

Después de una centrifugación estable de al menos 3 horas, se cosechan las fracciones de sacarosa. El contenido de sacarosa de las fracciones se evalúa mediante refractometría. Las fracciones que contienen del 50 % al 35 % de sacarosa se cosechan y se agrupan (fracción B).

Etapa 14: La fracción B se agrupa con la fracción A para constituir la agrupación viral purificada.

Se puede aplicar un tiempo de retención máximo de 36 horas a  $+5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$  en la etapa de agrupación viral purificada.

### 3.2.1.2 Fraccionamiento

Etapa 15: El contenido proteico de la agrupación viral purificada se reduce y estandariza mediante una dilución apropiada en solución PBS hasta aproximadamente una diferencia de la densidad óptica medida (DO), respectivamente, a 280 nm (absorción de proteínas y absorción debida a la opalescencia de la suspensión viral) y a 320 nm (absorción debida a la opalescencia de la suspensión viral):  $\Delta DO = DO_{280\text{ nm}} - DO_{320\text{ nm}} = 7,5 \pm 0,5$

Etapa 16: Se agrega solución de octoxinol 9 (el agente de fraccionamiento) para obtener una concentración final de  $0,5\% \pm 0,05\%$  v/v. El contacto es de al menos 1 hora con agitación a baja velocidad, de 300 a 330 rpm, para un volumen igual o menor que 25 L, o de 400 a 440 rpm para un volumen superior a 25 L. La etapa de fraccionamiento se realiza a  $+22\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ . Se añade la suspensión viral fraccionada a la centrífuga a un flujo objetivo de  $200 \pm 10\text{ mL/min}$  y se clarifica mediante centrifugación a aproximadamente 32 000 g. Cuando termina la centrifugación, se asegura la máxima recolección de suspensión viral mediante la introducción de una solución de sacarosa al  $60\% \pm 0,5\%$  en el rotor.

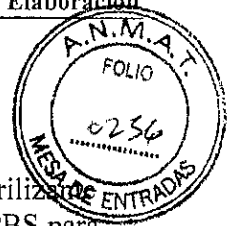
Etapa 17: Se diafiltra un volumen de la suspensión viral fraccionada frente a solución PBS, utilizando una membrana que permita la eliminación del octoxinol 9. Al final de la etapa, la suspensión viral fraccionada se concentra con un factor de entre 1 y 2.

### 3.2.1.3 Inactivación

Etapa 18: El contenido proteico se reduce y estandariza mediante dilución en solución PBS y luego se pasa a través de un filtro con una doble porosidad de  $0,65\text{ }\mu\text{m}$  y de  $0,45\text{ }\mu\text{m}$ . La solución se homogeneiza durante al menos 15 minutos a una velocidad de agitación que permita tener un número de Reynolds no inferior a 10 000. Tras la homogeneización, la diferencia de DO determinada respectivamente a 280 nm y a 320 nm es  $\Delta DO = DO_{280\text{ nm}} - DO_{320\text{ nm}} = 2,5 \pm 0,3$ .

Etapa 19: Se agrega una solución de formaldehído a la suspensión viral hasta alcanzar una concentración de formaldehído del 0,01 % (p/v) para las cepas gripales A o del 0,005 % (p/v) para las cepas gripales B. La solución se agita durante al menos 15 minutos a una velocidad de agitación que permita tener un número de Reynolds no inferior a 10 000. Se transfiere la suspensión a varios recipientes que se trasladan a otra sala. La inactivación del virus dura de 25 a 26 horas a  $+20\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$  bajo agitación, seguida por almacenamiento a  $+5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$  durante 24 a 96 horas.





### 3.2.1.4 Filtración esterilizante de 0,22 µm

Etapa 20: La suspensión viral inactivada y fraccionada se pasa a través de un filtro esterilizante con una porosidad doble de 0,45 µm y 0,22 µm y se diluye a un factor de  $1,2 \pm 0,1$  en PBS para constituir el DS. Se prueba la integridad de la membrana de filtración. Se agita la suspensión durante al menos 30 minutos. La suspensión se agita al menos 30 minutos a una velocidad que permita tener un número de Reynolds no inferior a 10 000.

### 3.2.1.5 Llenado y almacenamiento

Etapa 21: Se toman muestras para las pruebas de control de calidad de liberación.

Etapa 22: El granel monovalente se transfiere a envases.

El DS se almacena a  $+5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$  hasta 24 meses. La vida útil y las condiciones de almacenamiento se basan en los resultados de estabilidad que se describen con más detalle en las secciones 3.2.S.7.1 Resumen y conclusiones de estabilidad y 3.2.S.7.3 Datos de estabilidad.

### 3.2.1.6 Transporte

Los DS se utilizan para la mezcla en la planta de elaboración de VDR y no hay transporte del DS entre plantas de elaboración.

### 3.2.2 IPC

La Tabla 2 enumera las pruebas IPC para cada etapa de producción. Se suministran más detalles sobre los criterios de aceptación y métodos de prueba en las secciones 3.2.S.2.4 Controles de los pasos críticos e intermedios y 3.2.S.2.6 Desarrollo del proceso de elaboración.

Tabla 2: Pruebas IPC realizadas durante la elaboración del DS

Etapa del proceso de elaboración	Prueba	Criterio de aceptación
Etapa 15	Contenido de nitrógeno total	$\leq 600\text{ µg/mL}$
Etapa 18	Contenido de nitrógeno total	$\leq 200\text{ µg/mL}$
Etapa 18	pH	7,2-7,5
Antes de la filtración esterilizante de 0,22 µm (etapa 20)	Carga microbiana	$\leq 100\text{ UFC/100 mL}$
DS (etapa 21)	Aspecto	Líquido ligeramente blancuzco y opalescente.
DS (etapa 21)	pH	6,8-7,6.
DS (etapa 21)	Contenido de endotoxinas bacterianas	$\leq 100\text{ UI/mL}$
DS (etapa 21)	Contenido de formaldehído residual	$\leq 85\text{ µg/mL}$





## 4 Control de materiales

### 4.1 Materiales de grado farmacopeico y no farmacopeico

#### 4.1.1 Materias primas y materiales de inicio descritos en una farmacopea

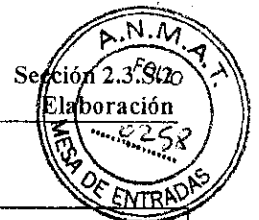
La lista de las materias primas de origen sintético utilizadas en la elaboración del DS se presenta en la Tabla 3.

Todas las materias primas descritas en esta tabla se analizan mediante métodos de una farmacopea y se liberan si los resultados de las pruebas cumplen las especificaciones mencionadas en la monografía.

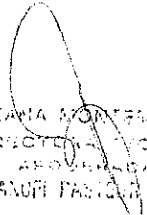
**Tabla 3: Lista de materias primas de origen sintético y referencias a la farmacopea**

Nombre de la materia prima	Referencia a la farmacopea	Uso	Etapas del proceso de elaboración
Sacarosa	Ph. Eur. 0204, edición actual	Solución de sacarosa al 34%/55%/60%	Producción del lote de siembra: - Concentración del WSL (etapa 9) Producción del DS: - Purificación (etapas 10, 12 y 13) - Fraccionamiento (etapa 16)
Citrato de sodio	Ph. Eur. 0412, edición actual	Solución de citrato 0,125 M tamponada	Producción del DS: - Cosecha (etapas 6, 7 y 8) - Purificación (etapas 10 y 12)
Polisorbato 80	Ph. Eur. 0428, edición actual	Solución salina tamponada con fosfato (PBS) con polisorbato 80	Producción del DS: - Humectación de los filtros utilizados en la etapa de purificación (etapa 11)
Sulfato de neomicina	Ph. Eur. 0197, edición actual	Solución tampón del inóculo para la preparación del DS	Producción del DS: - Preparación del inóculo con el WSL (etapa 3)
Hidrocortisona	Ph. Eur. 0335, edición actual	Solución tampón del inóculo para la preparación del DS	Producción del DS: - Preparación del inóculo con el WSL (etapa 3)





Nombre de la materia prima	Referencia a la farmacopea	Uso	Etapas del proceso de elaboración
<b>Cloruro de sodio</b>	Ph. Eur. 0193, edición actual	Solución tampón del inóculo destinada a la preparación de lotes de siembra y solución para preparación del DS Solución tampón del inóculo para la producción del DS Solución de citrato 0,125 M tamponada Solución PBS Solución PBS con polisorbato 80 Solución de sacarosa al 34 %/55 %/60 % Solución de formaldehído al 0,2 %	Producción del lote de siembra: - Preparación del inóculo para el lote de siembra maestro (MSL), lote de siembra intermedio (ISL) y WSL (etapa 4) - Concentración del WSL (etapa 9) - Filtración del WSL (etapa 10) Producción del DS: - Preparación del inóculo con el WSL (etapa 3) - Cosecha (etapas 6, 7 y 8) - Purificación (etapas 10, 11, 12 y 13) - Fraccionamiento (etapas 15, 16 y 17) - Inactivación (etapas 18 y 19) - Filtración esterilizante (etapa 20)
<b>Cloruro de potasio</b>	Ph. Eur. 0185, edición actual	Solución PBS Solución PBS con polisorbato 80 Solución de sacarosa al 34 %/55 %/60 % Solución de formaldehído al 0,2 %	Producción del lote de siembra: - Concentración del WSL (etapa 9) Producción del DS: - Purificación (etapas 10, 11, 12 y 13) - Fraccionamiento (etapas 15, 16 y 17) - Inactivación (etapas 18 y 19) - Filtración esterilizante (etapa 20)
<b>Dihidrogenofosfato de potasio</b>	Ph. Eur. 0920, edición actual	Solución tampón del inóculo destinada a la preparación de lotes de siembra y solución para preparación del DS Solución tampón del inóculo para la producción del DS Solución PBS Solución PBS con polisorbato 80 Solución de sacarosa al 34 %/55 %/60 % Solución de formaldehído al 0,2 %	Producción del lote de siembra: - Preparación del inóculo para el MSL, ISL y WSL (etapa 4) - Concentración del WSL (etapa 9) - Filtración del WSL (etapa 10) Producción del DS: - Preparación del inóculo con el WSL (etapa 3) - Purificación (etapas 10, 11, 12 y 13) - Fraccionamiento (etapas 15, 16 y 17) - Inactivación (etapas 18 y 19) - Filtración esterilizante (etapa 20)

  
 ROXANA MONTEMILONE  
 DIRECTORA TÉCNICA  
 SANOFI PASTEUR S.A.





Nombre de la materia prima	Referencia a la farmacopea	Uso	Etapas del proceso de elaboración
<b>Hidrogenofosfato disódico dihidrato</b>	Ph. Eur. 0602, edición actual	Solución tampón del inóculo destinada a la preparación de lotes de siembra y solución para preparación del DS Solución tampón del inóculo para la producción del DS Solución PBS Solución de PBS con polisorbato 80, solución de sacarosa al 34 %/55 %/60 % Solución de formaldehído al 0,2 %	Producción del lote de siembra: - Preparación del inóculo para el MSL, ISL y WSL (etapa 4) - Concentración del WSL (etapa 9) - Filtración del WSL (etapa 10) Producción del DS: - Preparación del inóculo con el WSL (etapa 3) - Purificación (etapas 10, 11, 12 y 13) - Fraccionamiento (etapas 15, 16 y 17) - Inactivación (etapas 18 y 19) - Filtración esterilizante (etapa 20)
<b>Solución de formaldehído</b>	Ph. Eur. 0826, edición actual*	Solución de formaldehído al 0,2 %	Producción del DS: - Inactivación (etapa 19)
<b>Agua purificada</b>	Ph. Eur. 0008, edición actual	Solución tampón del inóculo destinada a la preparación de lotes de siembra y solución para preparación del DS Solución tampón del inóculo para la producción del DS Solución de citrato 0,125 M tamponada Solución PBS Solución PBS con polisorbato 80 Solución de sacarosa al 34 %/55 %/60 %	Producción del lote de siembra: - Preparación del inóculo para el MSL, ISL y WSL (etapa 4) - Concentración del WSL (etapa 9) - Filtración del WSL (etapa 10) Producción del DS: - Preparación del inóculo con el WSL (etapa 3) - Cosecha (etapas 6, 7 y 8) - Purificación (etapas 10, 11, 12 y 13)
<b>Agua ultrapurificada</b> o <b>Agua para inyectables</b>	Ph. Eur. 1927, edición actual o Ph. Eur. 0169, edición actual	Solución tampón del inóculo destinada a la preparación de lotes de siembra y solución para preparación del DS Solución tampón del inóculo para la producción del DS Solución de citrato 0,125 M tamponada Solución PBS Solución PBS con polisorbato 80 Solución de sacarosa al 34 %/55 %/60 % Solución de formaldehído al 0,2 % preparada extemporáneamente	Producción del lote de siembra: - Preparación del inóculo para el MSL, ISL y WSL (etapa 4) - Concentración del WSL (etapa 9) - Filtración del WSL (etapa 10) Producción del DS: - Preparación del inóculo con el WSL (etapa 3) - Cosecha (etapas 6, 7 y 8) - Purificación (etapas 10, 11, 12 y 13) - Fraccionamiento (etapas 15, 16 y 17) - Inactivación (etapas 18 y 19) - Filtración esterilizante (etapa 20)

\* Para la solución de formaldehído, la lista de pruebas, sus métodos y sus criterios de aceptación cumplen con la Ph. Eur. 0826, edición actual, salvo para el análisis de metanol. Esta prueba se realiza mediante un método interno con cromatografía de gases (método n.º 2.2.28 de la Ph. Eur., edición actual), sin embargo, el criterio de aceptación de la prueba es el que se describe en la monografía n.º 0826 de la Ph. Eur., edición actual, es decir, 9,0 % v/v a 15,0 % v/v.



Los materiales de inicio de origen biológico descritos en la Farmacopea Europea se presentan en la Tabla 4.

Todos los materiales de inicio se controlan mediante métodos farmacopéicos y se liberan si los resultados de las pruebas cumplen las especificaciones mencionadas en la monografía.

**Tabla 4: Listado de materiales de inicio de origen biológico y referencias a la farmacopea**

Nombre del material de inicio	Referencia a la farmacopea	Etapas del proceso de elaboración
Huevos fertilizados de criaderos de gallinas sin patógenos específicos (SPF)	Ph. Eur., 5.2.2, edición actual	Preparación de MSL, ISL y WSL.

#### 4.1.2 Materias primas y materiales de inicio no descritos en una farmacopea

La única materia prima que no se describe en la Farmacopea Europea o en la farmacopea de alguno de los Estados miembro es el octoxinol 9, utilizado para el fraccionamiento viral. Este agente de fraccionamiento se analiza y se libera según una especificación interna.

Las materias primas que no se describen en la Farmacopea Europea se presentan en la Tabla 5.

**Tabla 5: Lista de las materias primas de origen sintético no descritas en una farmacopea**

Nombre de la materia prima	Referencia	Uso	Etapas del proceso de elaboración
Solución de octoxinol 9	Especificación interna	Solución de octoxinol 9	Fraccionamiento (etapa 16)

Encontrará las especificaciones detalladas de los materiales de grado no farmacopéico en la sección 3.2.S.2.3 Lista y controles de las materias primas.

Los materiales de inicio de origen biológico que no se describen en ninguna farmacopea se enumeran en la Tabla 6, con referencias cruzadas a las secciones que analizan las pruebas necesarias y los límites asociados para controlar la calidad de estos materiales.

**Tabla 6: Lista de materiales de inicio de origen biológico y referencias a las especificaciones**

Material de inicio	Etapas de elaboración	Especificaciones
Cepas del virus de la gripe	Preparación del MSL	Cepas de referencia suministradas por un Centro Colaborador de la Organización Mundial de la Salud (OMS) vea la sección 3.2.S.2.3 Fuente, historia y generación de la cepa viral vacunal
Huevos embrionados de criaderos sanos de gallinas	Producción del DS: inoculación (etapa 4)	Vea la sección 3.2.S.2.3 Control de los materiales fuente y de inicio de origen biológico





## 4.2 Control de los materiales fuente y de inicio de origen biológico

Sanofi Pasteur aplica requisitos estrictos de rastreabilidad para los materiales de origen biológico, de acuerdo con la reglamentación vigente.

Una descripción de los materiales fuente y de inicio y de las materias primas de origen biológico que se utilizan para elaborar el DS activo se presenta en la Tabla 7.

Tabla 7: Materiales de inicio de origen biológico

Material	Origen	Etapas del proceso de elaboración	Función
Huevos SPF fertilizados	Gallinas SPF	Preparación de MSL, ISL y WSL	Sustrato para la multiplicación del virus
Huevos embrionados	Gallinas de criaderos sanos	Producción del DS: inoculación (etapa 4)	Sustrato para la multiplicación del virus
Cepas del virus de la gripe	Vea la sección 3.2.S.2.3 Fuente, historia y generación de las cepas virales vacunales	Preparación del MSL	Virus

## 4.3 Sistema de lotes de siembra viral

### 4.3.1 Fuente, historia y generación de la cepa vacunal viral

Para la preparación de la vacuna antigripal tetravalente (QIV) se utilizan cuatro cepas del virus de la gripe:

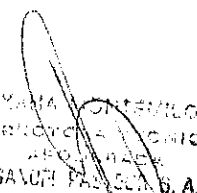
**Género:** Orthomyxoviridae

**Especie:** Influenzae

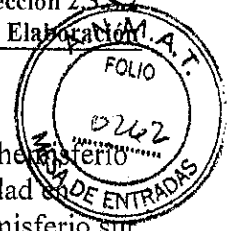
**Nombre de la cepa:**

- cepa A/H1N1
- cepa A/H3N2
- Cepa del tipo B/linaje Victoria;
- Cepa del tipo B/linaje Yamagata;

Las glucoproteínas de superficie de los antígenos HA y neuraminidasa (NA) de los virus gripales cambian frecuentemente como resultado de la mutación genética. Por esta razón, la OMS coordina un sistema internacional de vigilancia para monitorear la epidemiología de los virus de la gripe. El sistema internacional de vigilancia de la OMS identifica nuevas cepas del virus de la gripe que

  
ROXANA GONZALEZ  
DIRECCIÓN TÉCNICA  
APOYADO  
SANOFI PASTEUR S. A.





necesitan ser incluidas en las vacunas antigripales. Las cepas virales que circulan en el hemisferio norte se revisan en febrero a fin de determinar qué variantes podrían causar la enfermedad en seres humanos el invierno siguiente. De manera similar, los virus que circulan en el hemisferio sur se revisan anualmente en septiembre. Con base en estas revisiones, los expertos de la OMS deciden qué variantes se deben incluir en la vacuna antigripal de la próxima temporada, anticipando una compatibilidad cruzada precisa entre la composición de la vacuna y las cepas circulantes.

Se puede encontrar una descripción detallada de la historia de las cepas virales en la sección 3.2.S.2.3 Fuente, historia y generación de la cepa viral vacunal.

#### 4.3.2 Sistema de lotes de siembra viral

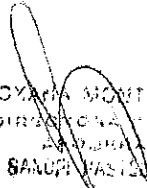
El sistema de lotes de siembra viral consta de la amplificación viral de la cepa de referencia mediante pasajes adicionales en huevos embrionados sin patógenos específicos (SPF). El número de pasaje aumenta de uno en uno por cada nueva etapa de elaboración (es decir, la cepa viral de referencia, el MSL, el ISL y el WSL). A fin de aumentar la amplificación viral, se pueden preparar ISL entre la elaboración de los MSL y WSL.

En la Figura 3, se presenta un panorama de la elaboración del sistema de lotes de siembra, utilizado para las cuatro cepas gripales.

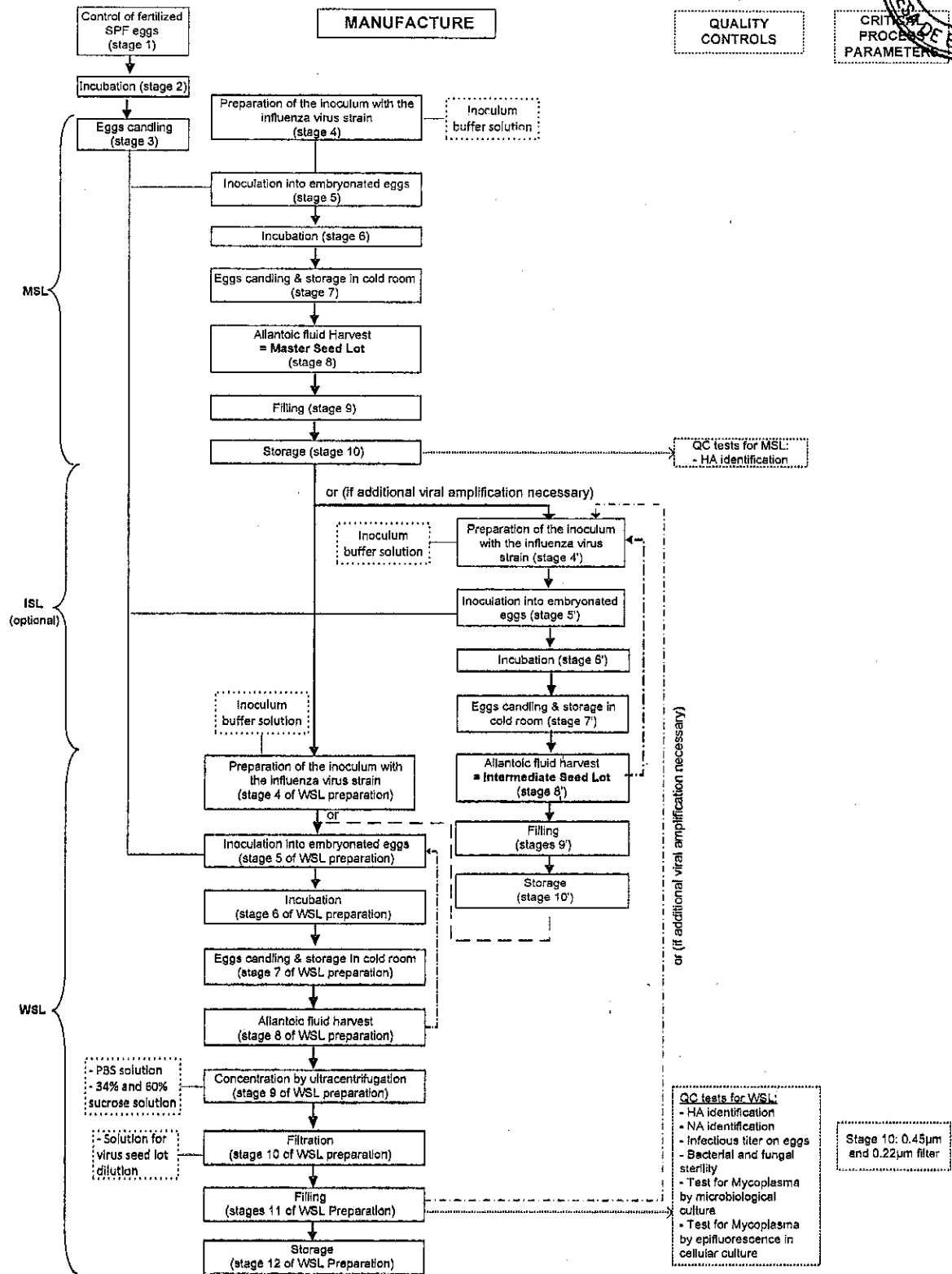
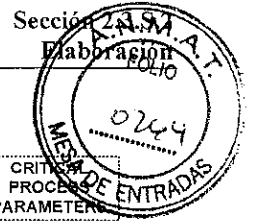




Figura 3: Diagrama de flujo de la preparación de los lotes de siembra maestro, intermedio y de trabajo

  
ROXANA MONTEMILONG  
DIRECCIÓN TÉCNICA  
SANOFI PASTEUR S.A.





ROYAL PHARMACEUTICALS  
 DIAGNÓSTICA TÉCNICA  
 S.A.  
 SANOFI PASTEUR S.A.





#### 4.3.2.1 Preparación del MSL (etapas 1 a 10)

##### *Inoculación*

Etapa 1: Cuando se reciben, los huevos SPF fertilizados se revisan visualmente y se desinfectan.

Etapa 2: Los huevos se incuban en condiciones óptimas de incubación para la embriogénesis (incluyendo temperatura y duración de la incubación) adaptadas a la multiplicación del virus de la gripe.

Etapa 3: Los huevos embrionados se observan al trasluz.

Etapa 4: Una vez descongelada, se preparan diluciones 1/10 de la cepa viral en solución tampón del inóculo y se homogeneizan las suspensiones.

Etapa 5: Se desinfecta la parte superior de cada huevo. Se inocula un volumen fijo de cada dilución del inóculo viral en la cavidad alantoidea de los huevos SPF embrionados. Se inocula un máximo de 45 huevos por cada dilución.

##### *Multiplicación viral*

Etapa 6: Los huevos inoculados se incuban en condiciones óptimas de incubación (incluyendo temperatura y duración de la incubación) para garantizar un rendimiento viral máximo en la etapa de elaboración del DS.

Etapa 7: Los huevos se observan al trasluz y los anormales se rechazan. Luego se colocan los huevos en una cámara frigorífica para evitar la diseminación de células sanguíneas durante la cosecha.

##### *Cosecha*

Etapa 8: Se abre la parte superior de cada huevo tras su desinfección y se desechan los huevos anormales. Se cosecha el líquido alantoideo y se agrupa para cada dilución viral. Se evalúa el título de antígeno HA de cada dilución. La dilución que presente el título óptimo de antígeno HA para garantizar un rendimiento máximo en la etapa de elaboración del DS se selecciona como MSL.

##### *Llenado y almacenamiento*

Etapa 9: El MSL se envasa en criotubos. Se toman muestras para las pruebas de control de calidad (CC).

Etapa 10: El MSL se almacena a  $\leq 60$  °C.

#### 4.3.2.2 Preparación del lote de siembra intermedio (etapas 1 a 10)

Los lotes de siembra intermedios se elaboran según el procedimiento descrito para la preparación del MSL, con la excepción de la preparación del inóculo (etapa 4), que en este caso es una dilución 1:10 del MSL, de un ISL anterior o de un WSL anterior (considerado en este caso como un ISL).

El ISL se envasa en criotubos y se almacena a  $\leq 60$  °C.





#### 4.3.2.3 Preparación del lote de siembra de trabajo (etapas 1 a 12)

Las etapas de elaboración 1 a 8 de la preparación del WSL son idénticas a las descritas para la preparación del MSL (vea la Figura 3), con la excepción de la preparación del inóculo (en este caso, un vial del MSL o del ISL diluido en solución tampón con inóculo).

##### *Concentración*

Etapas 9: Se concentra el líquido alantoideo mediante ultracentrifugación en un gradiente de sacarosa continuo. Solo se recolectan y agrupan las fracciones que contienen el virus.

##### *Filtración*

Etapas 10: La suspensión viral concentrada se diluye con solución para diluir los lotes de siembra viral antes de las filtraciones a través de un prefiltro de 1,2 µm y a través de un filtro con una porosidad doble de 0,45 µm y 0,22 µm, respectivamente. Se prueba la integridad de la membrana de filtración.

##### *Llenado y almacenamiento*

Etapas 11: El WSL se envasa en criotubos. Se toman muestras para las pruebas de CC.

Etapas 12: El WSL se almacena a  $\leq -60$  °C (alrededor de 200 a 1800 tubos).

Se prepararán y se analizarán nuevos lotes WSL como se describe anteriormente. De conformidad con "Vacuna antigripal de virus fraccionados, inactivada", Ph. Eur. n.º 0158, edición actual, el número total de pasajes desde la vacuna antiviral candidata recibida por el fabricante hasta el WSL no superará los 15.

La composición de los reactivos preparados para la elaboración de los lotes de siembra se detalla en la sección 3.2.S.2.3 Sistema de lotes de siembra viral, Caracterización y pruebas.

#### 4.3.3 Caracterización y pruebas de las siembras virales

##### 4.3.3.1 Especificaciones

Las especificaciones para el MSL y para el WSL utilizados para elaborar la vacuna se presentan en la Tabla 8 y en la Tabla 9.

Tabla 8: Especificaciones para el lote de siembra maestro

Prueba	Método	Referencia regulatoria	Criterio de aceptación
Identificación del antígeno HA	Inhibición de la hemaglutinación (IHA)	Ph. Eur 0158, edición actual	Positivo



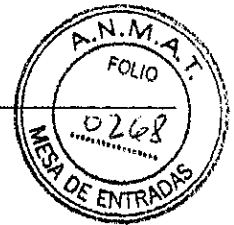


Tabla 9: Especificaciones para el lote de siembra de trabajo

Prueba	Método	Referencia regulatoria	Criterio de aceptación
Identificación del antígeno HA	IHA	Ph. Eur. 0158, edición actual	Positivo
Identificación del antígeno neuraminidasa (NA)	Transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)	Método interno basado en el método n.º 2.6.21 de la Ph. Eur., edición actual	Positivo
Título infeccioso	EID <sub>50</sub> * en huevos	Método interno	≥6 log <sub>10</sub> EID <sub>50</sub> /mL
Esterilidad bacteriana y fúngica	Filtración por membrana.	Ph. Eur., 2.6.1, edición actual	Sin multiplicación microbiana.
Prueba de micoplasmas por cultivo microbiológico	Inoculación en medios de cultivo adecuados	Ph. Eur., 2.6.7, edición actual	Negativa para la presencia de micoplasmas cuando se cultiva en agar y caldo
Prueba de micoplasmas por epifluorescencia en cultivo celular	Inoculación a células indicadoras y tinción específica	Ph. Eur., 2.6.7, edición actual	Negativa para la presencia de micoplasmas cuando se cultiva en células y se trata con una tintura fluorescente.

ROXANA MONTELEONE  
 DIRECTORA GENERAL  
 SANOFI PASTEUR S.A.





\* EID<sup>50</sup> para: dosis infecciosa del 50 % en huevos

Los procedimientos utilizados para controlar el MSL y el WSL, así como su validación se presentan en la sección 3.2.S.2.3 Sistema de lotes de siembra viral, Caracterización y pruebas.

Todos los resultados de los lotes de MSL y WSL satisfacen las especificaciones.

#### 4.3.3.2 Estrategia de pruebas (justificación/fundamento)

Las pruebas realizadas en los lotes de siembra cumplen con la monografía n.º 0158 “Vacuna antigripal (virión fraccionado, inactivado)” de la Ph. Eur., edición actual, salvo para la determinación del título infeccioso, que es una prueba adicional. También se cubren los requisitos aplicables de la monografía n.º 0153 “Vacunas para uso humano” de la Ph. Eur., edición actual.

Las pruebas se realizan a fin de demostrar la identidad de la cepa, la pureza biológica y la potencia de los lotes de siembra:

- Los antígenos HA de cada lote de siembra deben identificarse como el virus gripal de la cepa adecuada mediante un método apropiado (monografía n.º 0158 “Vacuna antigripal [virión fraccionado, inactivado] de la Ph. Eur., edición actual). La identificación del antígeno HA en el MSL y en el WSL se realiza mediante el método de inhibición de la hemaglutinación (IHA). Los antígenos HA tienen una actividad biológica medible<sup>1</sup>, que puede inhibirse con un antisuero dirigido contra el antígeno. Por consiguiente, se utilizó un método de inhibición inmunológica bien conocido, comparando la inhibición de la actividad biológica de la muestra analizada inducida por el antisuero con antígenos de referencia. También se realiza una prueba de caracterización mediante secuenciación genética de la HA para respaldar la identificación de la HA. Esta prueba permite evaluar que la cepa del virus de la gripe corresponde al lote previo al maestro recibido, y que es diferente de la cepa (mismo tipo/subtipo) de la variación antigénica anterior;
- Se identifica la secuencia de codificación del antígeno NA por RT-PCR (este método cumple con el método n.º 2.6.21 “Técnicas de amplificación de ácidos nucleicos”, Ph. Eur., edición actual) para cada WSL.
- La prueba de esterilidad bacteriana y fúngica se debe llevar a cabo con cada lote de WSL para cumplir con la monografía n.º 0158 “Vacuna antigripal (virión fraccionado, inactivado)”, Ph. Eur., edición actual.
- Los análisis de micoplasmas, realizados en cumplimiento del método n.º 2.6.7 “Micoplasmas” de la Ph. Eur., edición actual, se llevan a cabo para verificar la ausencia de micoplasmas cultivables y no cultivables en el WSL.
- La determinación del título infeccioso es una prueba adicional realizada para dar seguimiento al proceso. El título infeccioso del WSL se controla a fin de asegurar la actividad viral mínima necesaria para inocular una cantidad suficiente de huevos para preparar el DS.

<sup>1</sup> El método detallado en este capítulo podría adaptarse según las características de la cepa relevante en ese momento.





#### 4.3.3.3 Caracterización

##### Identidad del antígeno HA

La identificación del antígeno HA en el MSL y en el WSL se realiza mediante el método de inhibición de la hemaglutinación (IHA) para confirmar la identidad de la cepa del virus de la gripe que se multiplicó. También se realiza una prueba de caracterización mediante secuenciación genética de la HA para respaldar la identificación de la HA. Esta prueba permite determinar que la cepa del virus de la gripe corresponde al lote previo al maestro recibido, y que es diferente de la cepa (igual tipo/subtipo o linaje) de la variación antigénica anterior; A continuación se presenta una descripción del método.

##### Pureza, características especiales y estabilidad genética

La información sobre la fuente, la derivación y las características de las cepas virales vacunales se presenta en la sección 3.2.S.2.3 Fuente, historia y generación de la cepa viral vacunal.

Conforme a lo establecido en la Guideline on Influenza Vaccines - Quality module ([guía sobre vacunas antigripales: módulo de calidad] EMA/CHMP/BWP/310834/2012), la estabilidad genética de cada nueva cepa de virus se evaluará mediante secuenciación de los genes codificadores de HA y NA de cada lote nuevo de siembra (MSL y/o WSL) con el pre-MSL del que se obtuvieron. La secuenciación se realiza por el método de Sanger.





## 5 Control de los pasos críticos e intermedios

### 5.1 Pasos críticos

Los tres pasos siguientes de la elaboración se consideran críticos para la calidad del DS y se comentan a continuación:

- **Purificación:** Este paso es crítico para la pureza del DS. El objetivo de este paso es separar las partículas virales de las moléculas de menor peso molecular, tales como las proteínas del huevo.
- **Fraccionamiento:** Este paso, junto con el paso de inactivación, garantiza una infectividad que cumple con la prueba de virus infeccioso residual descrita en la monografía n.º 0158 "Vacuna antigripal (virión fraccionado, inactivado)", de la Ph. Eur., edición actual. El objetivo de este paso es alterar la integridad de las partículas virales sin disminuir las propiedades antigénicas de los antígenos HA y NA.
- **Inactivación:** Este paso, junto con el paso de fraccionamiento, garantiza la inactivación del virus para satisfacer la prueba de virus infecciosos residuales descrita en la monografía n.º 0158 "Vacuna antigripal (virión fraccionado, inactivado)" de la Ph. Eur., edición actual. El objetivo de este paso es modificar químicamente el virus fraccionado para así reducir su infectividad sin disminuir las propiedades antigénicas.

Estos pasos críticos se rigen por parámetros de producción, pruebas IPC y pruebas de liberación de CC (la información detallada se presenta en las secciones 3.2.S.2.2 Multiplicación y cosecha viral y 3.2.S.2.2 Elaboración del principio activo).

En la Tabla 10, se presenta un resumen de los controles establecidos para revisar los pasos críticos.



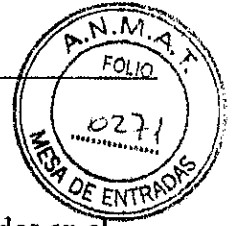


Tabla 10: IPC realizados durante el fraccionamiento e inactivación e IPC realizados en el DS

Etapa del proceso de elaboración	Prueba	Referencia del método	Criterios de aceptación
<b>Fraccionamiento</b>			
Etapa 15	Contenido de nitrógeno total	Método interno (método de Kjeldahl) basado en Ph. Eur., 2.5.9, edición actual; Ph. Eur. 2.5.33 (método 7, procedimiento A), edición actual	≤600 µg/mL
<b>Inactivación</b>			
Etapa 18	Contenido de nitrógeno total	Método interno (método de Kjeldahl) basado en Ph. Eur., 2.5.9, edición actual; Ph. Eur. 2.5.33 (método 7, procedimiento A), edición actual	≤200 µg/mL
	pH	Ph. Eur., 2.2.3, edición actual	7,2 – 7,5
<b>Principio activo</b>			
Etapa 20 (antes de una filtración esterilizante de 0,22 µm)	Carga biológica antes de la filtración	Ph. Eur. 2.6.12, edición actual	≤100 UFC/100 mL
Etapa 21	Contenido de formaldehído residual	Método interno (método colorimétrico de Nash)	≤85 µg/mL
Etapa 21	Aspecto	Ph. Eur., 2.9.20, edición actual	Líquido ligeramente blancuzco y opalescente
Etapa 21	pH	Ph. Eur., 2.2.3, edición actual	6,8-7,6.
Etapa 21	Contenido de endotoxinas	Ph. Eur. 2.6.14, edición actual	≤ 100 UI/mL

## 5.2 Productos intermedios

No existe ningún producto intermedio en el proceso de elaboración del DS.





## 6 Validación y evaluación del proceso

Se presentan los datos de validación correspondientes a los pasos de purificación, fraccionamiento e inactivación, que se consideran críticos para la calidad de la vacuna antigripal.

Las validaciones presentadas se realizaron en el DS elaborado, con un factor de dilución de 1,7 en la etapa 20 del proceso de elaboración, en el contexto de la vacuna antigripal trivalente estacional de Sanofi Pasteur, Francia, para uso intramuscular (TIV). Estas validaciones son aplicables al DS de la QIV, elaborado con un factor de dilución de 1,2 en la etapa 20, ya que la introducción del cambio del factor de dilución tiene lugar después de la purificación (etapas 10, 11, 12, 13, 14), el fraccionamiento (etapas 15, 16, 17) y la inactivación (etapas 18, 19).

En la sección 3.2.S.2.5 Validación y/o evaluación del proceso encontrará datos de validación detallados.

### 6.1 Estudios de validación del proceso de purificación

La cosecha monovalente concentrada se purifica mediante ultracentrifugación isopícnica en gradientes de sacarosa. Esta técnica permite separar las partículas virales de las moléculas de menor peso molecular (tales como la ovoalbúmina). La ovoalbúmina es la principal impureza derivada de los huevos.

Las validaciones de eliminación de ovoalbúmina, neomicina e hidrocortisona se demuestran una vez en un mínimo de 3 lotes consecutivos de una cepa y después no se llevan a cabo de nuevo para cada cepa. Esta aproximación se basa en lo siguiente:

- Los parámetros de producción de las etapas de purificación son los mismos independientemente de la cepa;
- La eficiencia del proceso de purificación se basa en un fenómeno físico que es la migración de partículas a través de un gradiente de sacarosa en función de su densidad. Ni el gradiente ni la densidad de las partículas se ven afectados por el tipo de cepas que se purifican.
- La composición del tampón del inóculo que contiene neomicina e hidrocortisona (si se añade) sigue siendo la misma, independientemente de las cepas. La capacidad del proceso para eliminar estas impurezas es la misma independientemente de la cepa.

#### 6.1.1 Eliminación de la ovoalbúmina

La evaluación de la purificación de la vacuna antigripal se llevó a cabo con tres lotes de producción de la cepa B/Malaysia/2506/2004 producida en marzo de 2006.

Con el fin de validar la eficiencia de la purificación, la ovoalbúmina (proteína del huevo) y la hemaglutinina (proteína viral) se cuantificaron en diferentes etapas (antes de la purificación, durante la purificación y después de la purificación) en lotes del principio activo de escala industrial, es decir, en las etapas 8, 10, 12, 13 y 15 según se describe en la Figura 1 y en la Figura 2.





La validación se consideraba exitosa si:

- El contenido de ovoalbúmina en la etapa 15 era inferior a 1000 ng/mL. Este criterio se definió teniendo en cuenta un límite de alerta de 100 ng/mL máximo en la etapa 21 para la ovoalbúmina y para las diferentes diluciones que se producen entre las etapas 15 y 21 del proceso de elaboración (dilución de aproximadamente 1/10).
- El contenido de ovoalbúmina no es superior a 12,5 ng/15 µg de antígeno HA medido por inmunodifusión radial simple (SRID). Este criterio se definió teniendo en cuenta el criterio de aceptación de ovoalbúmina en el producto final a granel (PFAG), que es de 100 ng/mL, es decir, 50 ng/dosis de vacuna QIV con un contenido de 15 µg de antígeno HA para cada una de las cuatro cepas.

Los resultados muestran:

- Una eliminación eficiente de ovoalbúmina durante la purificación: se demuestra una eliminación de  $100 - 0,0002 = 99,9998$  % del contenido inicial de ovoalbúmina.
- La conservación del antígeno en los pasos sucesivos de purificación: el contenido de antígeno HA en la suspensión en la etapa 15 representa el 67,8 % del contenido de HA en la etapa 8.
- El contenido de ovoalbúmina de cada lote en la etapa 15 cumple con el criterio de aceptación fijado para este estudio de validación, es decir, un contenido de ovoalbúmina  $\leq 1000$  ng/mL en la etapa 15 del proceso de elaboración.
- El contenido de ovoalbúmina por cada 15 µg de antígeno HA en la QIV para cada lote cumple con el criterio de aceptación fijado para este estudio de validación, es decir, un contenido de ovoalbúmina  $\leq 12,5$  ng/15 µg de antígeno HA en la QIV. Quedó demostrada la reproducibilidad de la depuración de ovoalbúmina.

En conclusión, el estudio de validación muestra que la ovoalbúmina se elimina de manera eficiente durante las etapas de purificación (el contenido de ovoalbúmina por lote se reduce en un 99,9998 %).

Los resultados de este estudio de validación se aplican a todas las cepas gripales.

### 6.1.2 Depuración de la neomicina

La validación de la depuración de la neomicina se llevó a cabo con 4 lotes consecutivos de DS de la cepa A/New Caledonia/20/99 producidos en enero de 2006.

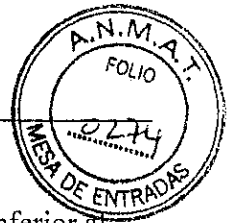
Durante el proceso de elaboración de la cosecha monovalente concentrada, el sulfato de neomicina (un antibiótico aminoglucósido) está presente en la solución tampón del inóculo utilizada para diluir el WSL (vea la Figura 1).

El objetivo de este estudio era determinar la depuración del sulfato de neomicina durante el proceso de elaboración, mediante la cuantificación de la neomicina en varias etapas de producción: etapa 3, etapa 6, etapa 8, etapa 10, etapa 12, etapa 15, etapa 18, etapa 21, según se describe en la Figura 1 y en la Figura 2.

Además, se realizó un experimento de agregado en pequeñas cantidades a fin de estimar la eliminación de neomicina de la etapa 10 en adelante.

DIRECTOR DE CONTROL DE CALIDAD  
SANOFI PASTEUR S.A.





El estudio se consideraba exitoso si el contenido de neomicina en los lotes de DS era inferior al límite de detección del método de titulación, es decir,  $<2$  UI/mL.

Teniendo en cuenta una carga de antibiótico máxima de 600  $\mu$ g de sulfato de neomicina por huevo y un volumen de cosecha máximo de 10 mL de líquido alantoideo, la concentración de sulfato de neomicina podría alcanzar teóricamente los 60  $\mu$ g/mL de líquido alantoideo en el momento de la cosecha.

El factor de eliminación de la neomicina para cada una de las etapas de elaboración evaluadas se calculó como la proporción:

$$\frac{\text{Cantidad total del antibiótico que ingresa en la etapa de elaboración}}{\text{Cantidad total del antibiótico al final de la etapa de elaboración}}$$

La cantidad de neomicina se redujo durante las etapas de elaboración evaluadas:

- por un factor de eliminación del 50--70 % entre la etapa 3 y la etapa 5 y;
- por un factor de eliminación del 96 % entre las etapas 6 y 8;
- por un factor de eliminación de 5,9  $\log_{10}$  entre las etapas 10 y 12.

Además, sobre la base de la cantidad de neomicina en la etapa 8 y del factor de depuración entre las etapas 10 y 12, se determinó un contenido medio de antibiótico residual de 2,1  $\mu$ g/dosis de DS de 15  $\mu$ g de antígeno HA en la etapa 15 del proceso. Por lo tanto, una dosis de QIV contiene un máximo de 10,1  $\mu$ g de antibiótico residual por dosis de 0,5 mL.

En conclusión, se demostró la capacidad del proceso de purificación para eliminar el sulfato de neomicina. El contenido de neomicina por lote se reduce en más del 99,9998 %.

Los resultados de este estudio se aplican a las cuatro cepas gripales.

### 6.1.3 Depuración de la hidrocortisona

#### 6.1.3.1 Validación de la depuración de la hidrocortisona

La validación de la depuración de la hidrocortisona se llevó a cabo con 4 lotes consecutivos de DS de la cepa B/Brisbane/60/2008 producidos en agosto de 2009.

Durante el proceso de elaboración de la cosecha monovalente concentrada, la hidrocortisona está presente en la solución tampón del inóculo utilizada para diluir el WSL.

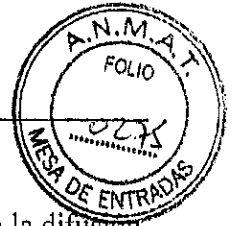
El objetivo de este estudio era determinar la depuración de la hidrocortisona durante el proceso de elaboración, mediante la cuantificación de la hidrocortisona en varias etapas de producción: etapa 3, etapa 7, etapa 8, etapas 10-13, etapas 15 y 18, etapa 21.

El estudio se consideraba exitoso si el contenido de hidrocortisona que podría estar presente en una dosis de vacuna se reducía hasta cantidades vestigiales.

La eliminación de la hidrocortisona durante la incubación de los huevos (etapa 5) se evaluó calculando la disminución de la concentración de hidrocortisona entre la etapa 3 y la etapa 7.

Los resultados muestran que durante el período que abarca la incubación de los huevos y su almacenamiento en una cámara fría, se elimina la hidrocortisona (es decir, el contenido era





inferior al límite de detección validado de 15 ppb, es decir, 15 µg/L). Esto está ligado a la difusión y absorción de la hidrocortisona en los huevos durante la incubación.

Teniendo en cuenta una carga máxima de corticoide de 5 a 6 µg de hidrocortisona por huevo y un volumen máximo de cosecha de 10 mL de líquido alantoideo, la concentración de hidrocortisona podría, en teoría, llegar a ser de hasta 600 ng/mL de líquido alantoideo al momento de la cosecha. Por lo tanto, en la hipótesis más desfavorable según la cual la concentración de hidrocortisona en la etapa 7 es de 15 ppb (igual al límite de detección del método), el factor de reducción *in ovo* de la concentración de hidrocortisona (es decir, durante el cultivo viral, etapa 5) sería  $600/15 = 40$  veces.

En conclusión, los resultados establecen que a partir de la etapa 7 del proceso de elaboración del antígeno gripal, la concentración de hidrocortisona es menor que el límite validado de detección para este estudio, es decir, <15 ppb (15 ng/mL).

Además de este estudio, como la concentración de hidrocortisona se volvió incuantificable, se realizó un experimento de agregado en pequeñas cantidades con el fin de estimar la eliminación de la hidrocortisona de la etapa 10 en adelante.

Para representar las condiciones más desfavorables, el factor de reducción se determinó considerando únicamente la fracción cosechada que no se somete a una nueva purificación. La eliminación de la hidrocortisona mediante ultracentrifugación isopícnica permite una reducción de  $7,6 \log_{10}$  (es decir,  $39,8 \times 10^6$  veces) la carga inicial de hidrocortisona.

Además, se pueden utilizar los datos objetivos combinados obtenidos para calcular la cantidad máxima teórica de hidrocortisona en la dosis de la vacuna QIV. Resultó ser de aproximadamente  $7 \times 10^{-19}$  g de hidrocortisona/µg de antígeno HA, lo que corresponde a una cantidad de hidrocortisona que no es superior a 51 ag por dosis de QIV.

En conclusión, se validó la depuración de la hidrocortisona durante el proceso de elaboración, y se demostró que las cantidades de hidrocortisona que podrían estar presentes en una dosis de QIV se reducen hasta cantidades vestigiales.

### 6.1.3.2 Validación de la ausencia de efecto de la hidrocortisona sobre los atributos críticos de calidad

A fin de demostrar que la adición de hidrocortisona al proceso de elaboración no tiene efectos sobre los atributos críticos de calidad del DS (eficacia, calidad y seguridad), se llevó a cabo una evaluación adicional para mostrar que la adición de hidrocortisona no afecta al proceso y, en particular, a las etapas de purificación. Se analizó el contenido de los siguientes elementos:

- contenido de ovoalbúmina (impureza relacionada con el producto);
- contenido de octoxinol 9 (impureza relacionada con el proceso);
- contenido de formaldehído (impureza relacionada con el proceso);
- contenido proteico total;
- Contenido de carga microbiana;
- contenido de endotoxinas.





Con este fin, se elaboraron 4 lotes de DS de B/Brisbane/60/2008 con hidrocortisona añadida al tampón del inóculo (concentración objetivo de 40 µg/mL). El contenido de ovoalbúmina, octoxinol, formaldehído, proteínas totales, endotoxinas y la carga microbiana se compararon con el contenido de impurezas de 4 DS elaborados con un proceso de elaboración sin hidrocortisona.

El estudio se consideraba exitoso si la presencia de hidrocortisona no provocaba un cambio en el perfil de impurezas responsable de incrementar el nivel de riesgo de incumplimiento de la vacuna, con respecto a la monografía 0158 de la Ph. Eur., edición actual.

La validación demostró la ausencia de efecto de la hidrocortisona sobre:

- la eliminación de ovoalbúmina y nitrógeno proteico durante el proceso de purificación;
- la eliminación de octoxinol 9;
- la media del contenido de formaldehído presente en el DS;
- la carga microbiana y el contenido de endotoxinas.

### 6.1.3.3 Conclusión

Los resultados obtenidos demuestran que el uso de hidrocortisona en el inóculo viral, a una concentración de 40 µg/mL, no tiene efecto sobre los atributos de calidad del DS.

Se validó la depuración de la hidrocortisona durante el proceso de elaboración del antígeno gripal, y se demostró que las cantidades de hidrocortisona que podrían estar presentes en una dosis de QIV se reducen hasta cantidades vestigiales.

Los resultados de estos estudios se aplican a las cuatro cepas gripales.

### 6.1.4 Conclusión general sobre el proceso de purificación

Quedó demostrada la capacidad del proceso de purificación para eliminar la neomicina, la ovoalbúmina y la hidrocortisona. Se validó el proceso de purificación.

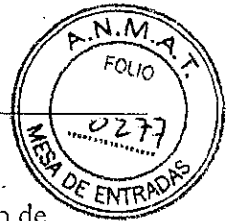
## 6.2 Estudios de validación del proceso de fraccionamiento

Se validó el proceso de fraccionamiento para las cuatro cepas gripales de la QIV con tres lotes consecutivos de DS. Este proceso se valida para cada cepa gripal con tres lotes consecutivos del DS para cada WSL nuevo utilizado.

A fin de validar la eficiencia de la operación de fraccionamiento, se evaluó el tamaño de las partículas virales gripales antes y después del fraccionamiento con octoxinol 9 mediante ultracentrifugación isopícnica de la suspensión viral en un gradiente de sacarosa. Las partículas virales migran en el gradiente hasta el lugar en el que la densidad de sacarosa es equivalente a la suya. La concentración de las partículas virales en el gradiente de sacarosa se determinó para cada fracción recolectada de sacarosa por los siguientes métodos:

- Medición de la absorbancia a 280 nm (para estimar el contenido proteico).
- Análisis del contenido de antígeno HA mediante SRID.





La validación se consideró exitosa cuando se observaron valores máximos de contenido de antígeno HA y de contenido proteico:

- en las fracciones “pesadas” (alta concentración de sacarosa, es decir, alrededor del 40 % de sacarosa) para el virus no fraccionado antes del tratamiento con octoxinol 9 (etapa 15).
- En las fracciones “livianas” (baja concentración de sacarosa, es decir, menos de aproximadamente 30 % de sacarosa) para el virus fraccionado después del tratamiento con octoxinol 9 (etapa 21).

Además, siempre debe ser posible detectar el antígeno de HA mediante SRID luego del fraccionamiento, lo cual demuestra que se conserva la antigenicidad de la proteína.

Para la cepa B/Brisbane/60/2008 (B/linaje Victoria), se utilizó un nuevo WSL FA413887 para producir el DS utilizado para validar el proceso de elaboración del DP de la QIV. Se llevó a cabo un estudio de biocomparabilidad entre este nuevo WSL y el WSL anterior (lote FA347108) y los lotes del DS obtenidos de estos WSL, que demostró que los WSL y los lotes de DS obtenidos con ambos WSL eran comparables. La validación del fraccionamiento realizada con DS obtenido del lote de WSL FA347108 es, por lo tanto, aplicable al DS obtenido del lote de WSL FA413887. Se ofrece más información en la sección 3.2.S.2.5 Validación y/o evaluación del proceso.

### Conclusión

El tratamiento con octoxinol 9 de las cepas A/California/7/2009 (NYMC X-179A) (H1N1), A/Texas/50/2012 (NYMC X-223) (H3N2), B/Brisbane/60/2008 (B/linaje Victoria) y B/Massachusetts/2/2012 (B/linaje Yamagata) provoca el fraccionamiento del virus, demostrado por un desplazamiento del pico del virus entero (muestra tomada antes del procesamiento) hacia las fracciones de menor densidad del gradiente de sacarosa correspondientes al virus fraccionado (muestra tomada después del procesamiento).

Además, se detectó el antígeno HA en las fracciones de menor densidad mediante el método de SRID, lo cual prueba que se conserva su antigenicidad tras el proceso de fraccionamiento.

El estudio de validación ha demostrado que el tratamiento con octoxinol 9 durante el proceso de elaboración del DS provoca el fraccionamiento eficiente de las cuatro cepas gripales.

Se ofrece más información en la sección 3.2.S.2.5 Validación y/o evaluación del proceso.

## 6.3 Estudios de validación del proceso de inactivación

El proceso de inactivación se validó para las cuatro cepas gripales de la QIV con tres lotes consecutivos de DS. Este proceso se valida para cada cepa gripal con tres lotes consecutivos del DS para cada WSL nuevo utilizado. Al igual que para el fraccionamiento, la validación de la inactivación para B/Brisbane/60/2008 (B/linaje Victoria) se llevó a cabo con DS del lote de WSL FA347108. El proceso de inactivación se valida para cada cepa gripal con tres lotes consecutivos del DS para cada WSL nuevo utilizado.

La inactivación del virus de la gripe es resultado de los efectos combinados y sucesivos del fraccionamiento con octoxinol 9 y el tratamiento con formaldehído. El proceso de inactivación se evaluó realizando las siguientes mediciones:





- 1) Cinética de inactivación durante el tratamiento con formaldehído [en varios momentos de medición, desde antes del tratamiento con octoxinol 9 (fin de la etapa 15) hasta  $T_0 + 25 + 24$  h (correspondiente a  $T_{25H}$  seguido por 24 h a  $+5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ )] ( $T_{25+24H}$ ). Se evaluó el título infeccioso en huevos.
- 2) Control de la inactivación (todos los momentos de medición desde  $T_0$  hasta  $T_{25+24H}$  inclusive): esta prueba consistió en dos pasajes adicionales en huevos luego de la prueba de título infeccioso; cada pasaje iba seguido de una prueba de hemaglutinación.
- 3) Análisis de formaldehído en  $T_{0+e}$ ,  $T_{25H}$  y  $T_{25+24H}$ .
- 4) Análisis de proteínas inmediatamente antes de agregar la solución de formaldehído (etapa 18).

ROXANA AGUIRREZOLONE  
DIRECTORA GENERAL  
SANOFI PASTEUR S.A.





Los criterios de aceptación del análisis son los siguientes:

- La inactivación completa debe producirse en la etapa T0 + 25 h a más tardar.
- La cinética se evaluará según los títulos infecciosos encontrados en distintas etapas: esperamos una disminución del título infeccioso hallado desde las etapas con  $\Delta DO$  de 7,5 hasta T0 + 25 h + 24 h.

### Conclusión

Durante el proceso de elaboración del DS de las cepas gripales A/California/7/2009 (NYMC X-179A) (H1N1), A/Texas/50/2012 (NYMC X-223A) (H3N2), B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria) y B/Massachusetts/2/2012 (linaje Yamagata), el virus en suspensión se fracciona primero con octoxinol 9 (etapa 16) y luego se inactiva con formaldehído (etapa 19).

Los resultados obtenidos con todos los lotes de las cuatro cepas gripales mostraron que el virus siempre estaba completamente inactivado al final del proceso de inactivación, es decir, en T<sub>25+24H</sub>. Por consiguiente, se comprobó que el proceso de fraccionamiento e inactivación era eficaz para la inactivación completa de las cuatro cepas gripales.

Se ofrece más información en la sección 3.2.S.2.5 Validación y/o evaluación del proceso.





## 7 Desarrollo del proceso de elaboración

### 7.1 Desarrollo del proceso de elaboración del principio activo

El proceso de elaboración de la QIV se desarrolló mediante el proceso de elaboración del DS antigripal utilizado para la elaboración de la TIV. Como la adición del DS de una cuarta cepa a la formulación trivalente aumenta el nivel de dilución de los otros tres DS, existe el riesgo de que una serie de lotes de DS no sean aptos para la formulación tetravalente debido a su bajo contenido de antígeno HA. El estudio de los datos históricos de producción desde 2005 hasta 2011 muestra que un 22 % de los lotes de DS de TIV no se pudieron utilizar para la formulación de una vacuna tetravalente.

La parte principal del desarrollo del proceso de elaboración se enfocó, por lo tanto, en obtener el contenido deseado de antígeno HA en el DS que permita una formulación tetravalente.

Con ese propósito, la etapa final (etapa 20) del proceso de elaboración del DS — que consiste en la dilución de la suspensión viral fraccionada e inactivada con solución PBS y posterior filtración estéril a través de una membrana filtrante de 0,22  $\mu\text{m}$ — se adaptó en comparación con el proceso de elaboración del DS de la TIV. Para la TIV, el factor de dilución se estableció en 1,7 (denominado proceso inicial). El factor de dilución se disminuyó para obtener el 100 % de los lotes de DS aptos para la producción de QIV y se estableció en 1,2 (denominado proceso final).

Inicialmente, los lotes de QIV se formularon con DS elaborado según el proceso inicial. Para obtener el contenido de HA objetivo de 15  $\mu\text{g}$  de cada cepa gripal por dosis, se seleccionaron los lotes de DS basándose en su alto contenido de antígeno HA. Los lotes correspondientes de QIV se utilizaron para los estudios de inmunogenicidad y seguridad en adultos y adultos mayores (GQM01 y GQM04); estos estudios no se consideran fundamentales para evaluar la inmunogenicidad de la QIV, aunque se toman en cuenta para la evaluación de la seguridad de la QIV.

Luego, solo se utilizaron los lotes de DS elaborados según del proceso final para los lotes de QIV que participaron en los estudios de seguridad e inmunogenicidad en niños (GQM02 y GQM09) y el nuevo estudio de seguridad e inmunogenicidad en adultos y adultos mayores (GQM11); estos estudios se consideran fundamentales para evaluar la inmunogenicidad de la QIV en niños, adultos y adultos mayores, así como para la evaluación de su seguridad. Este proceso final del DS se utilizará también para la producción de los futuros lotes comerciales de la QIV.

La derivación de los lotes de QIV producidos para los estudios clínicos y no clínicos se presenta en la Tabla 11.

