



**Tabla 6: Resultados de endotoxinas y carga microbiana en función de la duración del almacenamiento en la etapa 11**

Duración del almacenamiento	Contenido de endotoxinas (etapa 21)				Contenido de carga microbiana (etapa 17)			
	Número de lotes	Número de lotes que pasaron la prueba	Número de lotes que no pasaron la prueba	Porcentaje de lotes que pasaron la prueba	Número de lotes	Número de lotes que pasaron la prueba	Número de lotes que no pasaron la prueba	Porcentaje de lotes que pasaron la prueba
12 h	950	923	27	97,16	899	682	217	75,86
36 h	59	57	2	96,61	59	41	18	69,49
60 h	78	76	2	97,44	77	58	19	75,32
84 h	9	9	0	100,00	9	6	3	66,67

Para el contenido de endotoxinas, la frecuencia en cada clase no fue de al menos 5, por lo tanto no se puede utilizar la prueba de independencia de  $\chi^2$ . No obstante, para cada clase, la frecuencia de cumplimiento de los lotes es de al menos 96 %, por lo tanto, la duración del almacenamiento en la etapa 11 no afecta el contenido de endotoxinas en la etapa 21.

Para el contenido de carga microbiana, se realizó la prueba de  $\chi^2$  aunque la frecuencia era menor a 5 para la duración del almacenamiento de 84 horas. El estudio estadístico demostró que la duración del almacenamiento en la etapa 11 no afecta los resultados de carga microbiana en la etapa 17.

**Validación de la duración de retención en la etapa 14**

Se analizaron los resultados de las pruebas de esterilidad de 1638 lotes almacenados hasta 36 horas después de la etapa 14. Todos los lotes cumplieron las especificaciones.

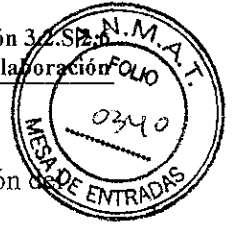
Los resultados del contenido de endotoxinas y carga microbiana en función de la duración del almacenamiento en la etapa 14 se presentan en la Tabla 7.

**Tabla 7: Resultados de contenido de endotoxinas y carga microbiana en función de la duración del almacenamiento en la etapa 14**

Duración del almacenamiento	Contenido de endotoxinas (etapa 21)				Contenido de carga microbiana (etapa 17)			
	Número de lotes	Número de lotes que pasaron la prueba	Número de lotes que no pasaron la prueba	Número de lotes que cumplieron	Número de lotes	Número de lotes que pasaron la prueba	Número de lotes que no pasaron la prueba	Número de lotes que cumplieron
<24 h	1553	1553	0	100,00	1534	1367	167	89,11
36 h	42	42	0	100,00	42	38	4	90,46

Para el contenido de endotoxinas, la frecuencia en cada clase no fue de al menos 5, por lo tanto no se puede utilizar la prueba de independencia de  $\chi^2$ . No obstante, para las dos duraciones de almacenamiento, todos los lotes cumplen, por lo tanto, la duración del almacenamiento en la etapa 14 no afecta el contenido de endotoxinas en la etapa 21.





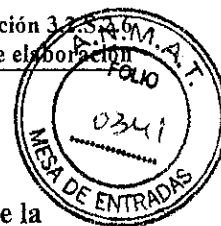
Para el contenido de carga microbiana, se realizó la prueba de  $\chi^2$  y muestra que la duración de almacenamiento en la etapa 14 no afecta la carga microbiana en la etapa 17.

**Validación de la duración de retención en la etapa 19**

Se analizaron los resultados de las pruebas de esterilidad de 1134 lotes almacenados hasta 96 horas después de la etapa 19. Todos los lotes cumplieron las especificaciones.

Los resultados del contenido de endotoxinas y carga microbiana en función de la duración del almacenamiento en la etapa 19 se presentan en la Tabla 8.





**Tabla 8: Resultados de contenido de endotoxinas y carga microbiana en función de la duración del almacenamiento en la etapa 19**

Duración del almacenamiento	Contenido de endotoxinas (etapa 21)				Contenido de carga microbiana (etapa 17)			
	Número de lotes	Número de lotes que pasaron la prueba	Número de lotes que no pasaron la prueba	Porcentaje de lotes que pasaron la prueba	Número de lotes	Número de lotes que pasaron la prueba	Número de lotes que no pasaron la prueba	Porcentaje de lotes que pasaron la prueba
24 h	438	433	5	98,86	434	418	16	96,31
36 h	244	235	9	96,31	247	244	3	98,79
60 h	154	154	0	100,00	155	147	8	94,84
84 h	235	235	0	100,00	238	235	3	98,74
96 h	17	17	0	100,00	17	17	0	100,00

Para el contenido de endotoxinas, la frecuencia en cada clase no fue de al menos 5, por lo tanto no se puede utilizar la prueba de independencia de  $\chi^2$ . No obstante, para cada clase, la frecuencia de cumplimiento de los lotes es de al menos 96 % y para la duración de hasta 60 horas la frecuencia es del 100 %, por lo tanto, la duración del almacenamiento en la etapa 19 no afecta el contenido de endotoxinas en la etapa 21.

Para el contenido de carga microbiana, la frecuencia en cada clase no fue de al menos 5, por lo tanto no se puede utilizar la prueba de independencia de  $\chi^2$ . No obstante, para cada clase, la frecuencia de cumplimiento de los lotes es de al menos 94 %, por lo tanto, la duración del almacenamiento en la etapa 19 no afecta el contenido de carga microbiana en la etapa 20.

**Conclusión**

En conclusión, la duración del almacenamiento hasta 84 horas en las etapas 9 y 11, hasta 36 horas en la etapa 14 y hasta 96 horas en la etapa 19 no afecta el parámetro bacteriológico del DS.





## Sección 3.2.S.2.5 Validación y/o evaluación del proceso

### Índice

Lista de tablas .....	3
Lista de figuras .....	5
<b>1 Panorama .....</b>	<b>6</b>
<b>2 Estudios de validación del proceso de purificación.....</b>	<b>6</b>
2.1 Eliminación de la ovoalbúmina .....	6
2.1.1 Protocolo del estudio .....	6
2.1.2 Resultados.....	7
2.1.3 Conclusiones de la eliminación de la ovoalbúmina.....	12
2.2 Eliminación de la neomicina.....	12
2.2.1 Protocolo del estudio .....	12
2.2.2 Cuantificación de la neomicina en varias etapas de producción .....	13
2.2.2.1 Etapas 4 a 6 .....	14
2.2.2.2 Etapas 6 a 8 .....	16
2.2.2.3 Etapas 10 y 12 .....	17
2.2.3 Conclusión sobre la eliminación de la neomicina .....	19
2.3 Hidrocortisona.....	20
2.3.1 Validación de la eliminación de la hidrocortisona .....	20
2.3.1.1 Protocolo del estudio.....	20
2.3.1.2 Resultados .....	21
2.3.2 Validación de la ausencia de efecto de la hidrocortisona sobre los atributos críticos de calidad.....	25
2.3.2.1 Protocolo .....	26
2.3.2.2 Resultados .....	26
2.3.2.3 Lotes de uniformidad .....	36
2.3.2.4 Conclusión sobre la validación de la ausencia de efecto de la hidrocortisona sobre los atributos críticos de calidad .....	39
2.3.3 Conclusión general .....	39
2.4 Conclusión general sobre el proceso de purificación .....	39





<b>3</b>	<b>Estudios de validación del proceso de fraccionamiento.....</b>	
3.1	Protocolo del estudio.....	39
3.2	Resultados: Cepa A/California/7/2009 (NYMC X-179A) (H1N1).....	40
3.2.1	Antes del fraccionamiento.....	40
3.2.2	Después del fraccionamiento.....	43
3.2.3	Análisis de los resultados.....	47
3.3	Resultados: Cepa A/Texas/50/2012 (NYMC X-223A) (H3N2).....	47
3.3.1	Antes del fraccionamiento.....	47
3.3.2	Después del fraccionamiento.....	50
3.3.3	Análisis de los resultados.....	54
3.4	Resultados: Cepa B/Brisbane/60/2008 (B/linaje Victoria).....	54
3.4.1	Antes del fraccionamiento.....	54
3.4.2	Después del fraccionamiento.....	57
3.4.3	Análisis de los resultados.....	61
3.5	Resultados: Cepa B/Massachusetts/2/2012 (B/linaje Yamagata).....	62
3.5.1	Antes del fraccionamiento.....	62
3.5.2	Después del fraccionamiento.....	65
3.5.3	Análisis de los resultados.....	69
3.6	Conclusiones de la validación del fraccionamiento.....	69
<b>4</b>	<b>Estudios de validación del proceso de inactivación.....</b>	<b>70</b>
4.1	Protocolo del estudio.....	70
4.2	Resultados: Cepa A/California/7/2009 (NYMC X-179A) (H1N1).....	72
4.3	Resultados: Cepa A/Texas/50/2012 (NYMC X-223A) (H3N2).....	79
4.4	Resultados: Cepa B/Brisbane/60/2008 (B/linaje Victoria).....	85
4.5	Resultados: Cepa B/Massachusetts/2/2012 (B/linaje Yamagata).....	89
4.6	Conclusiones.....	95





## Lista de tablas

Tabla 1: Resultados del análisis de antígeno HA y ovoalbúmina .....	8
Tabla 2: Evolución de las proporciones relativas de antígeno HA y ovoalbúmina durante la purificación.....	10
Tabla 3: Aceptabilidad de los resultados: contenido de ovoalbúmina en la etapa 15 .....	12
Tabla 4: Aceptabilidad de los resultados, contenido de ovoalbúmina por 15 µg de antígeno HA .	12
Tabla 5: Resultados brutos, cantidad de sulfato de neomicina en la muestra (UI/mL).....	14
Tabla 6: Eliminación de neomicina en los huevos al comienzo y al final de la incubación .....	15
Tabla 7: Eliminación de neomicina entre las etapas 6 y 8 .....	16
Tabla 8: Eliminación de la neomicina durante las etapas 10 y 12: Determinación de las cantidades de antibiótico .....	18
Tabla 9: Contenido de hidrocortisona .....	22
Tabla 10: Datos brutos, análisis de HC mediante agregado durante la purificación.....	23
Tabla 11: Masa de ovoalbúmina (g).....	28
Tabla 12: Contenido de formaldehído y octoxinol 9 (µg/mL) en el DS .....	30
Tabla 13: Masa de nitrógeno proteico (g) .....	32
Tabla 14: Etapa de DS: Volumen y contenido de antígeno HA.....	33
Tabla 15: Cepa B/Brisbane/60/2008, resultados de liberación de lotes del DS (con adición de hidrocortisona).....	37
Tabla 16: Cepa B/Brisbane/60/2008, resultados de liberación de lotes del DS (sin adición de hidrocortisona).....	38
Tabla 17: Resultados previos al fraccionamiento con octoxinol 9 (etapa 15).....	41
Tabla 18: Resultados posteriores al fraccionamiento con octoxinol 9 (etapa 21).....	44
Tabla 19: Resultados previos al fraccionamiento con octoxinol 9 (etapa 15).....	48
Tabla 20: Resultados posteriores al fraccionamiento con octoxinol 9 (etapa 21).....	51
Tabla 21: Resultados previos al fraccionamiento con octoxinol 9 (etapa 15).....	55
Tabla 22: Resultados después del fraccionamiento con octoxinol 9 (etapa 21).....	58
Tabla 23: Resumen del estudio de biocomparabilidad del lote FA347108 y del lote FA413887 de WSL.....	62
Tabla 24: Resultados previos al fraccionamiento con octoxinol 9 (etapa 15).....	63
Tabla 25: Resultados posteriores al fraccionamiento con octoxinol 9 (etapa 21).....	66





Tabla 26: Resumen de la combinación del título infeccioso, control de inactivación por dilución

Tabla 27: Cepa A/California/7/2009 (NYMC X-179A) (H1N1), validación de la inactivación, lote FA475281 ..... 73

Tabla 28: Cepa A/California/7/2009 (NYMC X-179A) (H1N1), validación de la inactivación: lote FA475282 ..... 75

Tabla 29: Cepa A/California/7/2009 (NYMC X-179A) (H1N1), validación de la inactivación, lote FA475283 ..... 77

Tabla 30: Cepa A/California/7/2009 (NYMC X-179A) (H1N1), validación de la inactivación, contenido de nitrógeno ..... 79

Tabla 31: Cepa A/Texas/50/2012 (NYMC X-223A) (H3N2); validación de la inactivación, lote FA493930 ..... 80

Tabla 32: Cepa A/Texas/50/2012 (NYMC X-223A) (H3N2); validación de la inactivación, lote FA493931 ..... 82

Tabla 33: Cepa A/Texas/50/2012 (NYMC X-223A) (H3N2); validación de la inactivación, lote FA493932 ..... 84

Tabla 34: Cepa A/Texas/50/2012 (NYMC X-223A) (H3N2), validación de la inactivación; contenido de nitrógeno ..... 85

Tabla 35: Cepa B/Brisbane/60/2008 (B/linaje Victoria), validación de la inactivación, lote FA371849 ..... 86

Tabla 36: Cepa B/Brisbane/60/2008 (B/linaje Victoria), validación de la inactivación, lote FA371850 ..... 87

Tabla 37: Cepa B/Brisbane/60/2008 (B/linaje Victoria), validación de la inactivación, lote FA371851 ..... 88

Tabla 38: Cepa B/Brisbane/60/2008 (B/linaje Victoria), validación de la inactivación, contenido proteico expresado en nitrógeno total ..... 89

Tabla 39: Cepa B/Massachusetts/2/2012 (B/linaje Yamagata), validación de la inactivación; lote FA492911 ..... 90

Tabla 40: Cepa B/Massachusetts/2/2012 (B/linaje Yamagata), validación de la inactivación; lote FA492912 ..... 92

Tabla 41: Cepa B/Massachusetts/2/2012 (B/linaje Yamagata), validación de la inactivación; lote FA492913 ..... 93

Tabla 42: Cepa B/Massachusetts/2/2012 (B/linaje Yamagata), validación de la inactivación; contenido de nitrógeno ..... 95

ROXANA MONTEMILONE  
DIRECTORA TÉCNICA  
APODERADA  
SANOFI PASTEUR S. A.

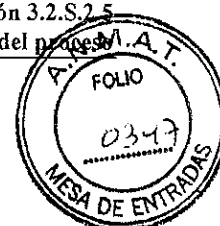




## Lista de figuras

Figura 1: Histograma de la media de los resultados del análisis de contenido de antígeno HA y ovoalbúmina .....	9
Figura 2: Comparación de las masas relativas de antígeno HA y ovoalbúmina durante la purificación.....	11
Figura 3: Contenido de neomicina en los huevos al comienzo y al final de la incubación.....	15
Figura 4: Contenido de neomicina en el lote durante las etapas de producción 6 y 8.....	16
Figura 5: Resultados de la eliminación obtenidos durante las etapas de purificación .....	25
Figura 6: Eliminación de masa de ovoalbúmina (g) durante los pasos del proceso.....	27
Figura 7: Análisis de octoxinol 9 (µg/mL) en el DS .....	29
Figura 8: Análisis de formaldehído en el DS .....	30
Figura 9: Cambio en la masa (g) de nitrógeno durante el proceso.....	33
Figura 10: Carga microbiana en la etapa 8 del proceso del DS.....	34
Figura 11: Carga microbiana en la etapa 17 del proceso del DS.....	35
Figura 12: Endotoxinas en la etapa 15 del proceso del DS .....	35
Figura 13: Medición de la DO antes del fraccionamiento (etapa 15).....	42
Figura 14: Contenido de antígeno HA antes del fraccionamiento (etapa 15) .....	43
Figura 15: Medición de la DO después del fraccionamiento (etapa 21) .....	45
Figura 16: Contenido de antígeno HA después del fraccionamiento (etapa 21).....	46
Figura 17: Medición de la DO antes del fraccionamiento (etapa 15).....	49
Figura 18: Contenido de antígeno HA antes del fraccionamiento (etapa 15) .....	50
Figura 19: Medición de la DO después del fraccionamiento (etapa 21) .....	52
Figura 20: Contenido de antígeno HA después del fraccionamiento (etapa 21).....	53
Figura 21: Medición de la DO antes del fraccionamiento (etapa 15).....	56
Figura 22: Contenido de antígeno HA antes del fraccionamiento (etapa 15) .....	57
Figura 23: DO después del fraccionamiento (etapa 21) .....	59
Figura 24: Contenido de antígeno HA después del fraccionamiento (etapa 21).....	60
Figura 25: Medición de la DO antes del fraccionamiento (etapa 15).....	64
Figura 26: Contenido de antígeno HA antes del fraccionamiento (etapa 15) .....	65
Figura 27: Medición de la DO después del fraccionamiento (etapa 21) .....	67
Figura 28: Contenido de antígeno HA después del fraccionamiento (etapa 21).....	68





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

## 1 Panorama

A continuación 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 (vea la sección 3.2.S.2.4 Controles de los pasos críticos e intermedios).

Las validaciones que se presentan a continuación se realizaron con el principio activo (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 vacuna antigripal tetravalente (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).

## 2 Estudios de validación del proceso de purificación

La cosecha monovalente concentrada se purifica mediante ultracentrifugación isopéptica 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:

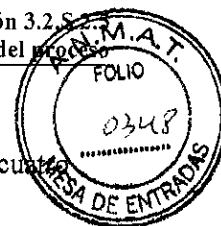
- Los parámetros de producción de las etapas de purificación son los mismos independientemente de la cepa;
- La eficiencia del proceso de purificación se basa en un fenómeno físico que es la migración de partículas a través de un gradiente de sacarosa en función de su densidad. Ni el gradiente ni la 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.

### 2.1 Eliminación de la ovoalbúmina

#### 2.1.1 Protocolo del estudio

El estudio de validación de la eliminación de ovoalbúmina se lleva a cabo con un mínimo de 3 lotes consecutivos de una cepa gripal. Como se ha presentado en la introducción de la





validación del proceso de purificación, los resultados de este estudio son aplicables a las cuatro cepas gripales presentadas en la QIV.

Con el fin de validar la eficiencia de la purificación, la ovoalbúmina (proteína del huevo) y el antígeno hemaglutinina (HA) (proteína viral) se cuantifican en diferentes etapas (antes de la purificación, durante la purificación y después de la purificación) en lotes del DS de escala industrial:

- Etapa 8: Concentración de la cosecha monovalente.
- Etapa 10: Recolección de las fracciones de interés de la primera ultracentrifugación isopénica (50-28 % de sacarosa).
- Etapa 12: Recolección de las fracciones de interés de la segunda ultracentrifugación isopénica (50-35 % de sacarosa y 35-22 % de sacarosa).
- Etapa 13: Recolección de las fracciones de interés de la tercera ultracentrifugación isopénica (50-35 % de sacarosa).
- Etapa 15: Cosecha purificada y diluida, estandarizada a un delta ( $\Delta$ ) de densidad óptica (DO) de la suspensión viral  $\approx 7,5$ .

Un panorama de la purificación se presenta en la sección 3.2.S.2.2 Elaboración del principio activo.

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  $\mu$ g 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  $\mu$ g de antígeno HA para cada una de las cuatro cepas.

### 2.1.2 Resultados

La evaluación de la purificación de la vacuna antigripal se llevó a cabo con los lotes de producción FA237532, FA237534 y FA237535 de la cepa B/Malaysia/2506/2004 producida en marzo de 2006. Los resultados (vea la Tabla 1) se expresan como masa total (mg) del compuesto en la muestra analizada. Cabe destacar que los volúmenes tomados para muestra eran diferentes para cada fracción, lo que significa que no se pueden comparar las masas totales entre las diferentes fracciones. No obstante, cada muestra se emplea para el análisis de ovoalbúmina y antígeno HA; por lo tanto, los resultados se pueden utilizar para comparar las proporciones de antígeno HA/ovoalbúmina entre las distintas fracciones (vea la Tabla 2 y la Figura 2).





**Tabla 1: Resultados del análisis de antígeno HA y ovoalbúmina**

Fracción	Proteína analizada	FA237532 (mg en el volumen de muestra)	FA237534 (mg en el volumen de muestra)	FA237535 (mg en el volumen de muestra)	Media (mg)
Concentración de la cosecha monovalente (etapa 8)	Antígeno HA	38 475,0	29 625,7	22 489,6	30 196,77
	Ovoalbúmina	1 347 480,0	1 123 673,0	1 832 551,0	1 434 568,00
50-28 % de sacarosa de la primera ultracentrifugación isopícnica (etapa 10)	Antígeno HA	3669,1	2974,1	2418,6	3020,61
	Ovoalbúmina	121,0	87,5	200,2	136,21
50-35 % de sacarosa de la segunda ultracentrifugación isopícnica (etapa 12)	Antígeno HA	8372,9	8414,6	7308,2	8031,91
	Ovoalbúmina	1,0	0,9	5,2	2,37
35-22 % de sacarosa de la segunda ultracentrifugación isopícnica (etapa 12)	Antígeno HA	559,3	379,4	180,0	372,88
	Ovoalbúmina	2,1	3,5	1,1	2,25
50-35 % de sacarosa de la tercera ultracentrifugación isopícnica (etapa 13)	Antígeno HA	412,0	561,4	403,6	458,98
	Ovoalbúmina	0,2	0,3	0,3	0,29
Agrupación de 50-35 % de sacarosa de la segunda ultracentrifugación isopícnica y 50-35 % de sacarosa de la tercera ultracentrifugación isopícnica (etapa 14)	Antígeno HA	18 943,3	22 836,1	20 744,7	20 841,36
	Ovoalbúmina	4,0	2,6	3,4	3,31
Dilución de la cosecha para $\Delta DO \approx 7,5$ (etapa 15)	Antígeno HA	24 658,8	19 441,4	17 346,1	20 482,08
	Ovoalbúmina	3,2	2,4	2,8	2,80

Las medias de los resultados del análisis de contenido de antígeno HA y ovoalbúmina (vea la Tabla 1) por fracción analizada se ilustran en la Figura 1.



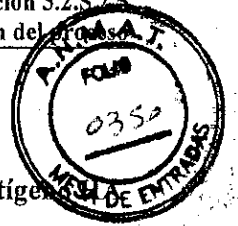
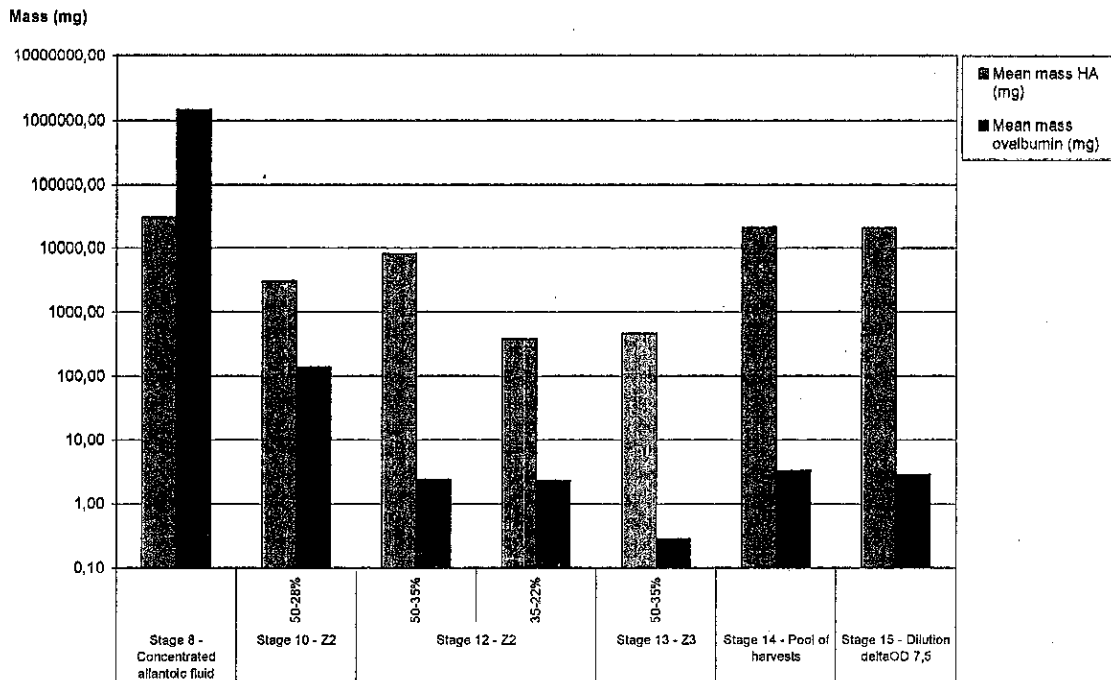


Figura 1: Histograma de la media de los resultados del análisis de contenido de antígeno HA y ovoalbúmina<sup>a</sup>



Estos resultados muestran lo siguiente:

- Una eliminación eficiente de ovoalbúmina durante la purificación: el contenido de ovoalbúmina en la suspensión en la etapa 15 representa el 0,0002 % ( $= 100 \times (2,80/1434568,00)$ ) del contenido de ovoalbúmina en la etapa 8. Esto 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.

En la Tabla 2 y en la Figura 2 se muestra la proporción relativa de antígeno HA respecto de la ovoalbúmina en las fracciones de interés.

<sup>a</sup> De las diferentes fracciones cosechadas durante la purificación (etapas 10, 12 y 13), se muestran solamente las fracciones de interés.



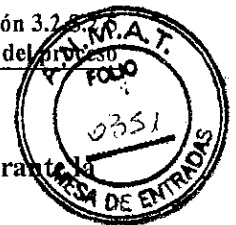


Tabla 2: Evolución de las proporciones relativas de antígeno HA y ovoalbúmina durante la purificación

Etapa	Media del contenido de antígeno HA (mg) A	Media del contenido de ovoalbúmina (mg) B	Proporción relativa de antígeno HA (%) = A/(A+B)	Proporción relativa de ovoalbúmina (%) = B/(A+B)
Cosecha concentrada (etapa 8)	30 196,77	1 434 568,00	2,06	97,94
50-28 % de sacarosa de la primera ultracentrifugación isopícnica (etapa 10)	3020,61	136,21	95,69	4,31
50-35 % de sacarosa de la segunda ultracentrifugación isopícnica (etapa 12)	8031,91	2,37	99,97	0,03
50-35 % de sacarosa de la tercera ultracentrifugación isopícnica (etapa 13)	458,98	0,29	99,94	0,06
Agrupación de 50-35 % de sacarosa de la segunda y tercera ultracentrifugación isopícnica (etapa 14)	20 841,36	3,31	99,98	0,02
ADO ≈ 7,5 (etapa 15)	20 482,08	2,80	99,99	0,01



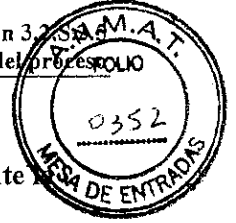
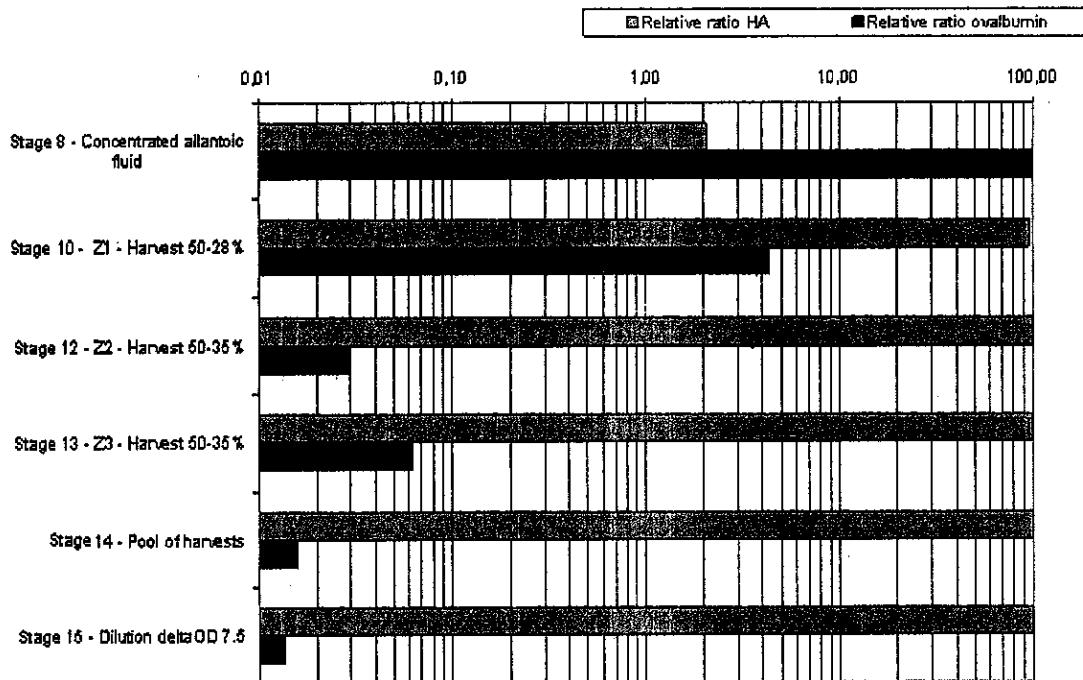


Figura 2: Comparación de las masas relativas de antígeno HA y ovoalbúmina durante purificación



Estos datos muestran lo siguiente:

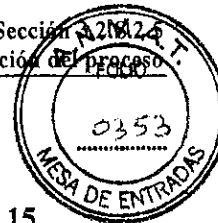
- En la etapa 8, el contenido de antígeno HA representa solo el 2 % del contenido de antígeno HA + ovoalbúmina combinadas (ovoalbúmina: 98 %).
- En la fracción de interés al final de la etapa 10 (50-28 % de sacarosa), el contenido de antígeno HA representa aproximadamente el 96 % del contenido de antígeno HA + ovoalbúmina combinadas (ovoalbúmina: 4%).
- Desde la fracción de interés al final de la etapa 12 (50-35 % de sacarosa) en adelante, el contenido de antígeno HA representa más del 99,98 % del contenido de HA + ovoalbúmina combinadas (ovoalbúmina: menos del 0,02 %).

Estos resultados demuestran la eficiencia del proceso de purificación para eliminar la ovoalbúmina.

Por último, se evaluó si estos resultados cumplían el criterio de aceptación.

En la Tabla 3 se muestra el contenido de ovoalbúmina de cada lote en la etapa 15 del proceso de elaboración.





**Tabla 3: Aceptabilidad de los resultados: contenido de ovoalbúmina en la etapa 15**

Criterio de aceptación	Contenido de ovoalbúmina (ng/mL)		
	FA237532	FA237534	FA237535
≤1000 ng/mL	140	140	170

Estos resultados cumplen el criterio de aceptación establecido para este estudio de validación, es decir, un contenido de ovoalbúmina ≤1000 ng/mL en la etapa 15 del proceso de elaboración.

La Tabla 4 muestra el contenido de ovoalbúmina por 15 µg de contenido de antígeno HA en la vacuna QIV para cada lote.

**Tabla 4: Aceptabilidad de los resultados, contenido de ovoalbúmina por 15 µg de antígeno HA**

Criterio de aceptación	Contenido de ovoalbúmina (ng/15 µg de antígeno HA)		
	FA237532	FA237534	FA237535
≤12,5 ng/15 µg de antígeno HA en la vacuna QIV	1,92	1,86	2,45

Estos resultados cumplen el criterio de aceptación establecido para este estudio de validación, es decir, un contenido de ovoalbúmina ≤12,5 ng/15 µg de antígeno HA en la QIV.

Quedó demostrada la reproducibilidad de la eliminación de ovoalbúmina.

### 2.1.3 Conclusiones de la eliminación de la ovoalbúmina

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 %).

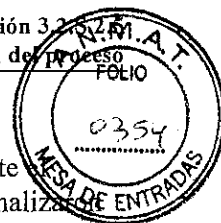
## 2.2 Eliminación de la neomicina

### 2.2.1 Protocolo del estudio

El estudio de validación de la eliminación de la neomicina se lleva a cabo con un mínimo de 3 lotes consecutivos de una cepa gripal. Como se ha presentado en la introducción de la validación del proceso de purificación, los resultados de este estudio son aplicables a las cuatro cepas gripales presentadas en la QIV.

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 sección 3.2.S.2.2 Multiplicación y cosecha viral para obtener más detalles).





El objetivo de este estudio era determinar la eliminación del sulfato de neomicina durante el proceso de elaboración cuantificando la neomicina en varias etapas de producción. Se analizaron cuatro lotes en las siguientes etapas de producción:

- Etapa 3: Preparación del inóculo.
- Etapa 6: Líquido alantoideo crudo sin citrato.
- Etapa 8: Concentración mediante ultrafiltración.
- Etapa 10: Fracciones agrupadas después de la primera centrifugación isopícnica.
- Etapa 12: Fracciones agrupadas después de la segunda centrifugación isopícnica.
- Etapa 15: Dilución para  $\Delta DO \approx 7,5$ .
- Etapa 18: Dilución para  $\Delta DO \approx 2,5$ .
- Etapa 21: Etapa de DS.

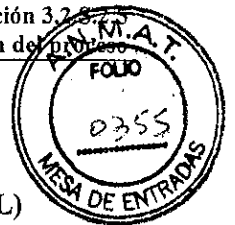
Además, se realizó un experimento de agregado en pequeñas cantidades a fin de estimar la eliminación de neomicina de la etapa 10 en adelante.

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.

### 2.2.2 Cuantificación de la neomicina en varias etapas de producción

La validación de la eliminación de la neomicina se llevó a cabo con 4 lotes consecutivos de DS de la cepa A/New Caledonia/20/99 (lotes FA229683, FA229684, FA229685 y FA229686) producidos en enero de 2006. Los resultados brutos se presentan en la Tabla 5.





**Tabla 5: Resultados brutos, cantidad de sulfato de neomicina en la muestra (UI/mL)**

	FA229683	FA229684	FA229685	FA229686
Etapa 3: preparación del inóculo.	2944 ± 202	3122 ± 240	2874 ± 50	2905 ± 99
Etapa 6: líquido alantoideo crudo.	17,4 ± 1,8	16,1 ± 1,4	14,4 ± 1,0	14,9 ± 1,2
Etapa 8: líquido alantoideo concentrado.	9,37 ± 1,32	9,80 ± 0,93	10,8 ± 0,3	7,80 ± 0,51
Etapa 10: fracciones agrupadas después de la primera centrifugación isopícnica.	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5
Etapa 12: fracciones agrupadas después de la segunda centrifugación isopícnica.	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5
Etapa 15: dilución para ΔDO ≈ 7,5.	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5
Etapa 18: dilución para ΔDO ≈ 2,5.	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5
Etapa 21: DS	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5

A fin de determinar la eficacia de la eliminación del antibiótico durante el proceso del DS, hay que transformar los resultados expresados en unidades internacionales (UI/mL) en masa de antibiótico (en unidades de masa: g, µg) en cada paso.

Se utiliza la siguiente fórmula para convertir unidades internacionales en unidades de masa:

$$M = \frac{IU}{k}$$

Donde:

- M es la masa expresada en mg de antibiótico.
- UI es la cantidad de antibiótico en unidades internacionales.
- k es el factor de conversión;  $k \geq 680$  UI/mg (fuente: Ph. Ph. Eur. 5.0). Por lo tanto, a k se le asignó el valor mínimo de 680 UI/mg.

#### 2.2.2.1 Etapas 4 a 6

La eliminación del antibiótico durante la incubación de los huevos (etapa 5) se evaluó calculando la disminución del contenido de neomicina por huevo entre la etapa 4 (inoculación de 120 µL a 150 µL de tampón con inóculo por huevo, correspondientes a entre 480 µg y 600 µg de antibiótico) y la etapa 6 (cosecha del líquido alantoideo). La eliminación de neomicina en los huevos al comienzo y al final de la incubación se presenta en la Tabla 6.





Tabla 6: Eliminación de neomicina en los huevos al comienzo y al final de la incubación

	FA229683	FA229684	FA229685	FA229686
Número exacto de huevos inoculados	268 794	262 487	261 042	217 677
Volumen medio inoculado por huevo (mL)	0,133	0,133	0,133	0,134
Contenido de neomicina en el tampón del inóculo (µg/mL)	4329,4	4591,2	4226,5	4272,1
Cantidad media de neomicina añadida a un huevo (µg)	577,4	610,4	561,8	574,1
Número exacto de huevos cosechados	254 358	245 747	240 126	205 581
Cantidad total de neomicina en la cosecha de líquido alantoideo (µg)	65 377 941,2	41 149 705,9	65 181 176,5	60 169 705,9
Cantidad media de neomicina residual en un huevo cosechado (µg)	257,0	167,4	271,4	292,7
Rendimiento de la eliminación en el huevo (%)	55,5	72,6	51,7	49,0

Estos resultados ilustrados en la Figura 3 muestran que durante el período comprendido entre la incubación de los huevos y su almacenamiento en una cámara frigorífica se elimina entre el 49,0 % y el 72,6 % de la neomicina. Esto está ligado a la difusión y degradación de la neomicina en los huevos durante la incubación.

Figura 3: Contenido de neomicina en los huevos al comienzo y al final de la incubación

