

2 Controles durante el proceso

Los controles durante el proceso aplicados durante la fermentación de *Hansenula polymorpha* y la cosecha de proteína se presentan en la Tabla 1.

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

Pasos de elaboración	Controles durante el proceso		
	Pruebas	Criterios de aceptación	Justificación
Etapa 1.3: Fermentación industrial	Pureza microbiológica (método interno)	Cumple	Asegurar la ausencia de contaminación
	Identificación de <i>H. polymorpha</i> (método interno)	Cumple	Permitir la identificación microbiológica de las células huésped
Etapa 1.6: Precipitación de PEG	pH (Determinación potenciométrica – método interno)	6,0 – 7,0	Asegurar que el sobrenadante de PEG tenga un pH adecuado para realizar el paso siguiente (adsorción en dióxido de silicio coloidal)
Etapa 1.8: Desorción	pH (Determinación potenciométrica – método interno)	8,1 – 8,5	Asegurar que el adsorbato tenga un pH adecuado para realizar la desorción del dióxido de silicio coloidal



3 Medios de cultivo, tampones y otros aditivos empleados durante el cultivo y la cosecha celular

3.1 Medio de precultivo

3.1.1 Composición del medio de precultivo

- Solución de mezcla de sales (vea el apartado 3.1.2)
- Glicerol al 85%
- Solución de cloruro de calcio (vea el apartado 3.1.3)
- Solución de microelementos (vea el apartado 3.1.4)
- Solución vitamínica (vea el apartado 3.1.5)
- Solución de elementos traza (vea el apartado 3.1.6)
- Agua purificada

Luego se utiliza una solución alcalina (vea el apartado 3.12) a fin de obtener un pH final comprendido entre 4,9 y 5,1. Esta solución se filtra antes de usarse (tamaño de poro de 0,2 μm).

3.1.2 Solución de mezcla de sales

- Cloruro de sodio
- Sulfato de magnesio, 7 H₂O
- Fosfato diácido de amonio
- Cloruro de potasio
- Agua purificada

Antes de usarse, esta solución se filtra mediante filtración profunda.

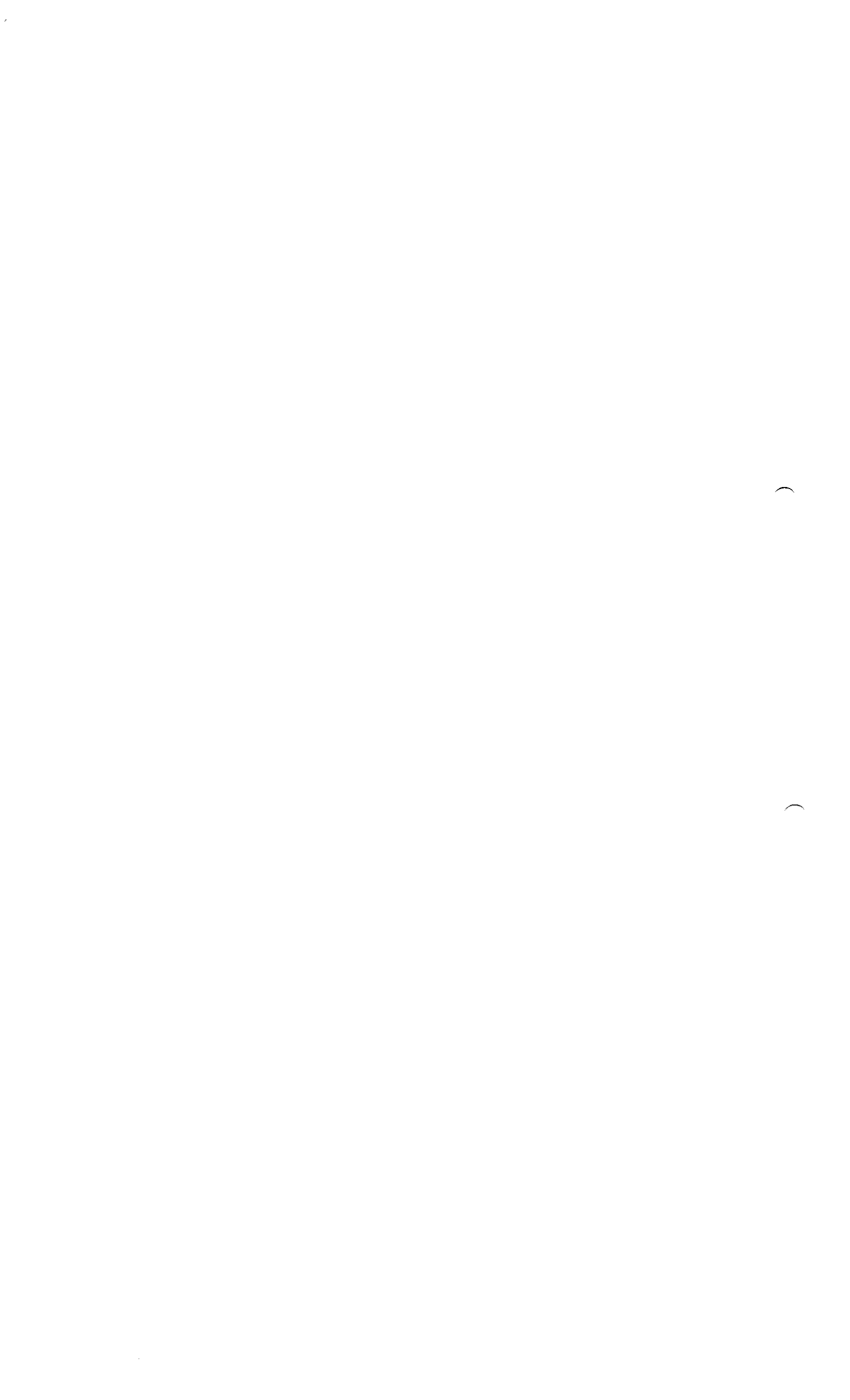
3.1.3 Solución de cloruro de calcio

- Cloruro de calcio, 2 H₂O
- Agua purificada

Esta solución se filtra antes de usarse (tamaño de poro de 0,2 μm).

3.1.4 Solución de microelementos

- EDTA
- Sulfato de hierro (II) y amonio, 6 H₂O



- Sulfato de manganeso, 1 H₂O
- Sulfato de cobre (II), 5 H₂O
- Sulfato de zinc, 7 H₂O
- Agua purificada

Esta solución se filtra antes de usarse (tamaño de poro de 0,2 µm).

3.1.5 Solución vitamínica

- Clorhidrato de tiamina
- Biotina
- Alcohol isopropílico
- Agua purificada

Esta solución se filtra antes de usarse (tamaño de poro de 0,2 µm).

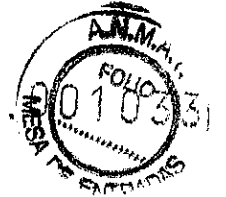
3.1.6 Solución de elementos traza

- Sulfato de níquel (II), 6 H₂O
- Cloruro de cobalto (II), 6 H₂O
- Yoduro de potasio
- Molibdato de sodio, 2 H₂O
- Ácido bórico
- Agua purificada

Esta solución se filtra antes de usarse (tamaño de poro de 0,2 µm).







3.2 Medio de producción

- Solución de mezcla de sales (vea el apartado 3.1.2)
- Glicerol al 85%
- Solución de cloruro de calcio (vea el apartado 3.1.3)
- Solución de microelementos (vea el apartado 3.1.4)
- Solución vitamínica (vea el apartado 3.1.5)
- Solución de elementos traza (vea el apartado 3.1.6)
- Agua purificada

Luego se utiliza una solución alcalina (vea el apartado 3.12) a fin de obtener un pH final comprendido entre 4,8 y 5,2. Esta solución se filtra antes de usarse (tamaño de poro de 0,2 μm).

3.3 Tampón de lavado celular

- Solución de lavado concentrada (vea el apartado 3.3.1)
- Agua purificada

El tampón de lavado celular debe cumplir con el siguiente criterio de pH: pH = 7,6 – 7,9

Esta solución se filtra antes de usarse (tamaño de poro de 0,2 μm).

3.3.1 Solución de lavado concentrada

- Fosfato disódico, 12 H₂O
- Fosfato diácido de sodio, 2 H₂O
- EDTA
- Agua purificada

Esta solución se filtra antes de usarse (tamaño de poro de 0,2 μm).

3.4 Solución detergente

- Alcohol isopropílico
- Polisorbato 20

Esta solución se filtra antes de usarse (tamaño de poro de 0,2 μm).

3.5 Solución de inhibidor de proteasa

- Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF)





- Alcohol isopropílico

Esta solución se filtra antes de usarse (tamaño de poro de 0,2 μm).

3.6 Solución de cloruro de sodio 5M

- Cloruro de sodio
- Agua purificada

Esta solución se filtra antes de usarse (tamaño de poro de 0,2 μm).

3.7 Solución de polietilenglicol

- PEG 6000
- Solución de tris (hidroximetil) aminometano (vea el apartado 3.7.1)
- Agua purificada

Esta solución se filtra antes de usarse (tamaño de poro de 0,2 μm).

3.7.1 Solución de trometamol (tris [hidroximetil] aminometano)

- Tris (hidroximetil) aminometano
- El pH de la solución se ajusta a $8,5 \pm 0,1$ con HCl (vea el apartado 3.12)
- Agua purificada

Antes de usarse, esta solución se filtra mediante filtración profunda.

3.8 Suspensión de dióxido de silicio coloidal

- Silicio coloidal anhidro
- Tampón de lavado celular (vea el apartado 3.3)
- Agua purificada

Antes de usarse, la solución se trata con vapor a alta temperatura.

3.9 Tampón de lavado de pellet

- Cloruro de sodio
- Agua purificada

El tampón de lavado de pellet cumple con los siguientes criterios: pH = 4,8 – 8,4 y conductividad = 7,5 – 9,1 mS/cm.

Antes de usarse, esta solución se filtra mediante filtración profunda.





3.10 Tampón de desorción

- Desoxicolato de sodio (DOC)
- Tetraborato disódico, 10 H₂O
- EDTA
- Agua purificada

El tampón de desorción cumple con los siguientes criterios: pH = 9,0 – 9,3

Esta solución se filtra antes de usarse (tamaño de poro de 0,2 µm).

3.11 Solución de cloruro de sodio 3 M

- Cloruro de sodio
- Agua purificada

Esta solución se filtra antes de usarse (tamaño de poro de 0,2 µm).

3.12 Otros

- **Solución antiespumante (éster de ácido graso alcoxilado sobre base vegetal)**
 - Antiespumante
 - Agua purificada

Esta solución se filtra antes de usarse (tamaño de poro de 0,2 µm).

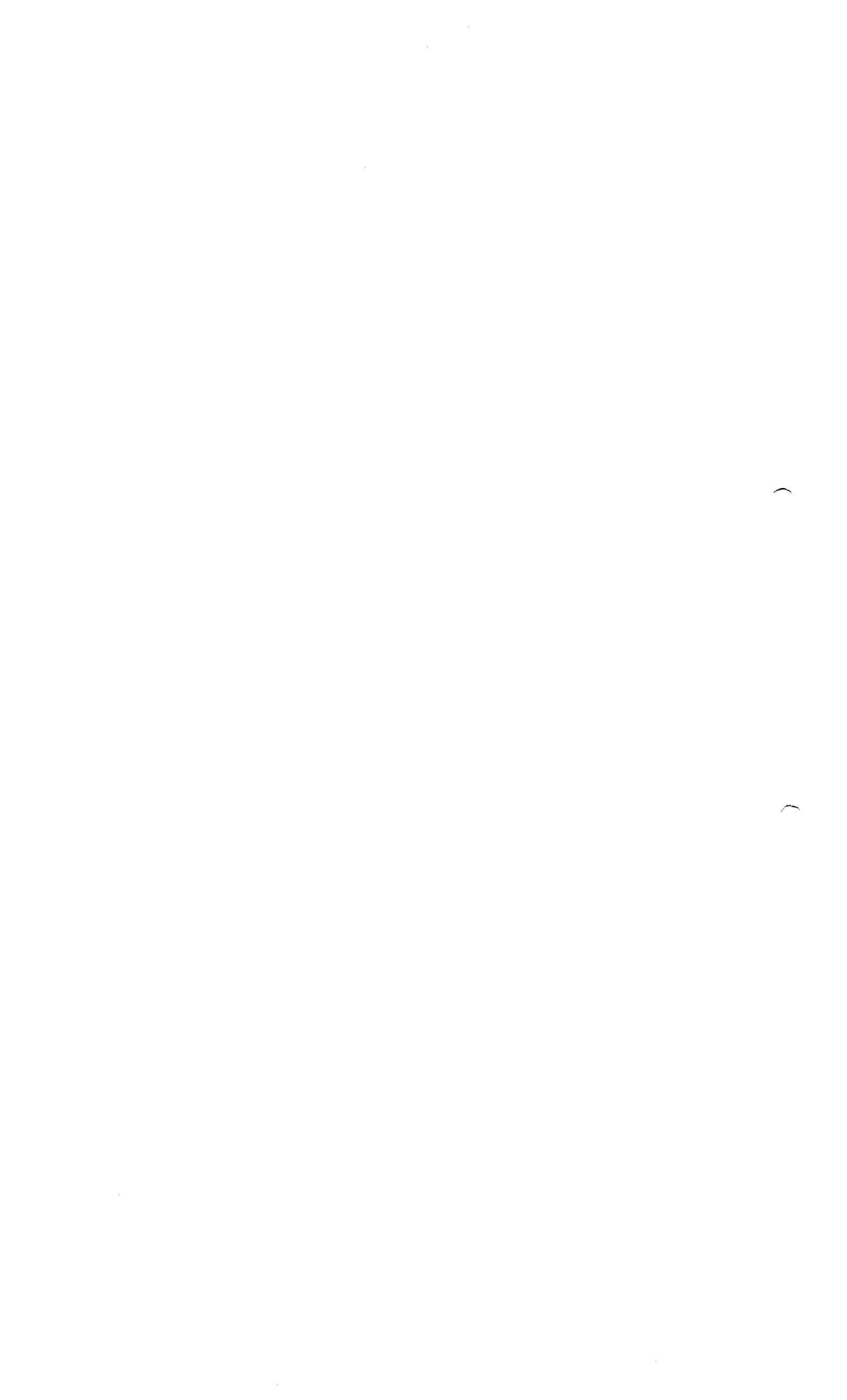
- **Solución alcalina (solución de amoníaco/glicerol)**
 - Solución de amoníaco
 - Glicerol al 85%
 - Agua purificada

Esta solución se filtra antes de usarse (tamaño de poro de 0,2 µm).

- **Solución de desrepresión (solución de glicerol)**
 - Glicerol al 85%
 - Solución de mezcla de sales (vea el apartado 3.1.2)
 - Agua purificada

Esta solución se filtra antes de usarse (tamaño de poro de 0,2 µm).

- **Solución de inducción (solución de glicerol/metanol)**
 - Glicerol al 85%



- Metanol

Esta solución se filtra antes de usarse (tamaño de poro de 0,2 μm).

- Ácido clorhídrico concentrado (37% v/v)

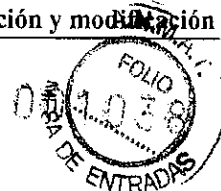




3.2.S.2.2

Reacciones de Purificación y Modificación - HBsAg

 ROXANA MONTEMILONE DIRECTORA TÉCNICA SANOPI PASTEUR S.A.	 CHRISTIAN DOMÍNGUEZ APODERADO SANOPI PASTEUR S.A.
--	--



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

Reacciones de purificación y modificación

Índice

Lista de tablas	3
Lista de figuras	4
1 Purificación y maduración del antígeno de superficie de la hepatitis B	5
1.1 Cromatografía de intercambio iónico (IEC) (etapa 2.1)	7
1.2 Concentración de la fracción de cromatografía de intercambio iónico (etapa 2.2)	7
1.3 Ultracentrifugación (etapa 2.3)	7
1.4 Diafiltración (etapa 2.4)	8
1.5 Concentración del agrupamiento de KBr diafiltrado (etapa 2.5)	8
1.6 Cromatografía de filtración en gel (GFC) (etapa 2.6)	8
1.7 Filtración final (etapa 2.7)	8
1.8 Maduración (etapa 3)	9
2 Condiciones de almacenamiento	9
3 Transporte	9
4 Controles durante el proceso	10
5 Tampones y otros aditivos empleados durante la purificación del antígeno de superficie de la hepatitis B	11
5.1 Tampón de alto contenido de sal	11
5.1.1 Tampón de alto contenido de sal	11
5.1.2 Trometamol (tris [hidroximetil] aminometano)	11
5.2 Tampón de carga	11
5.3 Tampón de elución	11

