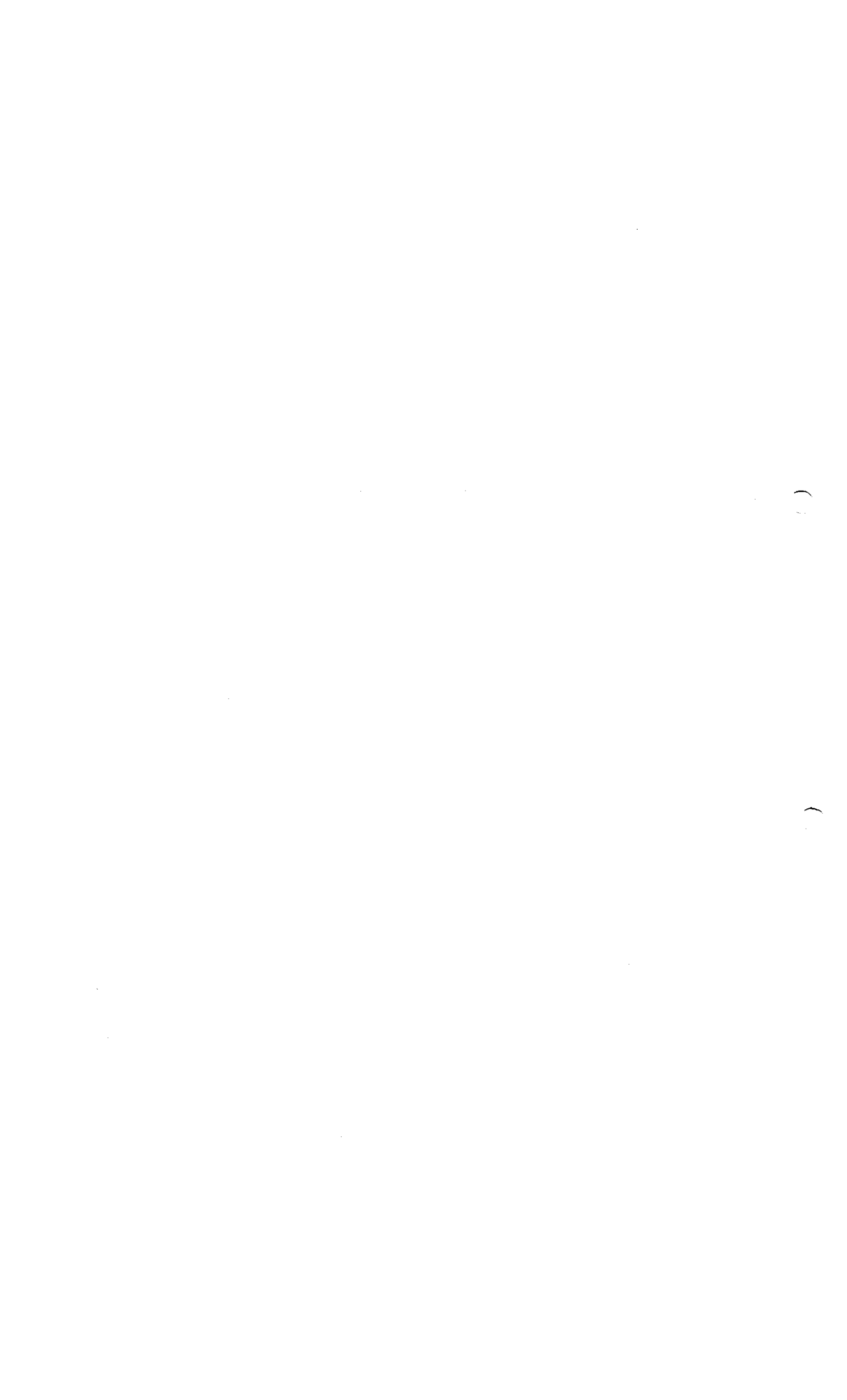
La numeración de los lotes de principio activo es definida en parte por la compañía y en parte por un sistema informático:

AYxxx → *A* indica Argentina, *Y* es una letra asignada por la compañía a partir de la *A*, *xxx* es un número secuencial asignado por el sistema informático a partir del 001.

A continuación se muestra un ejemplo de la numeración de lotes.

Figura 2: Sistema de numeración de lotes: Ejemplo







3.2.S.2.2

Cultivo y Cosecha Celular - HBsAg


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.





Sección 3.2.S.2.2 - Descripción del proceso de elaboración y los controles del proceso

Cultivo y cosecha celular

Índice

Lista de tablas	3
Lista de figuras	4
1 Fermentación de <i>Hansenula polymorpha</i> y cosecha del antígeno de superficie de la hepatitis B	5
1.1 Fermentación de <i>Hansenula polymorpha</i>	7
1.2 Cosecha del antígeno de superficie de la hepatitis B	8
1.2.1 Lavado celular (etapa 1.4)	8
1.2.2 Fragmentación celular (etapa 1.5)	8
1.2.3 Precipitación con polietilenglicol (PEG) (etapa 1.6)	8
1.2.4 Adsorción y lavado (etapa 1.7)	8
1.2.5 Desorción (etapa 1.8)	9
1.2.6 Clarificación (etapa 1.9)	9
2 Controles durante el proceso	10
3 Medios de cultivo, tampones y otros aditivos empleados durante el cultivo y la cosecha celular	11
3.1 Medio de precultivo	11
3.1.1 Composición del medio de precultivo	11
3.1.2 Solución de mezcla de sales	11
3.1.3 Solución de cloruro de calcio	11
3.1.4 Solución de microelementos	11
3.1.5 Solución vitamínica	12
3.1.6 Solución de elementos traza	12
3.2 Medio de producción	13
3.3 Tampón de lavado celular	13
3.3.1 Solución de lavado concentrada	13
3.4 Solución detergente	13



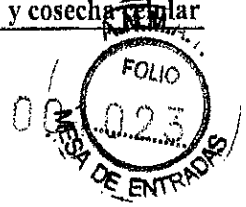


3.5	Solución de inhibidor de proteasa.....	14
3.6	Solución de cloruro de sodio 5M.....	14
3.7	Solución de polietilenglicol	14
3.7.1	Solución de trometamol (tris [hidroximetil] aminometano).....	14
3.8	Suspensión de dióxido de silicio coloidal.....	14
3.9	Tampón de lavado de pellet.....	14
3.10	Tampón de desorción.....	15
3.11	Solución de cloruro de sodio 3 M.....	15
3.12	Otros.....	15


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.





Lista de tablas

Tabla 1: Controles durante el proceso realizados durante la fermentación y la cosecha10


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TECNICA
SANOFI PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.



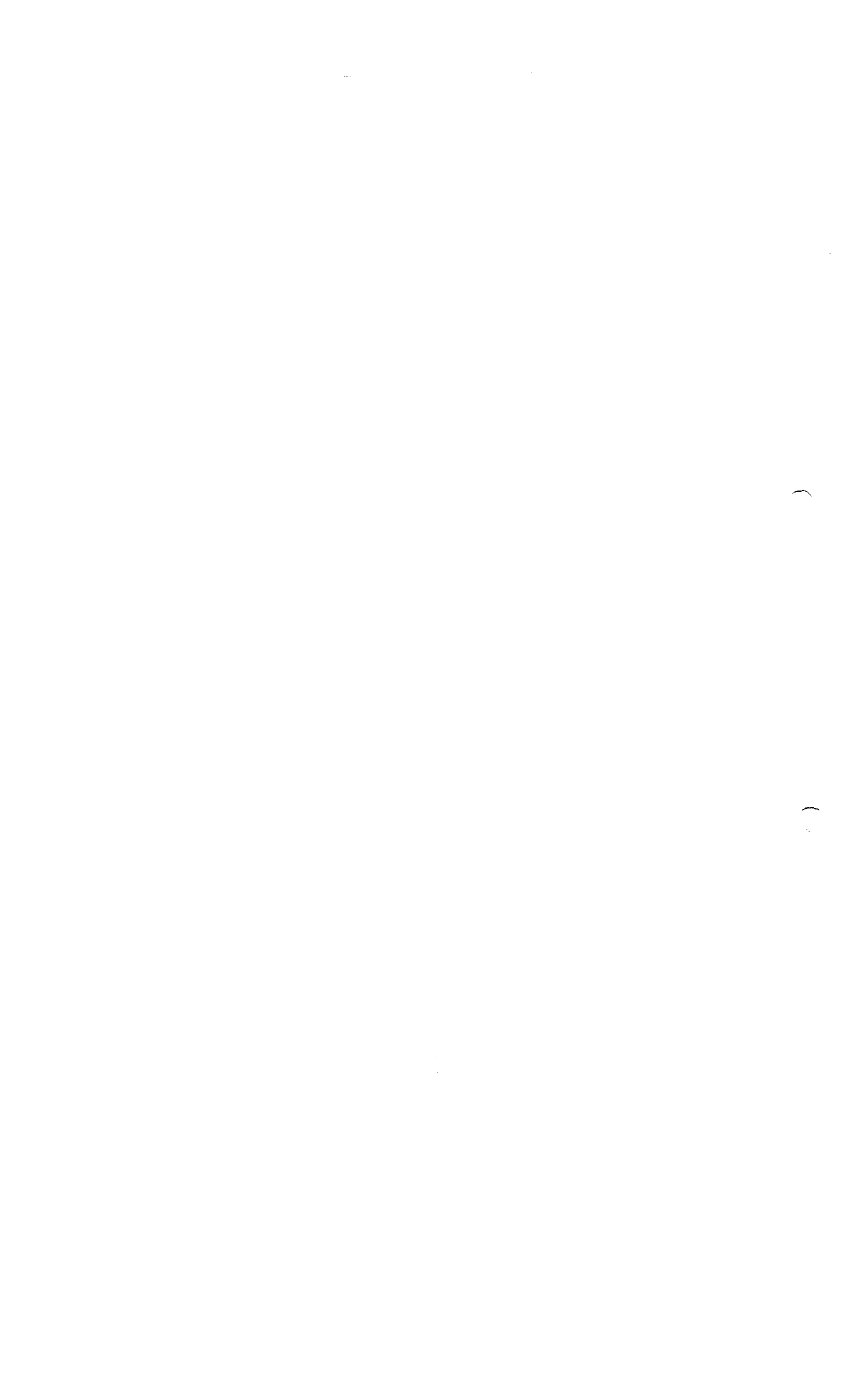


Lista de figuras

Figura 1: Diagrama de flujo del proceso de fermentación y cosecha en la elaboración del antígeno de superficie de la hepatitis B.....6


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.





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

Lista de los materiales y equipos utilizados durante este proceso de elaboración: vea la sección 3.2.A.1 Instalaciones y equipos.

El proceso de elaboración que se describe a continuación se completa con los programas de validación presentados en 3.2.S.2.5 Validación y/o evaluación del proceso, con estudios sobre los parámetros de producción y los controles durante el proceso.

1 Fermentación de *Hansenula polymorpha* y cosecha del antígeno de superficie de la hepatitis B

El flujo de proceso de la fermentación de *Hansenula polymorpha* y la cosecha de HBsAg se presenta a continuación en la Figura 1.

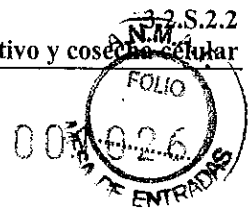
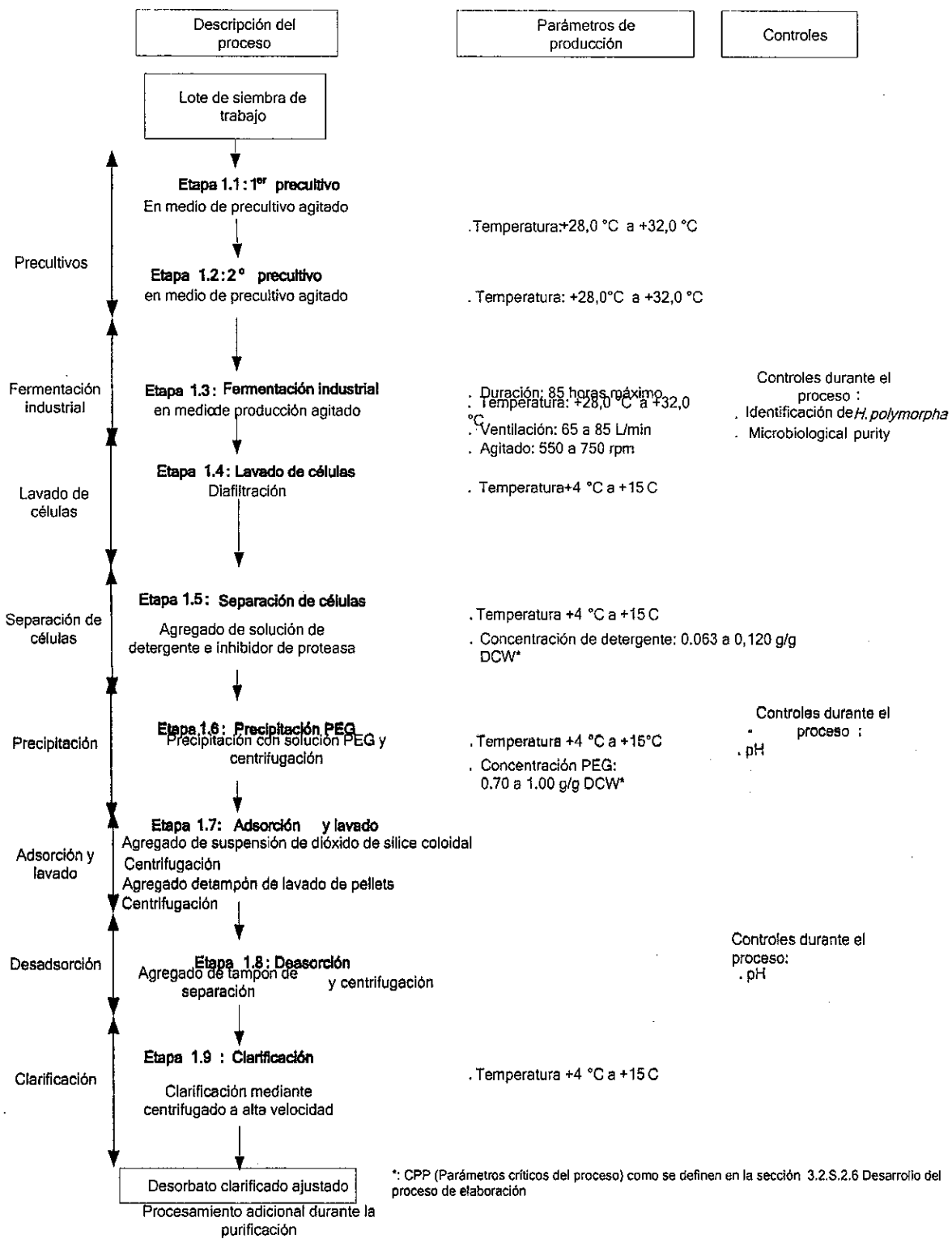


Figura 1: Diagrama de flujo del proceso de fermentación y cosecha en la elaboración del antígeno de superficie de la hepatitis B







1.1 Fermentación de *Hansenula polymorpha*

Etapa 1.1: Primer precultivo en medio de precultivo

Se descongelan células de *Hansenula polymorpha* de un lote de siembra de trabajo (WSL) a temperatura ambiente (19 - 25°C). Luego se realiza el primer precultivo en un matraz inoculando el contenido del vial de lote de siembra de trabajo en alrededor de 300 mL de medio de precultivo (vea el apartado 3.1) y se incuba bajo agitación a una temperatura de entre +28,0°C y +32,0°C hasta que la DO_{600nm} alcance un valor incluido en el rango 4,3 – 7,0.

Etapa 1.2: Segundo precultivo en medio de precultivo

Un fermentador (5 litros) que contiene medio de precultivo (vea el apartado 3.1) se inocula con un volumen del primer precultivo (definido mediante el cálculo de la proporción entre un valor comprendido en el rango 24 – 26 y el valor de la DO_{600nm} del primer precultivo). La fermentación se realiza bajo agitación y aireación a una temperatura de entre +28,0°C y +32,0°C hasta alcanzar como mínimo una DO_{600nm} = 45,0. De ser necesario, se utiliza una solución antiespumante (vea el apartado 3.12).

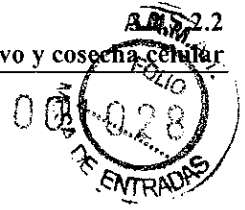
Etapa 1.3: Fermentación industrial en medio de producción

Un fermentador (50 litros) que contiene medio de producción (vea el apartado 3.2) se inocula con un volumen del segundo precultivo con el que se obtiene una DO_{600nm} igual a 2,2 a 2,8 unidades de absorción. La fermentación se realiza bajo agitación (550 a 750 rpm) y aireación (65 a 85 L/min) a una temperatura de entre +28,0°C y +32,0°C durante un máximo de 85 horas. De ser necesario, se utiliza una solución antiespumante (vea el apartado 3.12).

Durante este cultivo industrial tienen lugar tres fases:

- *Fase de crecimiento*: cultivo de la población celular, durante 24 a 34 h, a fin de generar suficiente biomasa, con glicerol como única fuente de carbono sin limitación (condiciones de represión);
- *Fase de desrepresión*: se limita la concentración de glicerol utilizando solución de desrepresión (vea el apartado 3.12), a fin de lograr la desrepresión de la expresión del gen del HBsAg. Esta fase dura de 17 a 27 h;
- *Fase de inducción*: Luego se introduce metanol como nueva fuente de carbono utilizando la solución de inducción (vea el apartado 3.12), a fin de inducir la expresión intracelular del HBsAg. Esta fase dura de 17 a 24 h.

Al final de la etapa 1.3, se toman muestras para realizar los controles durante el proceso (vea el apartado 2).



1.2 Cosecha del antígeno de superficie de la hepatitis B

1.2.1 Lavado celular (etapa 1.4)

El cultivo industrial se enfría a entre +4°C y +15°C, y se diafiltra con tampón de lavado celular (corte de la membrana: 0,45 µm) hasta alcanzar un pH > 6,5 y una conductividad < 6,0 mS/cm. El filtrado se descarta.

1.2.2 Fragmentación celular (etapa 1.5)

Manteniendo la temperatura entre +4°C y +15°C, se añade solución detergente (vea el apartado 3.4) al cultivo de células lavadas (0,063 a 0,120 g/g DCW), para debilitar los componentes de la membrana celular.

Luego la suspensión se somete a una fragmentación de alta presión (por lo menos 1500 bares) mientras se añade continuamente solución de inhibidor de proteasa (vea el apartado 3.5).

Al final de este paso se obtiene el extracto celular crudo.

1.2.3 Precipitación con polietilenglicol (PEG) (etapa 1.6)

Manteniendo la temperatura entre +4°C y +15°C, el extracto celular crudo se diluye con tampón de lavado celular (vea el apartado 3.3). Luego se añade solución de cloruro de sodio 5 M (vea el apartado 3.6) y solución PEG (vea el apartado 3.7) hasta obtener una concentración final de PEG de entre 0,70 y 1,00 g por g de células secas, con lo cual se permite que precipiten las impurezas y los residuos celulares.

A continuación se obtiene el sobrenadante de PEG mediante centrifugación continua a alrededor de 18600 g a una temperatura entre +4°C y +15°C; el pellet se desecha.

Se toma una muestra para realizar controles durante el proceso (vea el apartado 2) a fin de verificar que el valor del pH se encuentre dentro del rango adecuado antes del paso siguiente.

1.2.4 Adsorción y lavado (etapa 1.7)

Posteriormente el sobrenadante de PEG se purifica mediante adsorción en dióxido de silicio coloidal: se añade suspensión de dióxido de silicio coloidal (vea el apartado 3.8) al sobrenadante de PEG hasta lograr una concentración final de 0,8% a 1,6% (p/p) de dióxido de silicio coloidal. La suspensión obtenida se agita a una temperatura de entre +4°C y +15°C, lo cual permite la adsorción del HBsAg. Luego, la suspensión resultante se centrifuga a alrededor de 3300 g y el sobrenadante que contiene impurezas se desecha.

El pellet se lava a entre +4°C y +15°C con alrededor de 15 volúmenes equivalentes de tampón de lavado de pellet (vea el apartado 3.9) y luego se centrifuga de nuevo a alrededor de 3300 g. El pellet restante se recupera con agua purificada y el sobrenadante se desecha.

Al final de este paso se obtiene el adsorbato lavado de dióxido de silicio coloidal.



1.2.5 Desorción (etapa 1.8)

Al adsorbato obtenido previamente, se le añade tampón de desorción (vea el apartado 3.10) y agua purificada. El pH inicial del adsorbato = 6,5 – 7,5 cambia durante este paso de mezcla con tampón de desorción hasta llegar a un pH = 8,1 – 8,5.

Se toma una muestra para los controles durante el proceso (ver el apartado 2).

Luego, el tanque se calienta y se mantiene bajo agitación continua, lo que permite la desorción del HBsAg.

A continuación se centrifuga la suspensión a alrededor de 18600 g y se desecha el pellet que contiene el dióxido de silicio coloidal y las impurezas.

Al final de este paso se obtiene el desorbato crudo.

1.2.6 Clarificación (etapa 1.9)

El desorbato crudo se clarifica mediante una centrifugación continua a alta velocidad (alrededor de 22400 g) a entre +4°C y +15°C para eliminar las partículas restantes de dióxido de silicio coloidal a fin de evitar la contaminación durante la purificación posterior mediante cromatografía.

Se añade solución de cloruro de sodio 3 M (vea el apartado 3.11) al desorbato clarificado para ajustar la conductividad a entre 5,90 y 6,90 mS/cm.

El producto obtenido al final de esta etapa es el desorbato clarificado ajustado. Se toma una muestra para realizar controles durante el proceso antes de seguir con el procesamiento en el proceso de purificación; vea la sección 3.2.S.2.2 Reacciones de purificación y modificación.

