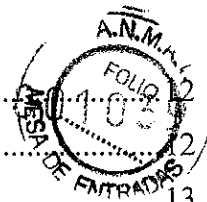
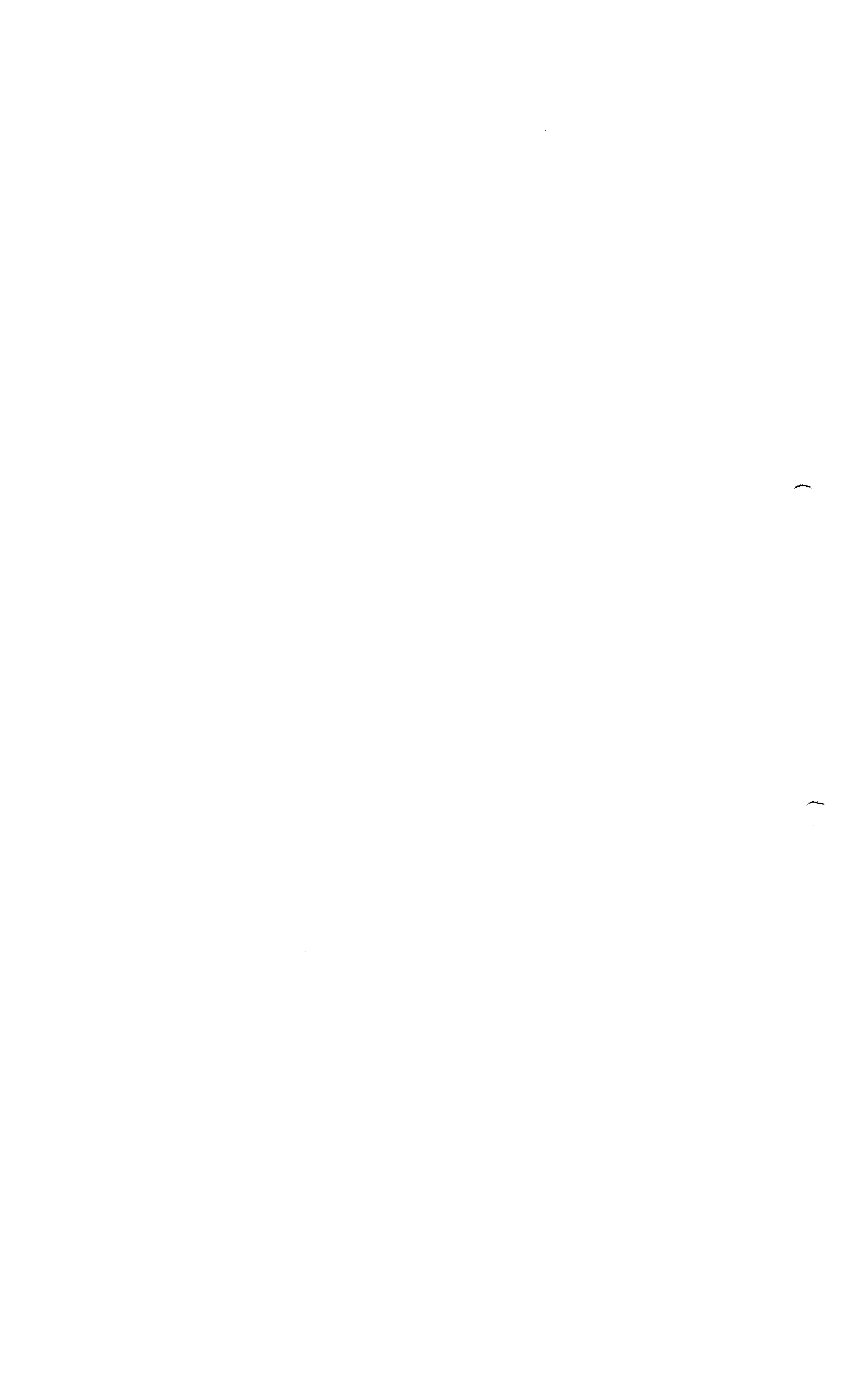


5.4	Solución de bromuro de potasio	13
5.5	Tampón desalinizante para la etapa 2.4, diafiltración.....	13
5.6	Tampón desalinizante para la etapa 2.6, GFC	13
5.7	Tampón de regeneración.....	13
5.8	Otros.....	13

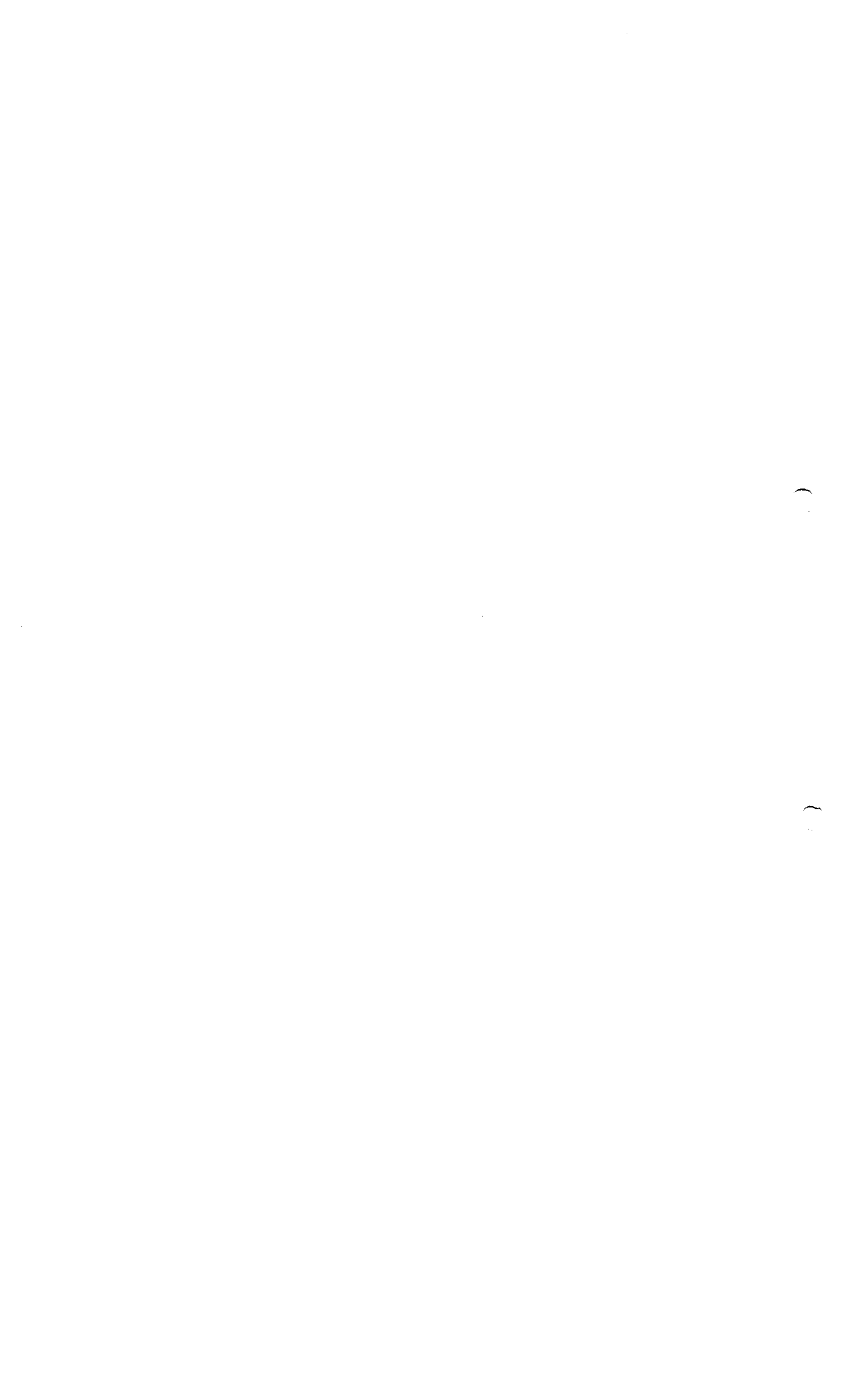






Lista de tablas

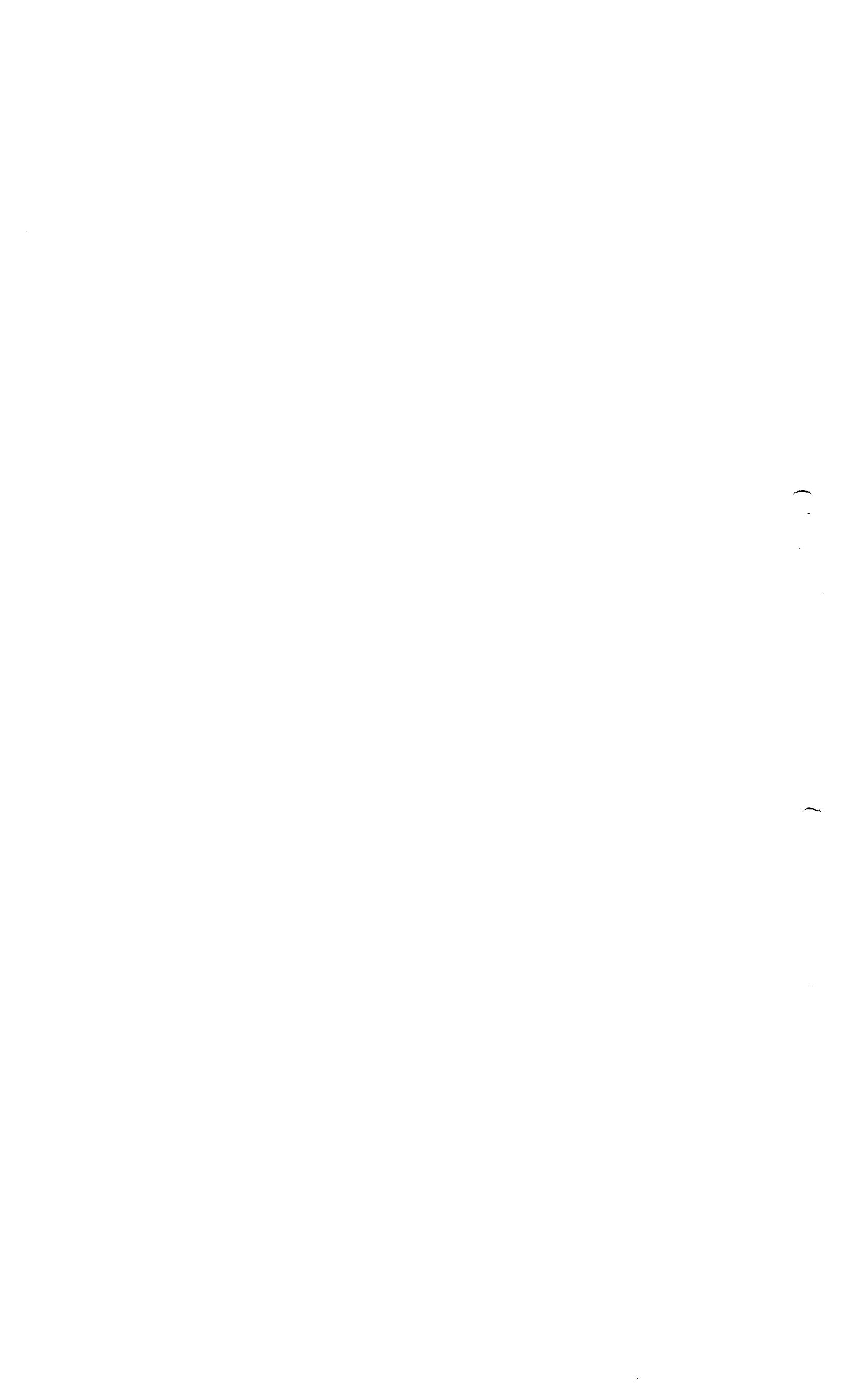
Tabla 1: Controles durante el proceso realizados durante la purificación y maduración del HBsAg10

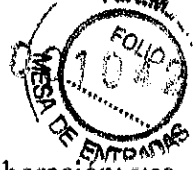




Lista de figuras

Figura 1: Diagrama de flujo de la purificación y maduración del antígeno de superficie de la hepatitis B.....6





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

Lista y descripción 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 la sección 3.2.S.2.5 Validación y/o evaluación del proceso, con estudios sobre los parámetros de producción y los controles durante el proceso.

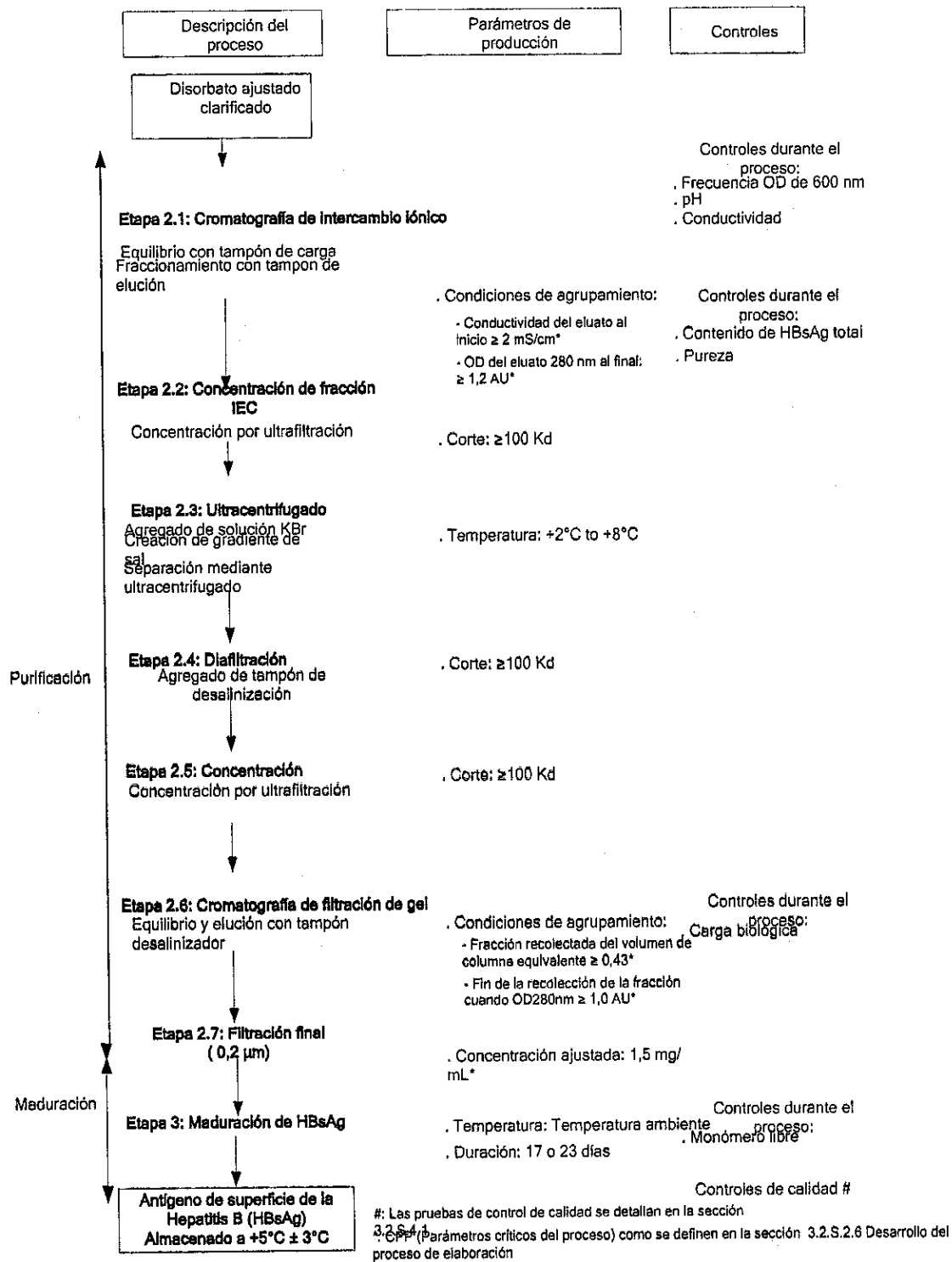
1 Purificación y maduración del antígeno de superficie de la hepatitis B

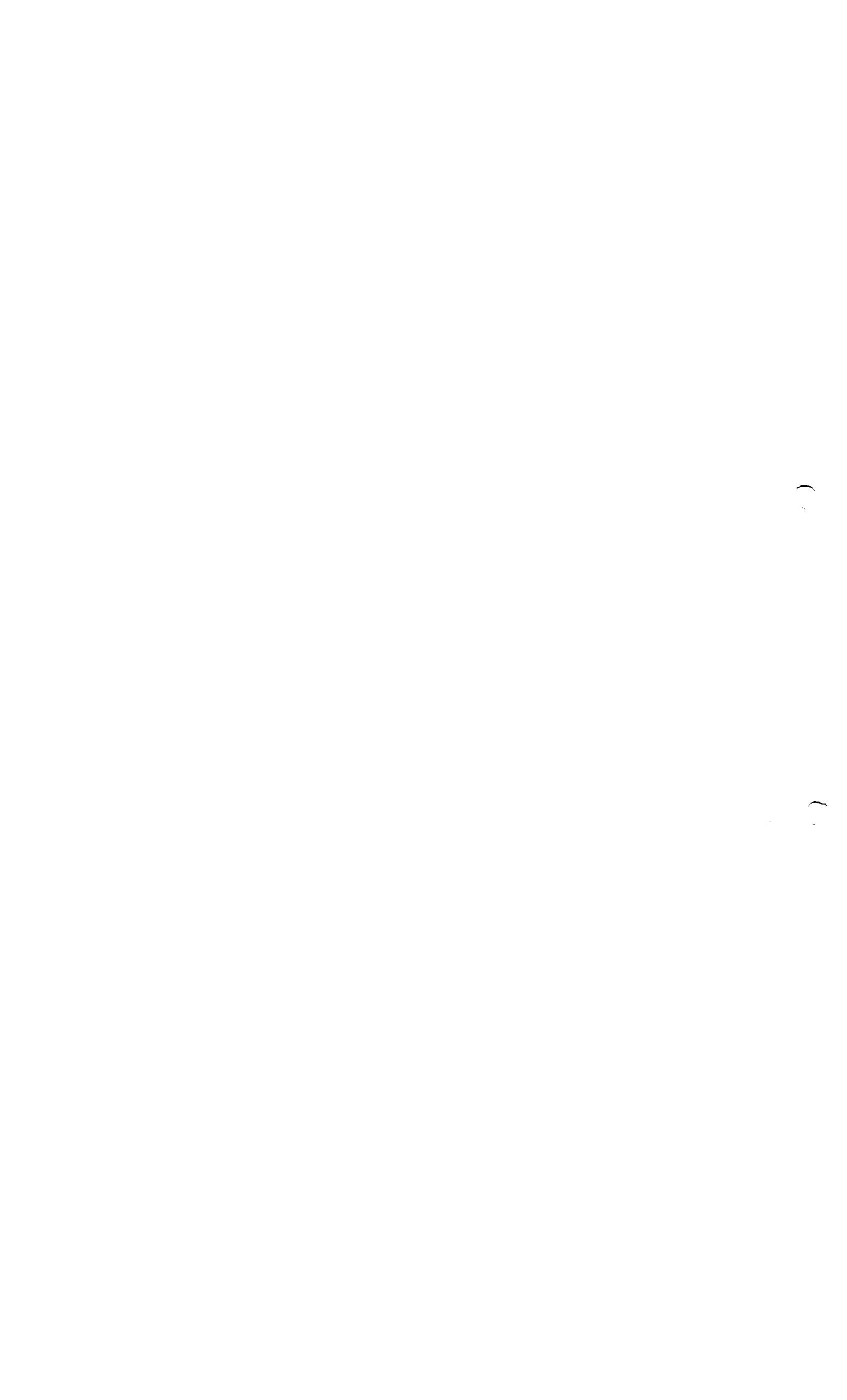
El proceso de purificación y maduración del HBsAg se presenta a continuación en la Figura 1.





Figura 1: Diagrama de flujo de la purificación y maduración del antígeno de superficie de la hepatitis B







1.1 Cromatografía de intercambio iónico (IEC) (etapa 2.1)

Antes de este paso, se toman muestras del desorbato clarificado ajustado anterior para realizar controles durante el proceso (vea el apartado 4).

La columna de cromatografía de intercambio iónico (IEC) que utiliza resina de intercambio aniónico con grupos amino terciarios con carga positiva (perlas de polímero polimetacrílico dietilaminoetilo = DEAE) se acondiciona con tampón de alto contenido de sal (vea el apartado 5.1) y luego se equilibra con tampón de carga (vea el apartado 5.2) antes de usar. Luego, el desorbato clarificado ajustado se carga en la columna. Inmediatamente después, se realiza un paso de lavado con tampón de carga (vea el apartado 5.2) y posteriormente un paso de elución con tampón de elución (vea el apartado 5.3).

La fracción eluida se recolecta cuando la conductividad del eluato es $\geq 2,0$ mS/cm y termina cuando la DO_{280nm} es $\geq 1,2$ UA.

Al final de este paso, se toma una muestra para realizar controles durante el proceso (vea el apartado 4).

Sanitización, regeneración/limpieza y almacenamiento del sistema de IEC:

- Se utiliza solución de NaOH 0,5 M para sanitizar los equipos y la columna.
- Para la regeneración/limpieza de la columna, luego de la elaboración, se utiliza tampón de regeneración (vea el apartado 5.7), solución de NaOH 0,5 M y tampón de alto contenido de sal (vea el apartado 5.1):

La columna se regenera primero con tampón de regeneración. Luego, la columna se limpia con solución de NaOH 0,5 M. Por último, el proceso de regeneración/limpieza del sistema se completa con un tampón de alto contenido de sal.

- Almacenamiento de los equipos y la columna entre lotes de producción: los equipos se almacenan en solución de NaOH 0,01 M y la columna se almacena en isopropanol al 20%.

1.2 Concentración de la fracción de cromatografía de intercambio iónico (etapa 2.2)

La fracción de IEC se concentra mediante ultrafiltración (corte de la membrana: ≥ 100 Kd) hasta llegar a un peso final compatible con la capacidad volumétrica del rotor de la ultracentrífuga utilizada en el paso siguiente.

Al final de este paso se obtiene la fracción de IEC concentrada.

1.3 Ultracentrifugación (etapa 2.3)

La fracción de IEC concentrada se mezcla con una solución de KBr (vea el apartado 5.4). La solución resultante se somete a ultracentrifugación (alrededor de 95700 g) a entre $+2^{\circ}C$ y $+8^{\circ}C$, lo cual crea un gradiente de sal que permite que el HBsAg alcance una posición en la cual la densidad del medio sea equivalente a la densidad del HBsAg. Luego el producto se descarga bajo





enjuague de agua y se recolecta una fracción a un volumen fijo que representa una densidad de entre 1,18 y 1,12.

El producto obtenido al final de este paso es el agrupamiento de KBr.

1.4 Diafiltración (etapa 2.4)

El agrupamiento de KBr se diafiltra (valor de corte de la membrana: ≥ 100 Kd) utilizando por lo menos 12 volúmenes equivalentes de tampón desalinizante (vea el apartado 5.5) para eliminar el KBr.

Al final de este paso se obtiene el agrupamiento de KBr diafiltrado.

1.5 Concentración del agrupamiento de KBr diafiltrado (etapa 2.5)

La fracción de KBr diafiltrado se concentra mediante ultrafiltración (corte de la membrana: ≥ 100 Kd) hasta llegar a un peso final equivalente a un volumen de alrededor de 5% del volumen de la columna de GFC siguiente.

Al final de este paso se obtiene el agrupamiento de KBr diafiltrado concentrado.

1.6 Cromatografía de filtración en gel (GFC) (etapa 2.6)

El agrupamiento de KBr diafiltrado concentrado se somete a un paso de refinación en una columna de cromatografía de filtración en gel (GFC), con perlas de polímero metacrílico hidroxilado. La columna se equilibra utilizando el equivalente de alrededor de 2 volúmenes de columna de tampón desalinizante para GFC (vea el apartado 5.6). Luego, el agrupamiento de KBr diafiltrado concentrado se carga en el sistema de GFC y luego se eluye con el tampón desalinizante para GFC.

La fracción que contiene el HBsAg se recolecta desde un volumen de columna equivalente $\geq 0,43$ y termina cuando se alcanza una $DO_{280\text{ nm}} \geq 1,0$ UA.

Al final de este paso se obtiene la fracción de GFC.

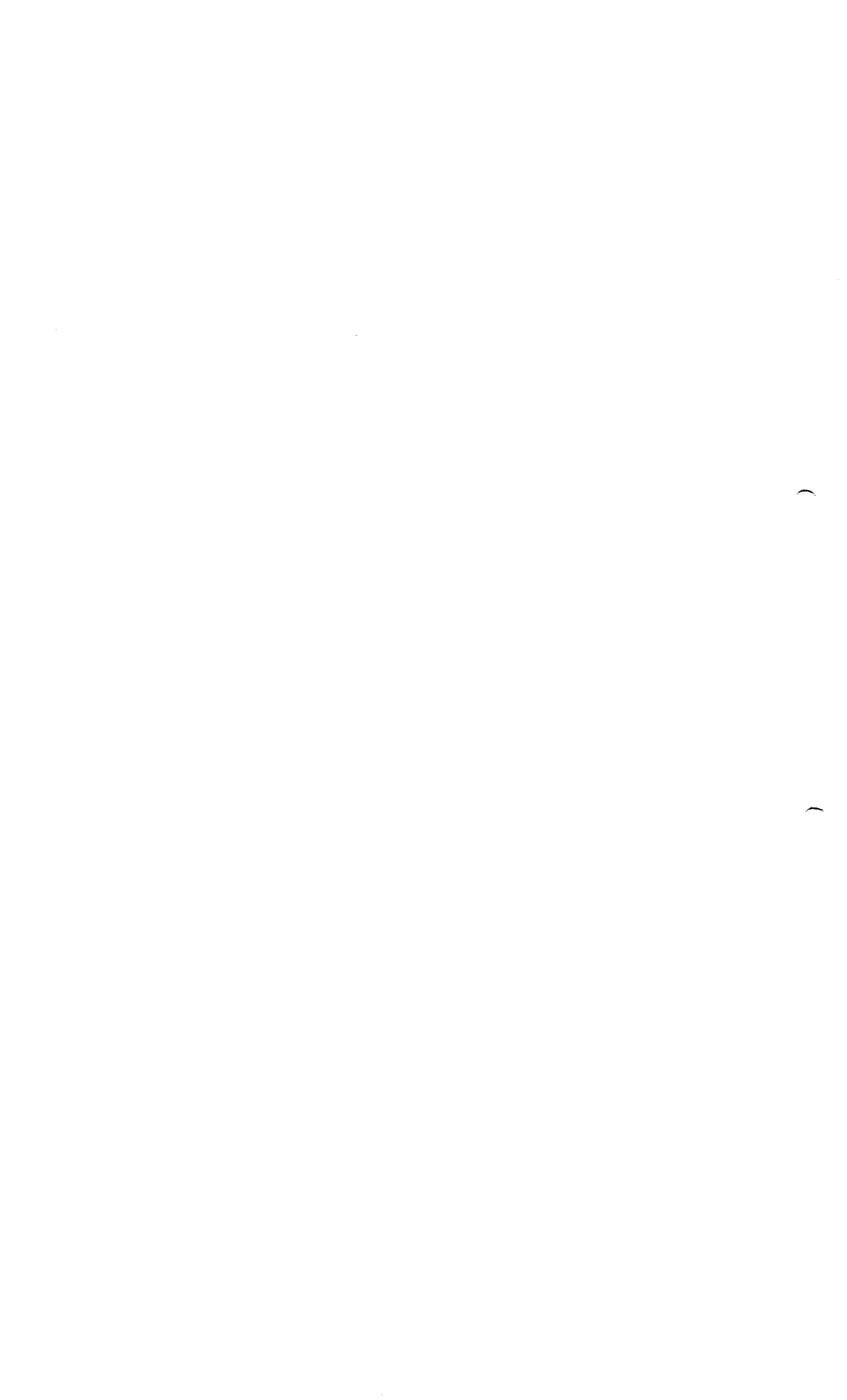
Se toma una muestra para los controles durante el proceso (vea el apartado 4).

Sanitización, limpieza y almacenamiento del sistema de GFC:

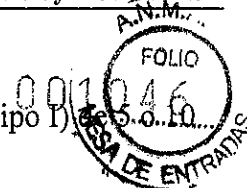
- Se utiliza solución de NaOH 0,5 M para sanitizar los equipos y la columna.
- La limpieza de los equipos y la columna se realiza con solución de NaOH 0,5 M.
- Almacenamiento de los equipos y la columna entre lotes de producción: los equipos y la columna se almacenan con solución de NaOH 0,01 M.

1.7 Filtración final (etapa 2.7)

La fracción de GFC se diluye con tampón desalinizante para GFC (vea el apartado 5.6) hasta obtener una concentración objetivo de 1,5 mg/ml, luego se filtra a través de una membrana de



filtración de 0,2 µm (PVDF = fluoruro de polivinilideno) en matraces de vidrio (tipo I) de 5 o 10 litros.



Al terminar este paso final del proceso de purificación se obtiene el antígeno de HBs purificado.

1.8 Maduración (etapa 3)

Los matraces de vidrio cerrados que contienen el HBsAg se almacenan a temperatura ambiente durante 17 o 23 días para el proceso de maduración a fin de asegurar una formación de partículas uniformes.

Se toma una muestra para los controles durante el proceso (ver el párrafo 4) a los 16 días de maduración. Si el resultado del control durante el proceso (monómero libre) cumple con los criterios de aceptación, se considera que el producto está maduro; se detiene el paso de maduración a los 17 días y se almacena el producto. Si el resultado del control durante el proceso no cumple con los criterios de aceptación, se continúa con el paso de maduración hasta un tiempo total de 23 días.

El producto maduro obtenido al final de este paso es el antígeno de HBs purificado final.

Se toman muestras para los controles de calidad (vea la sección 3.2.S.4.1 Especificación) y luego los matraces se almacenan a $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ (vea la sección 3.2.S.7.1 Resumen y conclusiones de estabilidad).

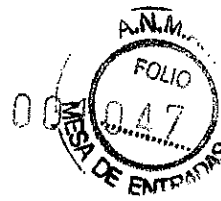
2 Condiciones de almacenamiento

El antígeno de superficie de la Hepatitis B purificado final obtenido colocado en matraces de vidrio (tipo I) de 5 o 10 litros (vea la sección 3.2.S.6 Sistema de cierre del envase) se almacena a $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ durante un máximo de 30 meses (vea la sección 3.2.S.7.1 Resumen y conclusiones de estabilidad).

3 Transporte

Se adhiere un termómetro electrónico que controla y registra la temperatura durante todo el transporte a la bolsa doble que contiene el matraz con el lote de HBsAg. Luego se coloca en un envase cerrado, refrigerado a $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.

Posteriormente, el lote de HBsAg se envía de sanofi pasteur Argentina a sanofi pasteur Francia, planta de Marcy l'Étoile. Durante todo el transporte, el lote de HBsAg se mantiene a $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.

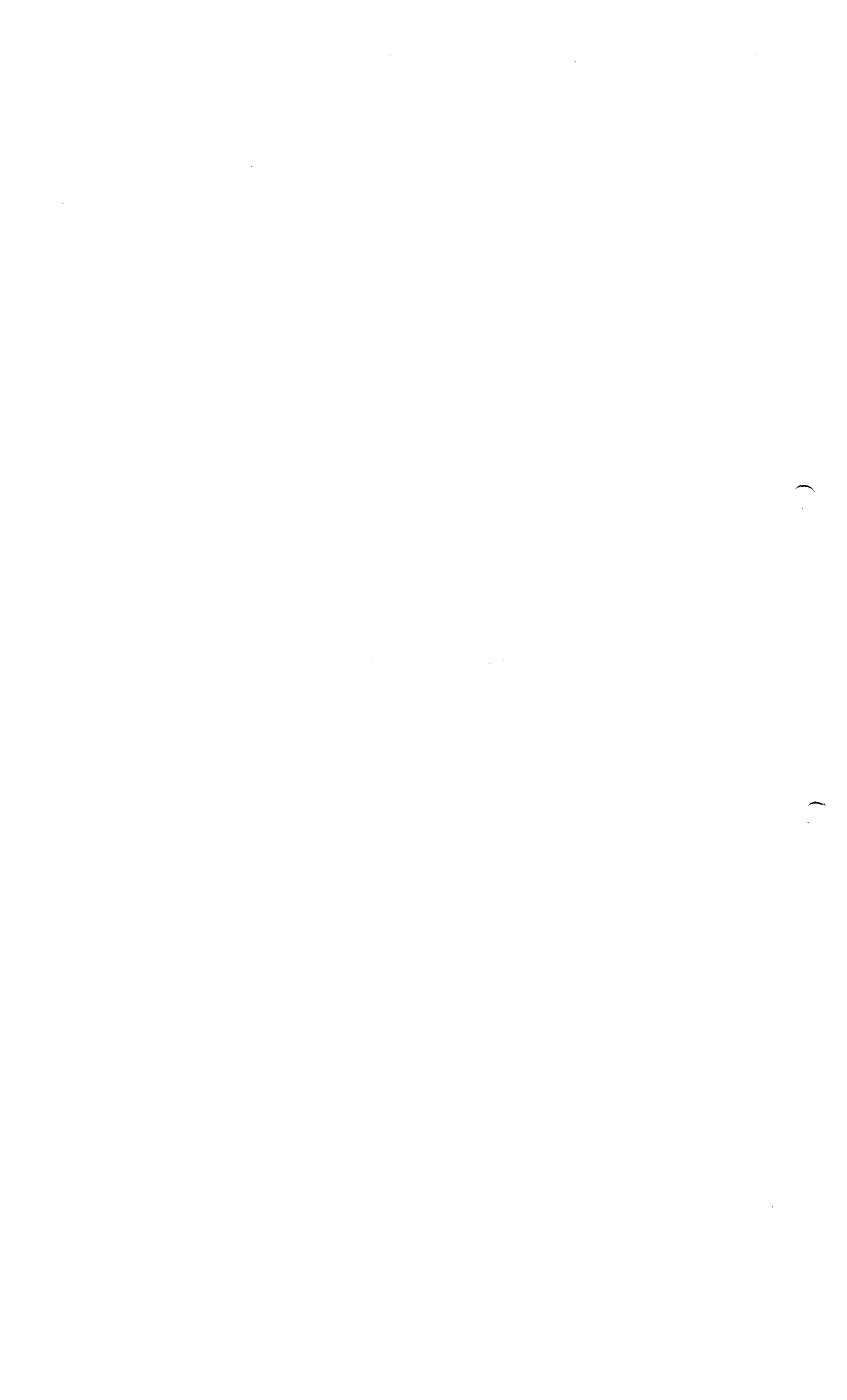


4 Controles durante el proceso

Tabla 1: Controles durante el proceso realizados durante la purificación y maduración del HBsAg

Pasos de elaboración	Controles durante el proceso		
	Pruebas	Criterios de aceptación	Justificación
Etapa 2.1: Cromatografía de intercambio iónico	DO _{600 nm} del desorbato clarificado/DO _{600 nm} del desorbato crudo* (Determinación espectrofotométrica – método interno)	≤ 0,62 UA	Verificar la eficiencia de la clarificación
	pH* (Determinación potenciométrica – método interno)	8,1 – 8,5	Verificar que el desorbato clarificado ajustado esté en condiciones adecuadas para realizar la cromatografía de intercambio iónico
	Conductividad* (Determinación conductimétrica – método interno)	5,9 -6,9 mS/cm	
	Pureza mediante SDS-PAGE (SDS-PAGE en condiciones reductoras – método interno)	≥ 75%	Verificar la pureza en este paso
	Contenido de antígeno total mediante ELISA (ELISA RB – método interno)	≥ 4,57 g	Verificar la expresión del antígeno y el desempeño del proceso
Etapa 2.6: Cromatografía de filtración en gel	Carga biológica (Filtración por membrana – método interno)	≤ 500 UFC/100 ml	Verificar la carga biológica antes de la filtración de 0,2 µm
Etapa 3: Maduración	Monómero libre mediante SDS-PAGE (SDS-PAGE en condiciones no reductoras – método interno)	≤ 3%	Verificar el estado de maduración a los 16 días y decidir si el producto necesita almacenarse un tiempo total de 23 días

* Estos tres controles durante el proceso se realizan con el desorbato clarificado ajustado inmediatamente antes del paso de IEC.





5 Tampones y otros aditivos empleados durante la purificación del antígeno de superficie de la hepatitis B

5.1 Tampón de alto contenido de sal

5.1.1 Tampón de alto contenido de sal

- Cloruro de sodio
- Solución de tris (hidroximetil) aminometano (vea el apartado 5.1.2)
- Agua purificada

El tampón de alto contenido de sal cumple con los siguientes criterios:

- Conductividad: 44,65 -51,83 mS/cm
- pH: 8,35 – 8,60.

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

5.1.2 Trometamol (tris [hidroximetil] aminometano)

- Tris (hidroximetil) aminometano
- Ácido clorhídrico concentrado (vea la sección 5.8) hasta llegar a un pH = $8,5 \pm 0,1$
- Agua purificada

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

5.2 Tampón de carga

- Solución de tris (hidroximetil) aminometano (vea el apartado 5.1.2)
- Agua purificada

El tampón de carga cumple con los siguientes criterios:

- Conductividad: 1,5 -2,0 mS/cm
- pH: 8,32 – 8,59.

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

5.3 Tampón de elución

- Cloruro de sodio
- Tris (hidroximetil) aminometano (vea el apartado 5.1.2)

