

Los factores de reducción obtenidos en el título de *Mycoplasma synoviae* se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4: Factores de reducción del título de *Mycoplasma Synoviae*

Tipo de cepa gripal	Cepa gripal A (concentración de formaldehído aplicada 5 ± 0,5 % [v/v])	Cepa gripal B (concentración de formaldehído aplicada 2,5 ± 0,25 % [v/v])
Factor de reducción más bajo debido a la acción del octoxinol 9	≥4,35 log	≥4,35 log
Factor de reducción más bajo debido a la acción del formaldehído*	1,03 log	0,64 log

* El material de inicio utilizado para evaluar el efecto del formaldehído sobre los micoplasmas no coincidía exactamente con la matriz intermedia del proceso del paso 18, dado que no contenía octoxinol 9, el cual se considera que altera la concentración del agregado de micoplasmas.

El documento "CPMP/QWP/268/95 Nota guía sobre estudios de validación viral: diseño, contribución e interpretación de estudios que validan la inactivación y eliminación de virus" establece que "las reducciones logarítmicas del orden de 4 log o más indican un efecto claro con el virus de prueba concreto investigado". Tomando en consideración esta guía, los resultados combinados de los pasos de inactivación de este estudio validan el proceso de elaboración de Sanofi Pasteur en cuanto a la inactivación de los micoplasmas, un agente contaminante potencial.

3.3 Agentes de encefalopatía espongiforme transmisible

No se utiliza ningún material obtenido de animales naturalmente vulnerables a la encefalopatía espongiforme transmisible (EET) en la preparación del MSL, ISL, WSL ni del DS.

Como se detalla en la sección 3.2.S.2.3 Fuente, historia y generación de las cepas virales vacunales, las cepas virales de referencia fueron preparadas y suministradas por los Centros Colaboradores de la OMS.

4 Agentes extraños virales

Sanofi Pasteur ha llevado a cabo una evaluación del riesgo de seguridad viral para evaluar el riesgo del posible ingreso de un virus extraño en la preparación del lote de siembra del virus de la gripe y/o en el proceso de elaboración del DS. La estrategia de Sanofi Pasteur para la evaluación del riesgo de seguridad viral se basa en los principales aspectos siguientes, conforme a la:

- Ph. Eur. 5.1.7, edición actual, "Seguridad viral";
- Ph. Eur. 0158, edición actual, "Guía para la vacuna antigripal";
- Ph. Eur. 0153, edición actual, "Vacunas para uso en seres humanos";
- y la EMA/CHMP/BWP/310834/2012 (*Guía sobre vacunas antigripales: módulo de calidad*).

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
APODERADA
SANOFI PASTEUR S. A.



Además, para realizar la evaluación del riesgo viral se utilizaron los principios de la ICH Q5A(R1): "Viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin" [evaluación de la seguridad viral de productos biotecnológicos derivados de líneas celulares de origen humano o animal].

El objetivo de este estudio es evaluar la seguridad viral del DS de la vacuna antigripal (vacuna antigripal fraccionada, inactivada) hacia los posibles contaminantes virales extraños que pueden resultar dañinos para el ser humano, considerando la preparación de los lotes de siembra y el proceso de producción del DS.

4.1 Principio

El control de la posible contaminación del producto con virus extraños se debe basar en la combinación de 3 enfoques:

- Evitar que los virus ingresen al proceso de producción mediante la selección y el análisis de las materias primas de origen biológico y de los materiales de inicio (huevos y presiembras) y mediante la evaluación del proceso de elaboración para evitar la contaminación (humana, de los equipos y del entorno).
- Evaluar la capacidad del proceso de producción de depurar (eliminar, reducir, neutralizar o inactivar) los virus extraños identificados como relevantes.
- Analizar el producto en las etapas adecuadas del proceso de producción para descartar la presencia de virus extraños.

Esta evaluación del riesgo se realizó en la preparación de los lotes de siembra y en el proceso del DS del virus de la gripe fraccionado, inactivado, para:

- Identificar si los virus extraños podrían contaminar el producto en etapas anteriores al proceso de elaboración o en el mismo proceso.
- Identificar las recomendaciones o las medidas para minimizar el riesgo de contaminación viral.

En la Figura 1 se presenta una descripción del proceso de producción de la vacuna antigripal desde la preparación del MSL hasta el DS, y representa los posibles puntos de ingreso de virus extraños y los pasos de eliminación viral en el proceso de producción.

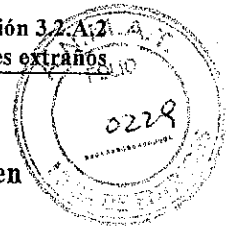
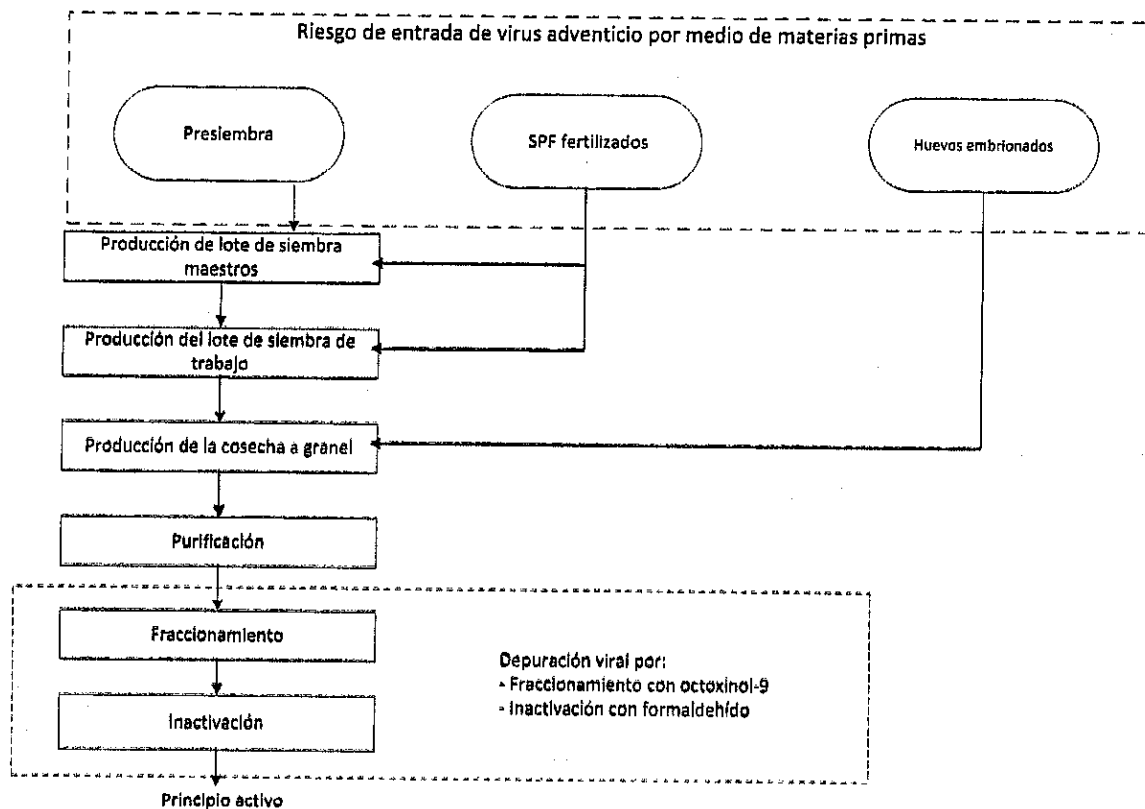


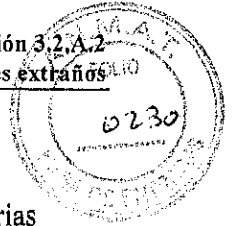
Figura 1: Diagrama de flujo que indica el punto de ingreso de los materiales de origen biológico



El enfoque utilizado para la evaluación del riesgo de seguridad viral se basó en un "diagrama de causa-efecto":

- materias primas: huevos, bancos virales, medios, soluciones, etc.;
- seres humanos: operadores;
- equipo;
- entorno;
- Métodos: procedimientos internos, instrucciones, etc.;

Para el ser humano, los equipos, el entorno y los métodos, el riesgo de una contaminación viral extraña se considera bajo, vea la sección 5.



Además, la evaluación concluyó que el principal riesgo identificado proviene de las materias primas:

- La obtención y las pruebas de los huevos embrionados y de los huevos embrionados SPF se comenta en la sección 2. El riesgo de que un virus extraño ingrese en el proceso de producción por medio de estos huevos se considera bajo. El único virus extraño que podría estar presente en estos huevos es ALV, que se inactiva mediante el proceso (vea la Sección 4.3.2). Con base en la utilización de las líneas de gallinas sin ALV y a la capacidad de eliminación de ALV del proceso de producción, el riesgo de una posible contaminación de los huevos de producción embrionados con ALV es bajo.
- Los centros colaboradores de la OMS, los laboratorios regulatorios esenciales de la OMS o los laboratorios aprobados, no garantizan que la presiembra suministrada a Sanofi Pasteur no contiene virus extraños y, por tanto, se debe evaluar para determinar el posible riesgo de que existan virus extraños provenientes de muestra clínica utilizada para preparar la presiembra.

4.2 Virus de la gripe para presiembra

El origen de la presiembra es, generalmente, una muestra clínica extraída de seres humanos y, por tanto, podrían estar presentes virus extraños en dicho aislamiento humano. Posteriormente, se hace pasar la muestra clínica a los huevos SPF embrionados para producir la presiembra. El riesgo de que estén presentes virus extraños provenientes de estos huevos SPF embrionados se considera igual al riesgo descrito en la sección 2.2.1, que es bajo.

El único riesgo de que la presiembra se contamine con virus extraños proviene del aislamiento humano. En la Tabla 5 se presenta una lista de los virus correspondientes, misma que se ajusta a la lista sugerida por la *EMA/CHMP/BWP/310834/2012 (Guía sobre vacunas antigripales: módulo de calidad)*.



Tabla 5: Virus extraños humanos de la muestra clínica

Virus extraños	Familia	ARN/ADN	Con envoltura	Control de riesgos
Virus respiratorio sincial	Paramyxoviridae	-ARNmc	Sí	Barrera entre especies y eliminación por medio del fraccionamiento
Virus de la parainfluenza				
Adenovirus	Adenoviridae	ADNbc	no	Barrera de especie
Coronavirus	Coronaviridae	+ARNmc	Sí	Barrera entre especies y eliminación por medio del fraccionamiento
Rinovirus	Picornaviridae	+ARNmc	no	Barrera de especie
Enterovirus				
Virus de Epstein-Barr	Herpesviridae	ADNbc	Sí	Barrera entre especies y eliminación por medio del fraccionamiento
Virus del herpes simple				
Citomegalovirus				

Los virus con envoltura que se identifican como posiblemente presentes en el aislamiento humano son los siguientes:


- Virus respiratorio sincial, virus de ARN monocatenario
- Virus de la parainfluenza, virus de ARN monocatenario
- Coronavirus, virus de ARN monocatenario
- Virus de Epstein-Barr, virus de ADN bicatenario
- Virus del herpes simple, virus de ADN bicatenario
- Citomegalovirus, virus de ADN bicatenario

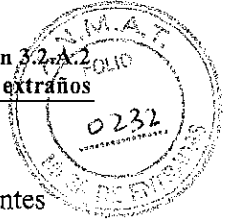
4.3 Estudios de eliminación de agentes virales extraños

4.3.1 Eliminación de virus extraños mediante el paso de fraccionamiento

4.3.1.1 Virus con envoltura

Se llevó a cabo un estudio con los siguientes virus modelo: virus de la leucemia murina (MLV: un retroviridae de ARN monocatenario) y virus de la pseudorrabia (PRV: un herpesviridae de ADN bicatenario). El estudio demostró que los dos modelos se inactivan mediante el paso de fraccionamiento con octoxinol 9 en un punto posterior del proceso de la vacuna antigripal. Estos modelos de virus abarcan los virus de ARN monocatenario con envoltura y de ADN bicatenario con envoltura, que se inactivan durante los pasos posteriores del proceso de elaboración del DS.


 ROXANA MONTEMILONE
 DIRECTORA TÉCNICA
 APODERADA
 SANOFI PASTEUR S.A.



La Tabla 6 presenta virus extraños de ser humano y especies aviarias, así como virus relevantes y/o virus modelo que se utilizaron para este estudio.



Tabla 6: Virus extraños

	Virus extraños	Familia	ARN/ADN	Virus modelo
Aviar	Virus de la gripe aviar A	Orthomyxoviridae	-ARNmc	MLV: retroviridae de ARNmc
	Virus de la bronquitis infecciosa aviar	Coronaviridae	+ARNmc	MLV: retroviridae de ARNmc
	Virus de la laringotraqueítis infecciosa aviar	Herpesviridae	ADNbc	PRV: herpesviridae de ADNbc
	Virus de la leucosis aviar	Retroviridae	ARNmc	MLV: retroviridae de ARNmc
	Virus de la reticuloendoteliosis aviar	Retroviridae	ARNmc	MLV: retroviridae de ARNmc
	Virus de la enfermedad de Marek	Herpesviridae	ADNbc	PRV: herpesviridae de ADNbc
	Virus de la enfermedad de Newcastle	Paramyxoviridae	-ARNmc	MLV: retroviridae de ARNmc
	Virus de la rinotraqueítis del pavo	Paramyxoviridae	-ARNmc	MLV: retroviridae de ARNmc
Humano	Virus respiratorio sincicial	Paramyxoviridae	-ARNmc	MLV: retroviridae de ARNmc
	Virus de la parainfluenza	Paramyxoviridae	-ARNmc	MLV: retroviridae de ARNmc
	Coronavirus	Coronaviridae	+ARNmc	MLV: retroviridae de ARNmc
	Virus de Epstein-Barr	Herpesviridae	ADNbc	PRV: herpesviridae de ADNbc
	Virus del herpes simple	Herpesviridae	ADNbc	PRV: herpesviridae de ADNbc
	Citomegalovirus	Herpesviridae	ADNbc	PRV: herpesviridae de ADNbc

El tratamiento con octoxinol 9 se realizó en las condiciones "más desfavorables" del proceso a una concentración final del 0,5 % (v/v) y a 7 °C ± 1°C bajo agitación durante 60 minutos, por duplicado con los virus MLV, PRV con envoltura.

Los factores de reducción obtenidos después de 60 minutos de tratamiento se presentan en la Tabla 7.


 ROXANA MONTEMILONE
 DIRECTORA TÉCNICA
 APODERADA
 SANOFI PASTEUR S. A.



Tabla 7: Factores de reducción después de 60 minutos de tratamiento con octoxinol 9

Virus agregado	MLV	PRV
Cepa	Moloney	Kojnock
Factor reducido	1/300-1/600	1/300-1/600
Factor de reducción media (R) _m e intervalo de confianza R _{mín.} = (R) _m = R _{máx.}	>5,58 (= Inf)*	>5,25 (=Inf)
Corrida A	5,50 = Inf = 5,66	5,17 = Inf = 5,32
Corrida B	5,89	>5,22 (=inf)
	5,82 = (R) _m = 5,95	5,14 = Inf = 5,29

* Cuando no se detectan partículas infecciosas en la fracción, el factor de reducción se evalúa como mayor que Inf (>Inf), un valor que corresponde a la sensibilidad de los análisis.

El tratamiento con octoxinol 9 al 0,5 % (v/v) fue muy eficaz para inactivar MLV y PRV.

Para MLV y PRV, la robustez del tratamiento con octoxinol 9 se evaluó en una sola corrida con dos concentraciones reducidas de Triton-X-100; es decir, al 0,25 % (v/v) y al 0,1 % (v/v).

Los factores de reducción obtenidos después de 60 minutos de tratamiento con concentraciones reducidas de octoxinol 9 se presentan en la Tabla 8.

Tabla 8: Factores de reducción después de 60 minutos con concentraciones reducidas de octoxinol 9

Virus agregado	MLV	PRV
Cepa	Moloney	Kojnock
Factor reducido	1/300-1/600	1/300-1/600
Experimentos con concentración reducida de Tritón X-100: 0,25 % (v/v)		
Factor de reducción media (R) _m e intervalo de confianza R _{mín.} = (R) _m = R _{máx.}	5,78	>4,91 (=Inf)*
	5,71 = R = 5,84	4,85 = Inf = 4,96
Experimentos con concentración reducida de Tritón X-100: 0,10% (v/v)		
Factor de reducción media (R) _m e intervalo de confianza R _{mín.} = (R) _m = R _{máx.}	5,14	>4,91 (= Inf)
	4,91 = (R) _m = 5,45	4,85 = Inf = 4,96

* Cuando no se detectan partículas infecciosas en la fracción, el factor de reducción se evalúa como mayor que Inf (>Inf), un valor que corresponde a la sensibilidad de los análisis.

El tratamiento con concentraciones reducidas de octoxinol 9 confirmó el gran efecto de inactivación que presenta el tratamiento sobre dos virus con envoltura MLV y PRV.

En conclusión, con base en la barrera entre la especie humana y la aviar y en la capacidad de eliminación viral del proceso de purificación de la vacuna antigripal, el riesgo de que un virus extraño con envoltura ingrese en el proceso de producción a través de la presiembra se considera bajo.

4.3.1.2 Virus sin envoltura

Los virus sin envoltura que se identifican como posiblemente presentes en el aislamiento humano son los siguientes:

- Adenovirus, ADN bicatenario
- Rinovirus, ARN monocatenario
- Enterovirus, ARN monocatenario



No existe capacidad de eliminación de los virus sin envoltura en los puntos posteriores del proceso de elaboración de la vacuna antigripal, la estrategia de control para detectar estos tres virus en los lotes de siembra viral está en proceso de definición. No obstante, con base en la barrera entre la especie humana y la aviar; el riesgo de que uno de estos virus extraños sin envoltura ingrese al proceso de producción por medio de la presiembra se considera medio-bajo.

4.3.2 Inactivación del virus de la leucosis aviar

Los criaderos de puesta se deben generar a partir de linajes de gallinas sin ALV endógeno. La ausencia de ALV exógeno también se verifica desde 2015 en todos los criaderos, al principio, a la mitad y al final de la puesta de los huevos.

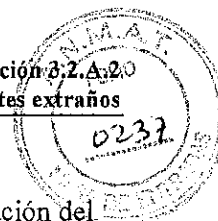
Además, el estudio de eliminación de los virus con envoltura presentado anteriormente, demuestra que el proceso de inactivación utilizado para la vacuna antigripal también es capaz de inactivar el ALV. No obstante, y según los requisitos de la monografía 0158 "Vacuna antigripal (virión fraccionado, inactivada)" de la Ph. Eur., edición actual, se realizó un estudio específico para la inactivación del ALV, que se resume a continuación.

El objetivo de este estudio consiste en validar las acciones del octoxinol 9 y del formaldehído por separado dado que esta situación se considera el caso más desfavorable. De hecho, estos dos agentes actúan conjunta y sucesivamente durante el proceso de elaboración del DS y el octoxinol 9 aún está presente en una cantidad efectiva en el momento de la adición del formaldehído. Este estudio se realizó con muestras de:

- Paso 15: estudio del efecto del tratamiento con octoxinol 9. El estudio se realizó con los parámetros de inactivación más desfavorables, es decir, con el contenido más alto de nitrógeno (obtenido agregando ovoalbúmina a la matriz), los valores más bajos de duración, temperatura y contenido de octoxinol 9.
- Paso 19: estudio del efecto del tratamiento con formaldehído. El estudio se realizó con los parámetros de inactivación más desfavorables, es decir:
 - Con el contenido más alto de nitrógeno tolerado, obtenido agregando ovoalbúmina a la matriz.
 - La duración más baja aceptada.
 - Por debajo de la temperatura mínima.
 - El contenido mínimo de formaldehído aceptado.
- Sin octoxinol 9: la matriz analizada para el estudio se modificó y no contenía octoxinol 9 con el fin de evaluar el efecto del formaldehído por sí solo.

Se informó el título viral presente en cada muestra y se calcularon los factores de reducción viral conseguidos con el virus de la leucosis aviar (ALV) a fin de determinar:

- Un factor de reducción más bajo debido a la acción del octoxinol 9.
- Un factor de reducción más bajo debido a la acción del formaldehído solo al 4,5 % (v/v) durante 25 h a 15 °C y después 24 h a 5 °C. La concentración de formaldehído corresponde al



valor más bajo comparado con la concentración utilizada para la etapa 19 de inactivación del proceso de elaboración del DS ($5 \pm 0,5$ % [v/v]) para la cepa A del virus gripal.

- Un factor de reducción más bajo debido a la acción del formaldehído solo al 2,25% (v/v) durante 25 h a 15 °C y después 24 h a 5 °C. La concentración de formaldehído corresponde al valor más bajo comparado con la concentración utilizada para la etapa 19 de inactivación del proceso de elaboración del DS ($2,5 \pm 0,25$ % [v/v]) para la cepa B del virus gripal.

Los resultados se presentan en la Tabla 9.

Tabla 9: Factores de reducción del título del virus de la leucosis aviar

	Corrida 1	Corrida 2
Factor de reducción más bajo debido a la acción del octoxinol 9.	$\geq 3,92 \pm 0,31 \log^*$	$\geq 4,45 \pm 0,40 \log^*$
Factor de reducción más bajo debido a la acción del formaldehído al 4,5 % (v/v) durante 25 h a 15 °C + 24 h a 5 °C.	$1,05 \pm 0,38 \log$	$0,70 \pm 0,41 \log$
Factor de reducción más bajo debido a la acción del formaldehído al 2,25 % (v/v) durante 25 h a 15 °C + 24 h a 5 °C.	$2,01 \pm 0,42 \log$	$1,75 \pm 0,44 \log$

* Este factor de reducción está limitado por el virus de la leucosis aviar inicial y el límite del método de titulación

Como cabría esperar, el efecto del formaldehído se reduce debido a las condiciones más desfavorables en las que se realizó el estudio. No obstante, la práctica ha demostrado que nunca ha tenido lugar una producción en dichas condiciones más desfavorables para todos los parámetros (contenido de nitrógeno, duración, temperatura, contenido de formaldehído) al mismo tiempo, según los antecedentes de producción de 1600 lotes. Además, el proceso de elaboración del DS siempre incluye un paso de fraccionamiento con octoxinol 9 antes de la inactivación con formaldehído, y por tanto el ALV se inactiva incluso antes de la adición de formaldehído, como se demostró durante el estudio.

En conclusión, el estudio mostró que el efecto del octoxinol 9 y del formaldehído es suficiente para inactivar el ALV. Además, los huevos embrionados utilizados se derivan de criaderos de pollos sin virus de la leucosis aviar.

El riesgo de una posible contaminación de los huevos de producción embrionados con ALV se considera bajo.

4.3.3 Fraccionamiento e inactivación de los virus gripales

Se lleva a cabo un análisis para detectar virus infecciosos residuales en los huevos embrionados en cada lote de DS según los requisitos de la monografía n.º 0158 "Vacuna antigripal (virión fraccionado, inactivada)" de la Ph. Eur., edición actual, a fin de verificar la inactivación del virus. El análisis se considera exitoso si no se observa hemaglutinación causada por virus vivos. Se pueden consultar más datos sobre el método en la sección 3.2.S.4.2 Procedimientos analíticos.


 ROXANA MONTEMILONE
 DIRECTORA TÉCNICA
 APODERADA
 SANOFI PASTEUR S.A.



4.4 Conclusión

Después de evaluar el riesgo de que virus extraños ingresen al proceso de producción del DS de la vacuna antigripal, solo tres virus, posiblemente provenientes del aislamiento humano utilizado para preparar la presiembra, se identifican como relevantes: adenovirus, rinovirus y enterovirus humanos. Para el resto de los virus humanos y aviares, el riesgo de una posible contaminación se considera bajo.

Los pasos de la elaboración del DS son eficientes para la eliminación de la mayoría de los virus. Mientras tanto, y a través de su informe de evaluación de riesgo de seguridad viral, Sanofi Pasteur evalúa actualmente la posibilidad de añadir pruebas para tres virus relevantes, ya que no existe capacidad de eliminación de estos virus sin envoltura en los pasos posteriores del proceso de la vacuna antigripal. Mientras se espera la implementación de este cambio, el riesgo de contaminación con un agente extraño se considera bajo control.

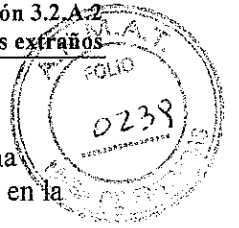
5 Proceso y entorno de elaboración

La vacuna antigripal se elabora según las buenas prácticas de manufactura (BPM) en áreas clasificadas para prevenir la contaminación viral y no viral del producto. En otras secciones del módulo 3 del DTC se detallan las condiciones operativas de elaboración, las características del equipo, el diseño de la instalación y los diagramas de flujo del proceso para las diferentes etapas de producción de la vacuna antigripal.

El DS y el DP, así como los lotes de siembra de la vacuna antigripal se elaboran de acuerdo con las BPM actuales en áreas clasificadas para prevenir la contaminación viral y no viral del producto a lo largo de todo el proceso de elaboración. La organización de las operaciones, los flujos de personal, así como el monitoreo del entorno limitan la probabilidad de que un virus extraño se introduzca en el proceso (para obtener más datos, vea la sección 3.2.A.1. Instalaciones y equipo). A continuación se enumeran las medidas más importantes para limitar estos riesgos:


- El operador lleva protección adecuada (guantes y cobertura facial o prendas protectoras completas y sin partículas) y la ropa del operador está adaptada al grado de clasificación de las áreas limpias, de conformidad con los requisitos de las BPM. Además, la capacitación del personal en el lugar de trabajo incluye prácticas para minimizar el riesgo de contaminación.
- El uso de sistemas abiertos que podrían ocasionar la exposición directa del producto al entorno circundante está limitado. Para los pasos de elaboración se utilizan de preferencia equipos de procesamiento en los que el producto no está expuesto al entorno inmediato de la sala.
- Los procesos de elaboración están validados, en especial la filtración esterilizante del DS y el DP y el llenado aséptico del DP.
- La mayor parte de los equipos y recipientes de producción se someten a tratamiento térmico, esterilización con vapor o tratamiento químico mediante procedimientos validados antes de utilizarlos. Además, las instalaciones, equipos y recipientes se limpian o higienizan y se descontaminan por métodos adecuados y validados después de su uso.


ROXANA MONTEMLONE
DIRECTORA TÉCNICA
APODERADA
SANOFI PASTEUR S.A.



- Los tampones y las soluciones utilizados en el proceso de elaboración se someten a una filtración de 0,22 μm antes de su uso (salvo la solución de formaldehído que se utiliza en la etapa 19 del proceso de elaboración del DS).

Por último, todas estas precauciones y, en especial, el uso de condiciones ambientales de elaboración adecuadas y la aplicación estricta de las BPM contribuyen eficazmente a limitar el riesgo de introducción de contaminantes virales o no virales durante la elaboración de la vacuna antigripal.


ROXANA MONTEMILIONI
DIRECTORA TÉCNICA
APODERADA
SANOFI PASTEUR S.A.



6 Pruebas de seguridad en etapas adecuadas de la producción

Además de la evaluación de seguridad de agentes extraños antes mencionada, se llevan a cabo pruebas de control de calidad (CC) en varias etapas adecuadas del proceso de elaboración de la vacuna antigripal, con el fin de verificar la ausencia de agentes extraños virales y no virales que pudieran afectar la calidad del producto final.

Un panorama de las pruebas de seguridad realizadas con la vacuna antigripal se presenta en la Tabla 10.

Tabla 10: Panorama de las pruebas de seguridad durante el proceso de elaboración de la vacuna antigripal

Etapa de producción	Pruebas de seguridad viral		Pruebas de seguridad no viral			Referencia de la sección para los resultados de las pruebas
	Virus extraños aviares	Carga microbiana antes de la filtración	Micoplasmas*	Endotoxina	Esterilidad bacteriana y fúngica	
Huevos fertilizados de criaderos de gallinas SPF†	X	NR‡	X	NR	NR	3.2.S.2.3. Control de los materiales fuente y de inicio de origen biológico
Huevos embrionados provenientes de criaderos sanos	X§	NR	X	NR	NR	3.2.S.2.3. Control de los materiales fuente y de inicio de origen biológico
WSL	NR	NR	X	NR	X	3.2.S.2.3 Sistema de lotes de siembra viral, caracterización y pruebas
DS	NR	X	NR	X	X	3.2.S.4.4 Análisis de lotes
PFAG	NR	X	NR	NR	X	3.2.P.5.4 Análisis de lotes
FP	NR	X	NR	X	X	3.2.P.5.4 Análisis de lotes

* Por los métodos de cultivo y epifluorescencia

† Método 5.2.2 "Control de vacunas" de la Ph. Eur., edición actual

‡ NR: No realizada

§ Virus de la gripe aviar tipo A



7 Conclusión


Después de evaluar el riesgo de que agentes bacterianos y/o virales extraños ingresen al proceso de producción del DS de la vacuna antigripal, el riesgo de una posible contaminación se considera bajo.

De hecho, la producción de la vacuna antigripal garantiza un alto nivel de prevención de una posible contaminación con agentes extraños, virales y no virales, mediante el análisis de las materias primas y la vigilancia de la calidad del producto en los pasos relevantes del proceso de elaboración. Además, cabe destacar que existen pasos específicos de fraccionamiento e inactivación viral en el proceso de elaboración, porque la vacuna antigripal es una vacuna de virión fraccionado, inactivada. Estos pasos son eficientes para la eliminación de la mayoría de los virus. Mientras tanto, y a través de su informe de evaluación de riesgo de seguridad viral, Sanofi Pasteur evalúa actualmente la posibilidad de añadir pruebas para tres virus relevantes, ya que no existe capacidad de eliminación de estos virus sin envoltura en los pasos posteriores del proceso de la vacuna antigripal.

Con base en toda la información suministrada en esta sección, el riesgo de contaminación con un agente extraño se considera bajo control.



ELABORACIÓN DE LAS SUSTANCIAS ACTIVAS


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
APODERADA
SANOFI PASTEUR S.A.



Sección 2.3.S.2 Elaboración

Índice

Lista de tablas	3
Lista de figuras	4
1 Fabricantes.....	5
2 Lotes, escala y sistema de numeración	5
2.1 Breve descripción del proceso de elaboración.....	5
2.2 Definición de lotes y escala	6
2.3 Sistema de numeración de lotes	6
3 Descripción del proceso de elaboración y controles del proceso.....	6
3.1 Multiplicación y cosecha viral (etapas 1 a 9).....	6
3.1.1 Descripción del proceso.....	7
3.1.1.1 Inoculación	7
3.1.1.2 Multiplicación viral	8
3.1.1.3 Cosecha	8
3.1.2 Controles durante el proceso	8
3.2 Elaboración del principio activo (etapas 10 a 22).....	9
3.2.1 Descripción del proceso.....	12
3.2.1.1 Purificación	12
3.2.1.2 Fraccionamiento	13
3.2.1.3 Inactivación	13
3.2.1.4 Filtración esterilizante de 0,22 µm.....	14
3.2.1.5 Llenado y almacenamiento	14
3.2.1.6 Transporte	14
3.2.2 IPC	14
4 Control de materiales.....	15
4.1 Materiales de grado farmacopeico y no farmacopeico	15
4.1.1 Materias primas y materiales de inicio descritos en una farmacopea.....	15
4.1.2 Materias primas y materiales de inicio no descritos en una farmacopea.....	18



4.2	Control de los materiales fuente y de inicio de origen biológico	19
4.3	Sistema de lotes de siembra viral.....	19
4.3.1	Fuente, historia y generación de la cepa vacunal viral	19
4.3.2	Sistema de lotes de siembra viral	20
4.3.2.1	Preparación del MSL (etapas 1 a 10)	23
4.3.2.2	Preparación del lote de siembra intermedio (etapas 1 a 10).....	23
4.3.2.3	Preparación del lote de siembra de trabajo (etapas 1 a 12).....	24
4.3.3	Caracterización y pruebas de las siembras virales.....	24
4.3.3.1	Especificaciones	24
4.3.3.2	Estrategia de pruebas (justificación/fundamento).....	26
4.3.3.3	Caracterización.....	27
5	Control de los pasos críticos e intermedios	28
5.1	Pasos críticos.....	28
5.2	Productos intermedios.....	29
6	Validación y evaluación del proceso	30
6.1	Estudios de validación del proceso de purificación	30
6.1.1	Eliminación de la ovoalbúmina	30
6.1.2	Depuración de la neomicina	31
6.1.3	Depuración de la hidrocortisona.....	32
6.1.3.1	Validación de la depuración de la hidrocortisona	32
6.1.3.2	Validación de la ausencia de efecto de la hidrocortisona sobre los atributos críticos de calidad.....	33
6.1.3.3	Conclusión.....	34
6.1.4	Conclusión general sobre el proceso de purificación	34
6.2	Estudios de validación del proceso de fraccionamiento	34
6.3	Estudios de validación del proceso de inactivación.....	35
7	Desarrollo del proceso de elaboración.....	38
7.1	Desarrollo del proceso de elaboración del principio activo	38
7.2	Atributos críticos de calidad y estrategia de control del principio activo.....	43
7.2.1	Definiciones.....	43
7.2.2	Metodología.....	43
7.3	Datos de respaldo para los tiempos de retención del proceso de elaboración del principio activo	44



Lista de tablas

Tabla 1: Fabricantes del DS	5
Tabla 2: Pruebas IPC realizadas durante la elaboración del DS	14
Tabla 3: Lista de materias primas de origen sintético y referencias a la farmacopea	15
Tabla 4: Listado de materiales de inicio de origen biológico y referencias a la farmacopea	18
Tabla 5: Lista de las materias primas de origen sintético no descritas en una farmacopea	18
Tabla 6: Lista de materiales de inicio de origen biológico y referencias a las especificaciones	18
Tabla 7: Materiales de inicio de origen biológico	19
Tabla 8: Especificaciones para el lote de siembra maestro	24
Tabla 9: Especificaciones para el lote de siembra de trabajo	25
Tabla 10: IPC realizados durante el fraccionamiento e inactivación e IPC realizados en el DS	29
Tabla 11: Derivación de los lotes de QIV producidos durante el desarrollo	39



Lista de figuras

Figura 1: Diagrama de flujo de la multiplicación y cosecha viral.....	7
Figura 2: Diagrama de flujo desde la purificación hasta el DS.....	10
Figura 3: Diagrama de flujo de la preparación de los lotes de siembra maestro, intermedio y de trabajo.....	21



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

1 Fabricantes

El nombre y la dirección de los fabricantes del principio activo (DS), así como sus responsabilidades se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1: Fabricantes del DS

Nombre del fabricante	Dirección del fabricante	Proceso de elaboración
Sanofi Pasteur, Marcy l'Etoile (MLE)	1541, avenue Marcel Mérieux 69280 Marcy l'Etoile Francia	Pruebas de control de calidad del DS
Sanofi Pasteur, Val de Reuil (VDR)	Parc Industriel d'Incarville 27100 Val de Reuil Francia	Elaboración de los lotes de siembra Elaboración del DS Pruebas de control de calidad del DS

2 Lotes, escala y sistema de numeración

2.1 Breve descripción del proceso de elaboración

La elaboración del DS comprende 22 etapas y se divide en 2 partes:

- La primera parte consta de las etapas 1 a 9, desde la recepción de los huevos y la toma de muestras para inspección al trasluz hasta la cosecha monovalente concentrada.
- La segunda parte consta de las etapas 10 a 22, desde la cosecha monovalente concentrada hasta el llenado y almacenamiento final del DS.

Cada cepa viral se multiplica en huevos embrionados. Luego de la incubación, los huevos se enfrían a fin de detener la multiplicación viral y evitar la diseminación de células sanguíneas durante la cosecha. El líquido alantoideo se cosecha, se clarifica mediante centrifugación y filtración y luego se concentra mediante ultrafiltración. Se purifican las partículas virales mediante ultracentrifugación isopícnica en un gradiente de sacarosa. La filtración se realiza entre la primera y segunda etapas de ultracentrifugación isopícnica. Luego, las partículas virales se fraccionan con octoxinol 9. La suspensión viral fraccionada se clarifica mediante centrifugación y el contenido de octoxinol 9 se elimina por diafiltración. El virus fraccionado se inactiva con formaldehído luego de un paso de filtración. La etapa final del proceso de elaboración del DS es una filtración de 0,22 μm . Se describen los tiempos de retención mayores de 12 horas (duración y temperatura de almacenamiento).

2.2 Definición de lotes y escala

Un lote de DS (etapa 21 del proceso de elaboración del DS) corresponde a la cantidad de virus que se obtiene de la cantidad de huevos introducidos en el proceso en la etapa 1 (recepción y toma de muestras de los huevos) e inoculados el mismo día con el mismo inóculo. El tamaño máximo de lote corresponde a 320 000 huevos introducidos en el proceso de elaboración del DS en la etapa 1.

2.3 Sistema de numeración de lotes

El número de lote es una secuencia única y no descriptiva de caracteres que se asigna mediante un sistema informático validado. Este sistema se utiliza para la gestión del proceso de elaboración asistido por computadora. El programa asigna de forma automática un número cuando se crea la orden de elaboración; de esta manera, los lotes de producción consecutivos no siempre corresponden a números consecutivos. El número de lote se asigna a todas las etapas de producción de cada uno de los lotes de siembra o de DS.

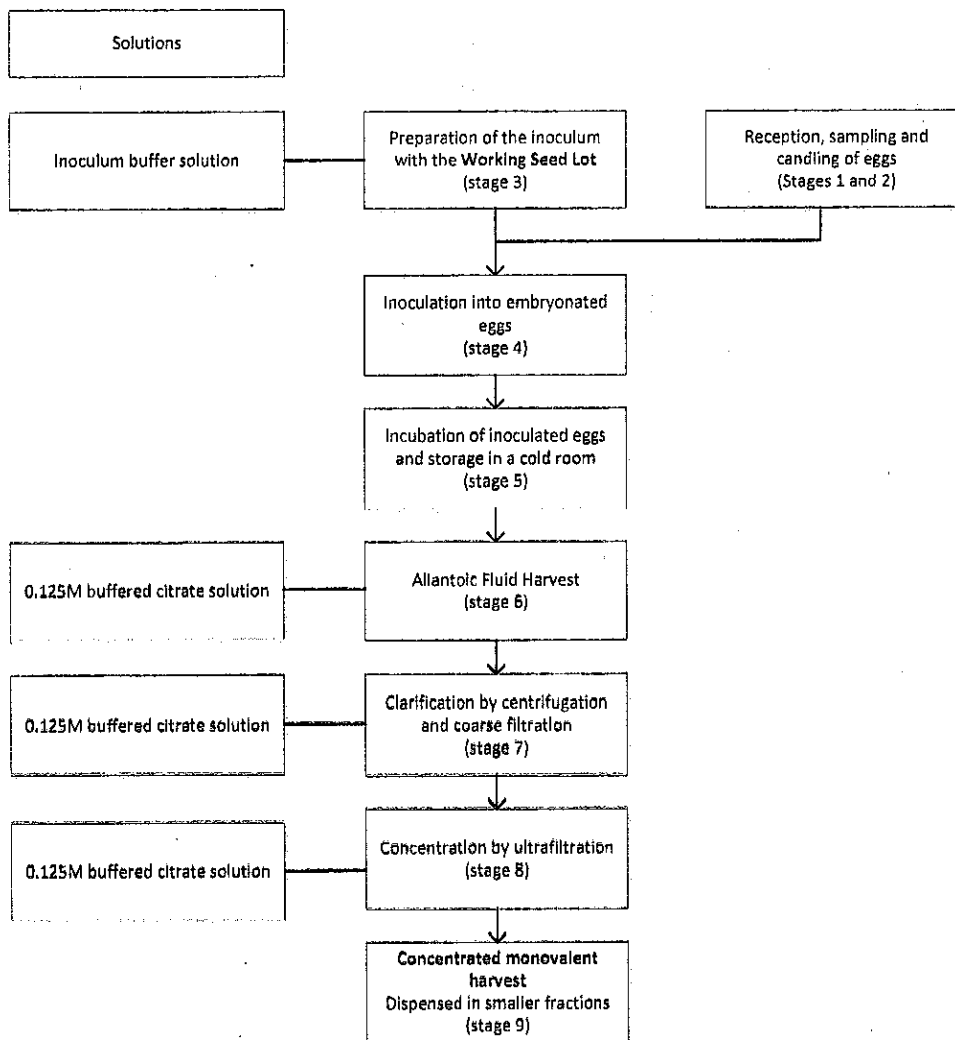
3 Descripción del proceso de elaboración y controles del proceso

3.1 Multiplicación y cosecha viral (etapas 1 a 9)

En la Figura 1 se presenta el diagrama de flujo del proceso para la producción de la cosecha monovalente concentrada.



Figura 1: Diagrama de flujo de la multiplicación y cosecha viral



* The manufacturing process is monitored by process parameters which are not critical

3.1.1 Descripción del proceso

3.1.1.1 Inoculación

Etapa 1: Se reciben los huevos embrionados provenientes de criaderos sanos y se toman muestras para inspección al trasluz.

Etapa 2: Para cada entrega de huevos de los criaderos, se analiza una muestra estadísticamente representativa para garantizar que la calidad de los huevos y los embriones cumple con las especificaciones para la producción del virus gripal (número de huevos sucios, número de huevos contaminados). Los huevos de las muestras de cada uno de los criaderos incluidos en una entrega



se deben incubar sin inoculación del lote de siembra de trabajo (WSL), simultáneamente con los huevos inoculados, y se consideran "huevos de control".

Etapa 3: Se descongela el WSL y se diluye en solución tampón con inóculo. Se puede añadir opcionalmente hidrocortisona al tampón con inóculo para las cepas A o B.

Etapa 4: Las cavidades alantoideas de los huevos se inoculan con un volumen de inóculo adaptado para obtener un rendimiento viral máximo.

La cantidad de virus utilizada para esta inoculación depende de cada WSL. Para cada WSL se selecciona la combinación óptima de parámetros (dilución del WSL, duración del cultivo viral y temperatura de incubación), tras haber probado diferentes combinaciones de dichos parámetros en un número reducido de huevos embrionados. La combinación óptima es la que corresponda al título máximo de antígeno hemaglutinina (HA) y que garantice el mejor rendimiento. Los resultados del plan de experiencia desarrollado a escala reducida y detallado más arriba se pueden adaptar en el caso de que la producción a escala industrial demuestre que otra combinación sería más adecuada en cuanto a rendimiento.

3.1.1.2 Multiplicación viral

Etapa 5: Se incuban los huevos inoculados: las condiciones óptimas de incubación, entre ellas la temperatura y la duración de la incubación, se definen para obtener un rendimiento viral máximo. Después de la incubación, los huevos se transfieren a una cámara frigorífica para detener la multiplicación viral y evitar la diseminación de células sanguíneas durante la cosecha.

3.1.1.3 Cosecha

Etapa 6: Tras la apertura y control de los huevos, se cosecha, se filtra y se agrupa el líquido alantoideo.

Etapa 7: Después, la suspensión se diluye con citrato 0,125 M tamponado y se clarifica por centrifugación y filtración gruesa de 20 µm.

Etapa 8: La suspensión viral clarificada se concentra mediante ultrafiltración para constituir la cosecha monovalente concentrada.

Etapa 9: La cosecha monovalente concentrada se dispensa en fracciones más pequeñas antes de la purificación. El volumen de cada fracción se define para que contenga el equivalente de $35\,000 \pm 5\,000$ huevos.

Se puede aplicar un tiempo máximo de retención de 84 horas a $+5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ en la etapa de cosecha monovalente (etapa 9) o antes de dispensar en fracciones más pequeñas (etapa 8).

3.1.2 Controles durante el proceso

No se realizan pruebas de control durante el proceso (IPC) en la producción de la cosecha monovalente concentrada.



3.2 Elaboración del principio activo (etapas 10 a 22)

El diagrama de flujo del proceso que muestra las distintas etapas de elaboración, desde la purificación de la cosecha monovalente concentrada hasta el principio activo, así como el llenado y almacenamiento posteriores, se presenta en la Figura 2.

Figura 2: Diagrama de flujo desde la purificación hasta el DS

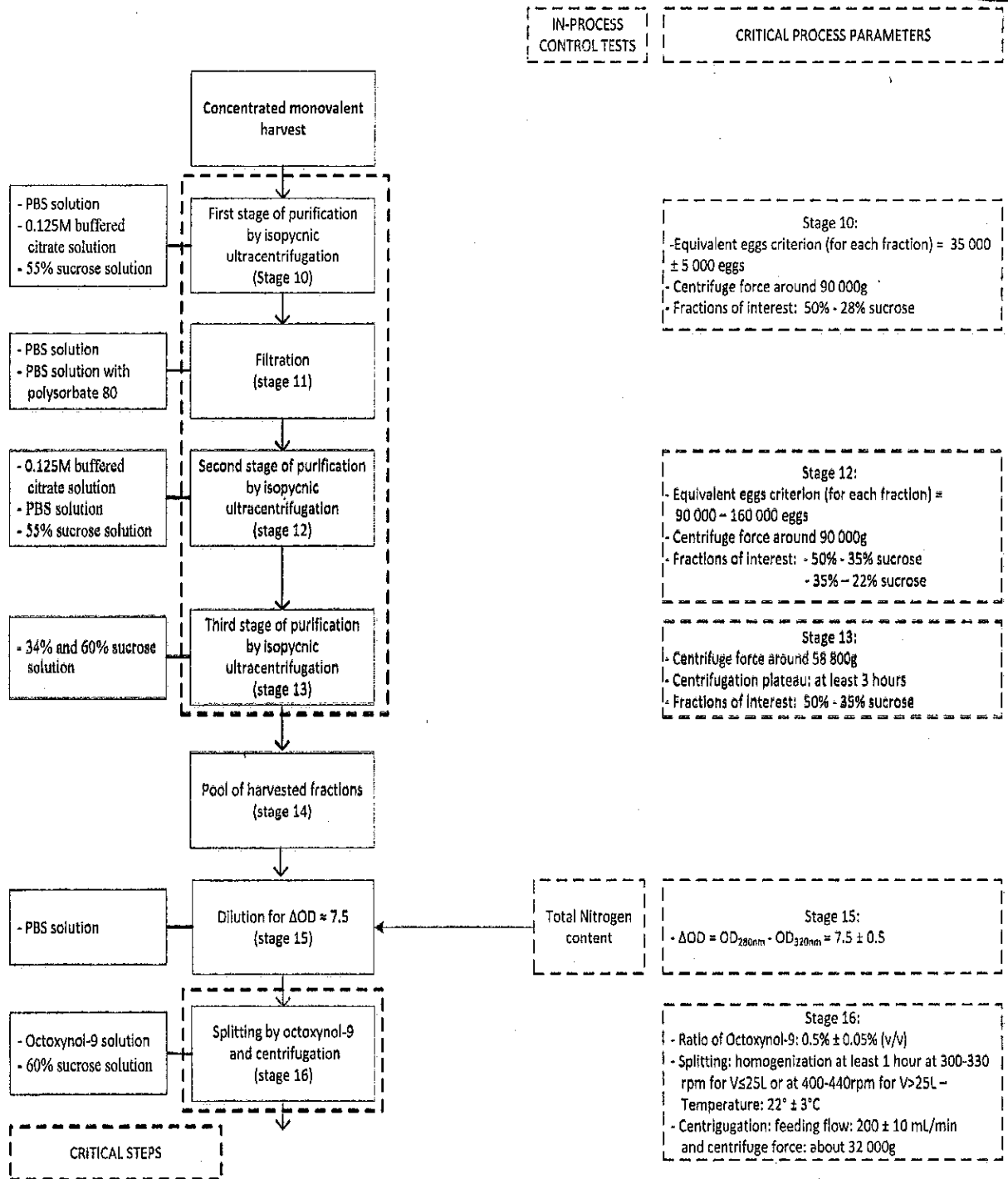
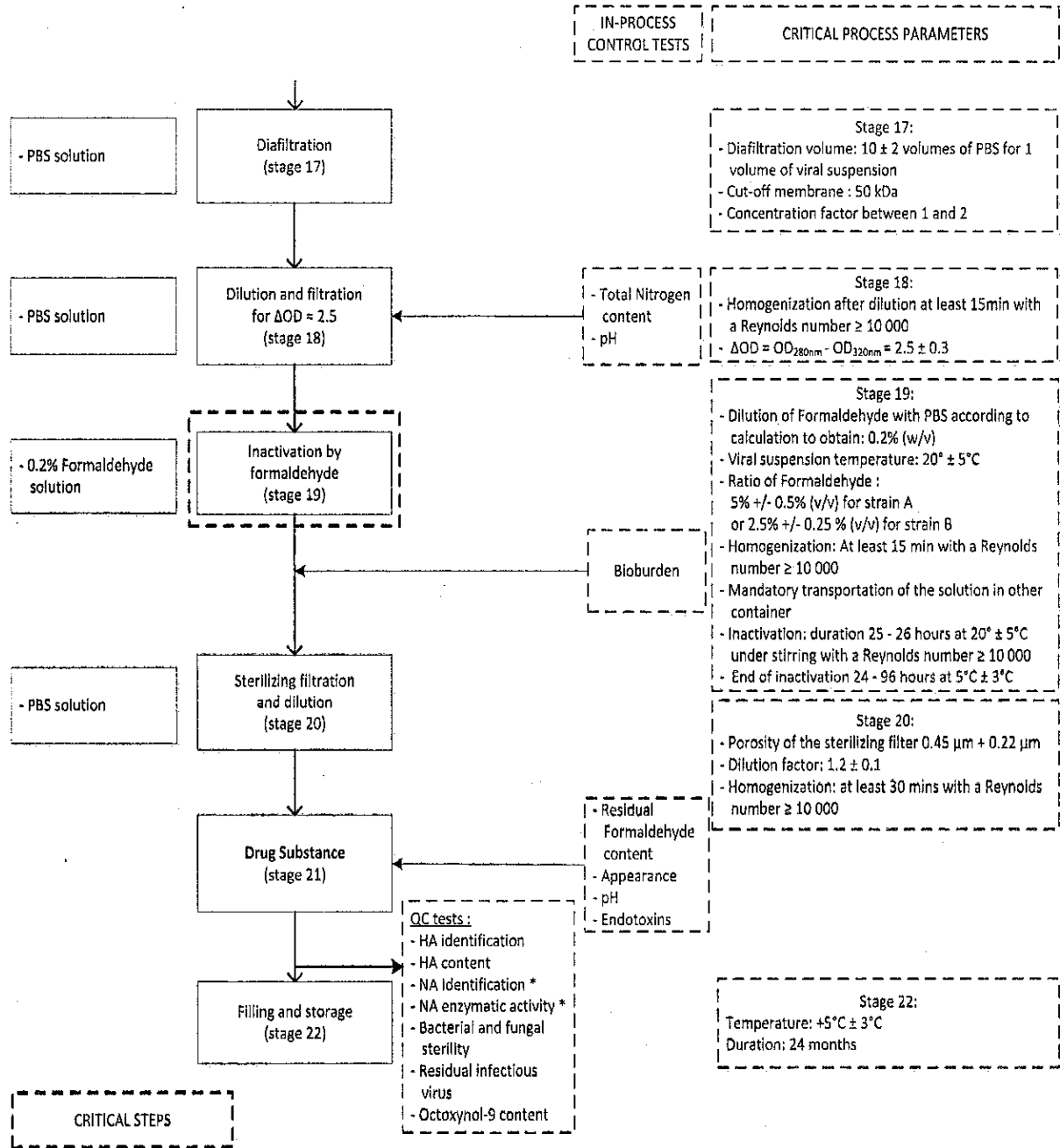


Figura 2 (continuación): Diagrama de flujo desde la purificación hasta el DS



* Performed only on the three first monovalent bulk batches manufactured from any new working seed lot.



3.2.1 Descripción del proceso

3.2.1.1 Purificación

Se llevan a cabo tres pasos de purificación consecutivos por ultracentrifugación isopícnica en la cosecha monovalente que contiene virus gripal.

Paso de purificación 1

Etapa 10: Cada fracción de la cosecha monovalente concentrada, que contiene el equivalente de $35\,000 \pm 5\,000$ huevos, se purifica mediante ultracentrifugación isopícnica en un gradiente de sacarosa. Las moléculas pequeñas fluyen a través del rotor sin penetrar el gradiente de sacarosa, mientras que las moléculas más grandes ingresan en el gradiente a mayor o menor profundidad, según su tamaño y densidad. Una vez terminada la centrifugación, se recoge el contenido del rotor de la centrífuga y se evalúa la concentración de sacarosa de cada fracción por refractometría. Las fracciones que contienen entre un 50 % y un 28 % de sacarosa presentan la mayor parte de la actividad viral; éstas se recogen y se agrupan.

Etapa 11: Las suspensiones virales obtenidas de la etapa anterior se agrupan para obtener el equivalente de 90 000 hasta 160 000 huevos para la etapa 12 que aparece a continuación. La suspensión viral obtenida se filtra a través de membranas de tamaño de poro decreciente, desde $1,2\ \mu\text{m}$ hasta $0,45\ \mu\text{m}$, y se diluyen en solución salina tamponada con fosfato (PBS) antes de la segunda etapa de purificación. Los filtros se tratan antes de su uso con una solución PBS con polisorbato 80 para mojar las membranas y facilitar el paso de filtración. La solución PBS con polisorbato 80 se elimina antes de filtrar la suspensión viral.

Se puede aplicar un tiempo de retención máximo de 84 horas a $+5\ ^\circ\text{C} \pm 3\ ^\circ\text{C}$ después de la filtración.

Paso de purificación 2

Etapa 12: Cada fracción, que contiene el equivalente de 90 000 hasta 160 000 huevos, se centrifuga nuevamente por ultracentrifugación isopícnica en un gradiente de sacarosa, en las mismas condiciones de preparación de la primera etapa de purificación. Se recolectan las fracciones que contienen del 50 % al 35 % de sacarosa (fracción A, que corresponde a las fracciones que contienen la mayor parte de la actividad viral). Las fracciones que contienen del 35 % al 22 % de sacarosa también se recolectan y se agrupan para una nueva purificación en un tercer gradiente de sacarosa.

Paso de purificación 3

Etapa 13: Después de la adición de PBS, se lleva a cabo una última etapa de purificación con la agrupación de las fracciones recolectadas de la segunda etapa de ultracentrifugación isopícnica, las cuales contienen del 35 % al 22 % de sacarosa. Se procesan mediante una tercera y última ultracentrifugación isopícnica a alrededor de 58 000 g en un gradiente de sacarosa que va del 60 % al 0 % (p/p). El gradiente de sacarosa se prepara utilizando soluciones de sacarosa al $34\% \pm 0,5\%$ (p/p) y al $60\% \pm 0,5\%$ (p/p).

