

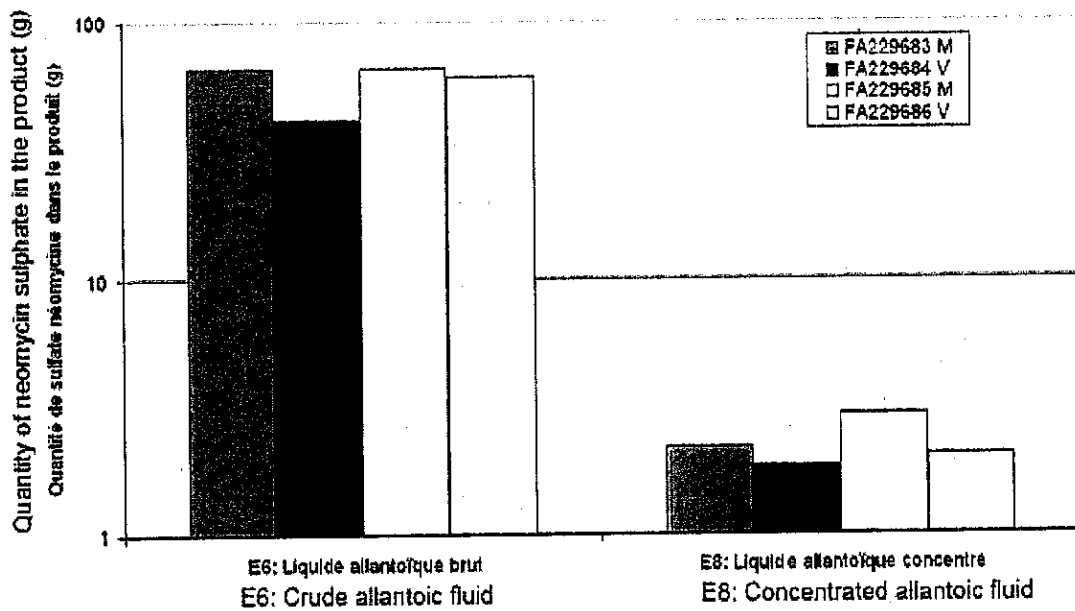
2.2.2.2 Etapas 6 a 8

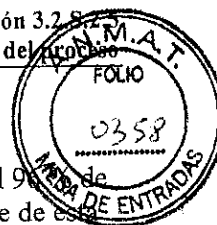
La eliminación de la neomicina durante las etapas 6, 7 y 8 se evaluó calculando la disminución del contenido de neomicina entre la etapa 6 (líquido alantoideo crudo) y la etapa 8 (líquido alantoideo concentrado). Los resultados detallados en la Tabla 7 se ilustran en la Figura 4.

Tabla 7: Eliminación de neomicina entre las etapas 6 y 8

		Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4
Etapa 6	Cantidad de neomicina (UI/mL)	17,4	16,1	14,4	14,9
	Volumen (mL)	2 550 000	1 738 000	3 078 000	2 746 000
	Cantidad total de neomicina (g)	65,38	41,15	65,18	60,17
Etapa 8	Cantidad de neomicina (UI/mL)	9,37	9,80	10,80	7,80
	Volumen (mL)	156 400	126 500	183 700	175 300
	Cantidad total de neomicina (g)	2,15	1,82	2,92	2,01
Rendimiento de la eliminación entre las etapas 6 y 8		96,7	95,6	95,5	96,6

Figura 4: Contenido de neomicina en el lote durante las etapas de producción 6 y 8





Entre las etapas de producción 6 y 8 del proceso de elaboración, se elimina alrededor del 96% de la neomicina. Los siguientes argumentos señalan cuál es la etapa del proceso responsable de esta eliminación:

- Durante la cosecha (etapa 6), el líquido alantoideo se diluye con tampón de citrato trisódico, lo que reduce la concentración de neomicina en el líquido (aunque sin cambiar la cantidad total).
- Durante la etapa 7, el líquido diluido se clarifica mediante centrifugación para eliminar residuos, células, etc., que provienen del huevo. Este proceso no elimina la neomicina, que está disuelta en el líquido.
- Durante la etapa 8, el líquido clarificado se concentra aproximadamente 20 veces mediante ultrafiltración (corte de la membrana: 300 kDa). Dado que el peso molecular del antibiótico es de 0,7 kDa, pasa fácilmente a través de la membrana en el ultrafiltrado. Así, la etapa 8 es la operación que provoca una reducción de la masa de neomicina en el producto de aproximadamente un 96 %.

2.2.2.3 Etapas 10 y 12

Desde la etapa 10 en adelante (cosechas de la primera ultracentrifugación isopícnica), se observó que la cantidad residual de neomicina se hallaba, de manera uniforme, por debajo del límite de detección en todas las muestras analizadas hasta la última etapa 21 (correspondiente al DS).

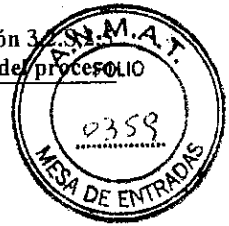
Se realizó un experimento de agregado en pequeñas cantidades a fin de estimar la eliminación de neomicina de la etapa 10 en adelante.

Con este fin, se disolvieron 2000 g de sulfato de neomicina en 100 litros de citrato trisódico 0,125 M, lo que produjo una concentración de 20 mg/mL. Los 100 litros se dividieron en cuatro alcuotas de 25 litros. Cada fracción se sometió al mismo proceso de purificación utilizado durante la primera ultracentrifugación isopícnica de rutina de la elaboración de la vacuna antigripal. Se recolectaron las siguientes muestras:

- Control negativo: tampón de citrato trisódico antes de la adición de sulfato de neomicina.
- Control positivo: tampón de citrato trisódico después de la adición de sulfato de neomicina y antes de la ultracentrifugación isopícnica (es decir, la solución que se va a purificar).
- Agrupación de la fracción con un contenido de sacarosa >50 %.
- Agrupación de la fracción con un contenido de sacarosa del 50 % al 28 %.
- Agrupación de la fracción con un contenido de sacarosa <28 %.
- Agrupación de efluentes (líquido recolectado eluido del gradiente).

La agrupación de las fracciones de 50-28 % se diluyó hasta un volumen final de 25 litros con solución PBS. Cada fracción se sometió al mismo proceso de purificación utilizado durante la segunda ultracentrifugación isopícnica de rutina. Se recolectaron las siguientes muestras:

- Control positivo: agrupación de las fracciones de 50-28 % diluida con PBS antes de la segunda ultracentrifugación isopícnica.



- Agrupación de la fracción con un contenido de sacarosa >50 %.
- Agrupación de la fracción con un contenido de sacarosa del 50 % al 35%.
- Agrupación de la fracción con un contenido de sacarosa del 35% al 22%.
- Agrupación de la fracción con un contenido de sacarosa <22%.
- Agrupación de efluentes (líquido recolectado eluido del gradiente).

El citrato trisódico 0,125 M no contenía una cantidad de sulfato de neomicina superior al límite de detección del método de titulación. En la Tabla 8 se informan los resultados del análisis de neomicina de las distintas muestras.

Tabla 8: Eliminación de la neomicina durante las etapas 10 y 12: Determinación de las cantidades de antibiótico

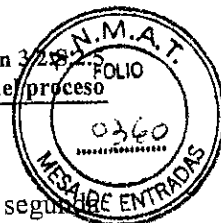
Etapas de purificación	Producto	Contenido de sulfato de neomicina (mg)
Primera ultracentrifugación isopícnica	Carga inicial total	1 847 500*
	Agrupación de los efluentes	1 874 257
	Agrupación de las fracciones <28 %	69 954
	Agrupación de las fracciones de 50-28 %	2902
	Agrupación de las fracciones >50 %	95
Segunda ultracentrifugación isopícnica	Carga inicial	3419
	Agrupación de los efluentes	3255
	Agrupación de las fracciones <22 %	111
	Agrupación de las fracciones de 35-22 %	15
	Agrupación de las fracciones de 50-35 %	2
	Agrupación de las fracciones >50 %	1

* La cantidad de antibiótico añadida inicialmente al tampón de citrato (2 000 000 mg) se comparó con la cantidad de antibiótico determinada en el mismo tampón mediante un análisis con *Bacillus subtilis*. Se determinó una recuperación del 92 % ($= 100 \times (1\,847\,500/2\,000\,000)$).

Los cálculos de equilibrio de masa para cada ciclo de purificación demostraron niveles de recuperación del 105 % y del 99 % en la primera y en la segunda ultracentrifugación isopícnica, respectivamente.

Los resultados muestran que la neomicina se recupera predominantemente en los efluentes y en las fracciones de baja concentración de sacarosa:

- Los efluentes de la primera y de la segunda ultracentrifugación isopícnica (etapas 10 y 12 del proceso de elaboración) contenían 101 % y 95 %, respectivamente, de la carga de neomicina al comienzo de cada ciclo de ultracentrifugación isopícnica. El resultado de 101 % se puede explicar debido a pequeños errores analíticos y aproximaciones durante los cálculos.
- El contenido de neomicina medido en las fracciones de interés cosechadas durante la primera ultracentrifugación isopícnica (que contienen el virus: 50--28 % de sacarosa) representaba el 0,16 % de la carga total al comienzo de la ultracentrifugación isopícnica.



- El contenido de neomicina medido en las fracciones de interés cosechadas durante la segunda ultracentrifugación isopícnica (que contienen el virus: 50--35 % de sacarosa) representaba el 0,06 % de la carga total al comienzo de la segunda ultracentrifugación isopícnica.
- El contenido de neomicina medido en las fracciones que serán purificadas adicionalmente durante un tercer paso de ultracentrifugación isopícnica (es decir, 35-22 % de sacarosa, cosechada durante la segunda ultracentrifugación isopícnica) representaba el 0,4 % de la carga total al comienzo de la segunda ultracentrifugación isopícnica.

La diferencia en el contenido de neomicina residual relativo presente en las fracciones de interés entre la primera y la segunda ultracentrifugación isopícnica (0,16 % y 0,06 % de la carga inicial, respectivamente) se explica por el hecho de que el rango de la cosecha de la segunda ultracentrifugación isopícnica es más acotado que el rango de la cosecha de la primera ultracentrifugación isopícnica (50-35 % de sacarosa y 50-28 % de sacarosa, respectivamente).

En las condiciones de la prueba (una matriz de citrato trisódico 0,125 M con una concentración de sulfato de neomicina de 20 mg/mL), se puede calcular un factor de eliminación total del antibiótico de la "primera y segunda ultracentrifugaciones isopínicas" de la siguiente manera:

$$\begin{aligned} \text{Factor de eliminación} &= \frac{\text{Carga de antibiótico al comienzo del proceso de purificación}}{\text{Carga de antibiótico en la cosecha de la 2.ª ultracentrifugación isopícnica}} \\ & \quad (35-50 \%) \\ &= \frac{1\,256\,300\,000 \text{ UI}}{1\,480 \text{ UI}} \end{aligned}$$

Factor de eliminación "de la primera y de la segunda ultracentrifugación isopícnica" = $8,49 \times 10^5 = 5,9 \log_{10}$

El contenido máximo de neomicina en el líquido alantoideo al momento de la cosecha (etapa 6) es de 60 µg/mL (en el caso más desfavorable; es decir, si no se eliminara la neomicina durante las etapas de elaboración anteriores). El factor de eliminación calculado lleva este contenido de 60 µg/mL en la etapa 6 a 71 pg/mL en la suspensión viral purificada en la etapa 14. Este último valor es inferior al límite de detección del método de titulación (método oficial descrito en el método n.º 2.7.2 "Análisis microbiológico de los antibióticos" de la Ph. Eur., edición actual). El estudio es aceptable.

2.2.3 Conclusión sobre la eliminación de la neomicina

Teniendo en cuenta una carga de antibiótico máxima de 600 µg 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 µg/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, con base en la cantidad de neomicina en la etapa 8 y el factor de eliminación entre las etapas 10 y 12, se determinó un contenido medio de antibiótico residual de 2,1 picogramos por dosis de DS de 15 μg de antígeno HA en la etapa 15 del proceso. Por lo tanto, una dosis de QIV contiene un máximo de 10,1 pg 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 %.

2.3 Hidrocortisona

2.3.1 Validación de la eliminación de la hidrocortisona

2.3.1.1 Protocolo del estudio

El estudio de validación de la eliminación de la hidrocortisona 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.

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 (vea la sección 3.2.S.2.2 Multiplicación y cosecha viral para obtener más datos).

La finalidad de este estudio consistía en determinar la eliminación de la hidrocortisona durante el proceso de elaboración, mediante su cuantificación en varias etapas de producción. Se analizaron cuatro lotes en las siguientes etapas de producción:

- Etapa 3: Preparación del inóculo con el lote de siembra de trabajo (WSL).
- Etapa 7: Clarificación mediante centrifugado y filtración.
- Etapa 8: Concentración por ultracentrifugación.
- Etapas 10 a 13: Etapas de purificación.
- Etapas 15 y 18: Estandarización a un ΔDO .
- Etapa 21: Etapa de DS.

Además de este estudio, como la concentración de hidrocortisona no se podía cuantificar, se llevó a cabo un experimento de agregado para estimar la eliminación de la hidrocortisona en cada paso del proceso de purificación (etapas 10 a 12 y 13). Este experimento se realizó con medios de simulación. Con este fin, se disolvieron 50 g de hidrocortisona en 400 litros de solución PBS, con lo que se obtuvo una concentración de 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$, que corresponde a 3 veces la concentración de hidrocortisona en el tampón del inóculo.



Las fracciones del medio de simulación se sometieron al mismo proceso de purificación empleado durante la elaboración de rutina de la vacuna antigripal. Se tomaron muestras de las siguientes fracciones durante cada ultracentrifugación isopícnica:

- Solución de simulación que se iba a purificar (= producto de entrada).
- Agrupación de las fracciones pesadas del gradiente que por lo general se descartan (sacarosa > 50 %).
- Agrupación de fracciones cosechadas, según la etapa:
 - 50-28 % para la primera ultracentrifugación isopícnica (Z1).
 - 50-35 % y 35-22 % para la segunda ultracentrifugación isopícnica (Z2).
 - 50-35 % para la tercera ultracentrifugación isopícnica (Z3).
- Agrupación de las fracciones livianas del gradiente que por lo general se descartan (<22, 28 o 35 % de sacarosa, según el ciclo).
- Los efluentes (líquido recolectado eluido del gradiente).

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

2.3.1.2 Resultados

La validación de la eliminación 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: lotes FA357981, FA357982, FA357983 y FA357984.

2.3.1.2.1 Cuantificación de la hidrocortisona durante la incubación y la clarificación (etapas 3 a 7)

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 (inoculación de 120 µL a 150 µL de tampón del inóculo por huevo, correspondiente a entre 5 µg y 6 µg de hidrocortisona por huevo) y la etapa 7 (clarificación del líquido alantoideo).

Los resultados del análisis en la etapa 7 del proceso mostraron que, a partir de esta etapa, el contenido de hidrocortisona era menor que el límite de detección validado de 15 ppb, es decir, 15 µg/L. Esta etapa se encuentra muy cerca del principio del proceso de elaboración del antígeno, dado que constituye la primera etapa de la fase previa a la purificación.

Por este motivo, no se ha realizado una cuantificación de la hidrocortisona más adelante.

Los resultados correspondientes se presentan en la Tabla 9.

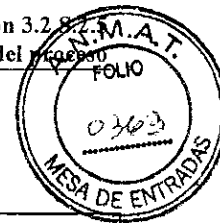


Tabla 9: Contenido de hidrocortisona

Etapa	Concentración de hidrocortisona			
	FA357981	FA357982	FA357983	FA357984
tampón con inóculo	31 µg/mL (= ppm)			
Etapa 3: Inoculación	32,5 µg/mL (= ppm)	31,3 µg/mL (= ppm)	32 µg/mL (= ppm)	31 µg/mL (= ppm)
Etapa 7: Clarificación	<15 µg/L (= ppb)	<15 µg/L (= ppb)	<15 µg/L (= ppb)	<15 µg/L (= ppb)

Estos resultados muestran que durante el período comprendido entre la incubación de los huevos y su almacenamiento en una cámara frigorífica, se elimina la hidrocortisona. 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).

2.3.1.2.2 Eliminación de la hidrocortisona durante el proceso de purificación (etapas 10 a 13)

Se realizó un experimento de agregado a fin de estimar la eliminación de la hidrocortisona de la etapa 10 en adelante.

Este experimento se llevó a cabo con un medio de simulación en el que la concentración de hidrocortisona de 125 µg/mL era mucho mayor que la concentración evaluada en el líquido alantoideo (3 veces).

Las condiciones operativas eran las mismas que se aplican de rutina para el DS, salvo que el medio de simulación se introdujo en cada etapa a fin de crear las condiciones más desfavorables. La operación se repitió 3 veces en cada etapa. Se tomaron muestras por duplicado para el análisis de hidrocortisona.

En la Tabla 10 se presentan los resultados para las distintas muestras.

Tabla 10: Datos brutos, análisis de HC mediante agregado durante la purificación

Etapa	[Hidro cortisona] en µg/mL = ppm			Volumen correspondiente (mL)			Masa de hidrocortisona (µg)			Factor de reducción (log10)		
	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3
Etapa 10 1.º ultracentrif. Z1	Volumen cargado Z1	109,000	109,000	25000	25000	25000	2725000	2725000	2725000	N/A	N/A	N/A
	Efluente Z1	107,000	102,500	24945	25565	24985	2669115	2620413	2498500	0,01	0,02	0,04
	Rechazos livianos Z1	13,500	12,800	11,300	1580	1490	21330	20480	16837	2,11	2,12	2,21
	Cosecha Z1	0,850	0,850	0,795	920	960	782	816	779	3,54	3,52	3,54
Etapa 12, 2.º ultracentrif. Z2	Rechazos pesados Z1	0,075	<LD	800	720	820	60	NC	NC	4,66	NC	NC
	Volumen cargado Z2	109,000	109,000	25000	25000	25000	2725000	2725000	2725000	N/A	N/A	N/A
	Efluente Z2	91,000	117,000	25460	24850	25230	2316860	2907450	2926680	0,07	-0,03	-0,03
	Rechazos livianos Z2	10,500	13,200	11,300	1360	1350	14805	17952	15255	2,26	2,18	2,25
Etapa 13, 3.º ultracentrif. Z3	Cosecha ZT Z2	3,500	2,500	3,300	450	450	1575	1125	1485	3,24	3,38	3,26
	Cosecha ZH Z2	0,375	0,290	0,285	680	640	255	186	185	4,03	4,17	4,17
	Rechazos pesados Z2	<LD	<LD	<LD	760	800	NC	NC	NC	NC	NC	NC
	Volumen cargado Z3	109,000	109,000	109,000	1000	1000	109000	109000	109000	N/A	N/A	N/A
Rechazos livianos Z3	Rechazos livianos Z3	80,000	102,000	94,000	1220	1220	97600	124440	116560	0,05	-0,06	-0,03
	Cosecha Z3	3,100	3,200	2,700	150	125	465	400	405	2,37	2,44	2,43
	Rechazos pesados Z3	0,650	0,705	0,505	150	150	98	106	76	3,05	3,01	3,16

Factor de reducción calculado a partir de la masa, tomando el "volumen de carga" de la referencia como la masa de entrada para la etapa considerada.

N/A: No es aplicable.

Cosecha: zonas utilizadas efectivamente para la producción - Cosecha ZH: parte superior de la cosecha de la ultracentrifugación - Cosecha ZT: parte inferior de la cosecha de la ultracentrifugación

<LD: <Límite de detección.

NC: No calculado, ya que la concentración de hidrocortisona es inferior al límite de detección (<LD).

RA_0920053

Información confidencial/proprietaria

Página 23 de 95

ROXANA MONTEMILO
DIRECTORA TÉCNICA
APOYADA
SANOFI PASTEUR S. A.





La concentración de hidrocortisona obtenida en la fracción cosechada en la etapa 10 (primera ultracentrifugación Z1) permite calcular un factor de reducción promedio de $3,54 \log_{10}$ durante esta primera etapa de purificación.

La concentración de hidrocortisona obtenida en la fracción cosechada en la etapa 12 (segunda ultracentrifugación Z2) permite calcular un factor de reducción medio de:

- $4,12 \log_{10}$ en la cosecha denominada isopícnica superior (que no se somete a ninguna otra purificación).
- $3,3 \log_{10}$ en la cosecha denominada de zona inferior (que se vuelve a purificar durante la etapa 13).

La concentración de hidrocortisona obtenida en la fracción cosechada en la etapa 13 (tercera y última ultracentrifugación Z3) permite calcular un factor de reducción promedio de $2,41 \log_{10}$ durante esta última etapa de purificación.

Estos datos permiten calcular un factor de reducción de la concentración de hidrocortisona durante el proceso completo de purificación:

- $3,54 (Z1) + 4,12$ (parte superior Z2) = $7,66 \log_{10}$ para la parte superior de centrifugación zonal cosechada en Z2, que no se somete a purificación posterior;
- $3,54 (Z1) + 3,3$ (parte inferior Z2) + $2,41 (Z3)$ = $9,25 \log_{10}$ para la fracción cosechada en la parte inferior zonal en Z2, que posteriormente se purifica en Z3.

Por consiguiente, en comparación con el factor de reducción de $7,66 \log_{10}$, el factor de eliminación de $9,25 \log_{10}$, que da lugar a la proporción de hidrocortisona informada durante el resto del proceso por la fracción del lote tratado en Z3, se puede considerar despreciable.

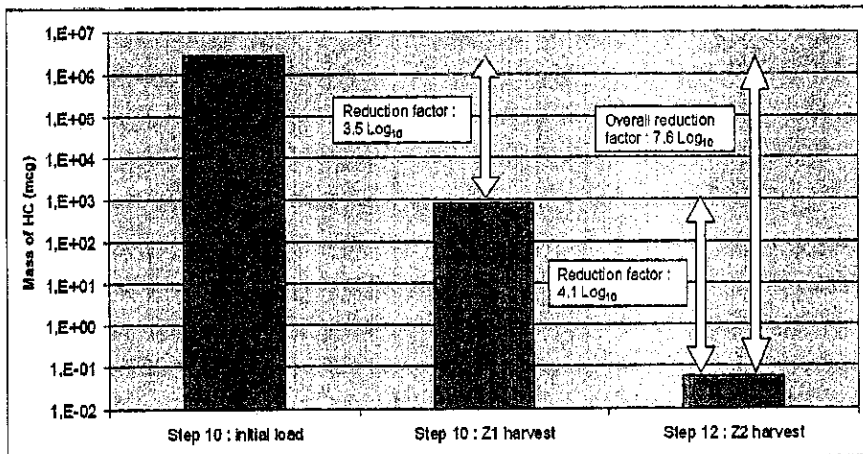
En la Figura 5 se ilustra el factor de reducción durante el proceso de purificación completo.

Este factor de reducción se calculó tomando en cuenta solo la fracción cosechada que no se somete a una nueva purificación para que representara el caso más desfavorable.

$$3,54 (Z1) + 4,12 \text{ (parte superior Z2)} = 7,66 \log_{10}$$



Figura 5: Resultados de la eliminación obtenidos durante las etapas de purificación



Así, la eliminación de hidrocortisona mediante ultracentrifugación isopícnica permite una reducción de 7,6 log₁₀ (es decir, 39,8 · 10⁶ veces) de la carga inicial de hidrocortisona.

Además, los datos reales combinados obtenidos en las secciones anteriores se pueden utilizar para calcular la cantidad máxima teórica de hidrocortisona en la dosis de la vacuna QIV. Resultó ser de aproximadamente 7 × 10⁻¹⁹ g de hidrocortisona/μg antígeno HA, lo que corresponde a una cantidad de hidrocortisona que no es superior a 51 ag por dosis de QIV.

Se validó la eliminación 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. El estudio es aceptable.

2.3.2 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 efecto 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 el proceso y, en particular, los pasos 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.

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
AFIDERADA
SANOFI PASTEUR S. A.



Con este fin, se elaboraron 4 lotes de DS de B/Brisbane/60/2008 (lotes FA357981, FA357982, FA357983 y FA357984) con hidrocortisona añadida al tampón del inóculo (concentración objetivo de 40 µg/mL). Se comparó el contenido de ovoalbúmina, octoxinol, formaldehído, proteínas totales, endotoxinas y la carga microbiana 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 Ph. Eur. 0158, edición actual.

2.3.2.1 Protocolo

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.

Se evaluó la eficiencia del proceso de purificación en los lotes de uniformidad (con hidrocortisona y sin hidrocortisona) cuantificando el contenido de ovoalbúmina (proteína de huevo) en las etapas siguientes: clarificación por centrifugación y filtración (etapa 7), concentración de la cosecha monovalente (etapa 8), estandarización en ΔDO (etapas 15 y 18).

El octoxinol 9 se añade a una suspensión viral estandarizada de cosecha purificada y diluida (ΔDO ≈ 7,5) a fin de fragmentar las partículas virales (etapa 16). El contenido de octoxinol 9 en el DS debía ser ≤560 µg/mL (correspondiente a la especificación de octoxinol 9 para el DS de la TIV. Para el DS de la QIV, la especificación se define como ≤800 µg/mL). La diafiltración en la etapa 17 permite eliminar este reactivo hasta llegar a esta especificación.

El formaldehído se añade a una suspensión estandarizada diluida de partículas fragmentadas (ΔDO ≈ 2,5) a fin de inactivar el virus (etapa 19).

También se realizaron análisis de masa de nitrógeno proteico, carga microbiana y contenido de endotoxinas.

2.3.2.2 Resultados

2.3.2.2.1 Ovoalbúmina

Los resultados obtenidos en distintos pasos bajo la forma de masa media de ovoalbúmina (calculada basándose en el volumen y en el análisis de ovoalbúmina en cada etapa; los datos brutos se presentan en la Tabla 11) se muestran en la Figura 6. La curva azul corresponde a los lotes con hidrocortisona y la curva roja a los lotes de referencia. Debido a los cambios en la masa de ovoalbúmina ocurridos durante el proceso, se utiliza una escala logarítmica para el eje de la masa de ovoalbúmina a fin de que los datos resulten más claros.

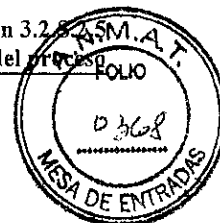
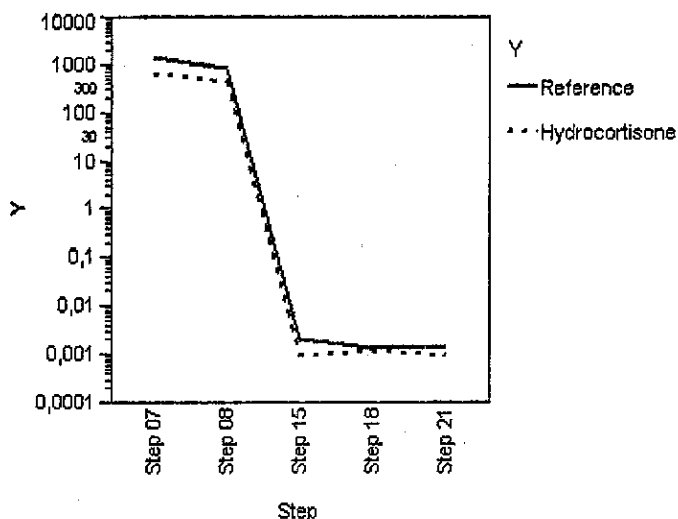


Figura 6: Eliminación de masa de ovoalbúmina (g) durante los pasos del proceso



La adición de hidrocortisona no tiene un efecto negativo sobre la eliminación de la ovoalbúmina durante el proceso de purificación.

Sin embargo, la cantidad de ovoalbúmina fue menor en el líquido alantoideo (citratado, etapa 7 y concentrado, etapa 8), dado que en ambas etapas la masa promedio de ovoalbúmina fue aproximadamente un 50 % menor que la que contenían los lotes de referencia. Esta diferencia también se observó en la etapa de DS (etapa 21).

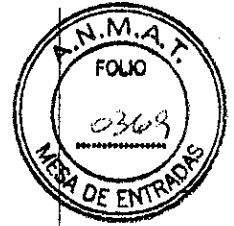
Esta reducción se puede explicar por una mayor absorción de ovoalbúmina en los embriones, durante el cultivo viral en presencia de hidrocortisona. De hecho, la ovoalbúmina es absorbida naturalmente por los embriones durante la embriogénesis y la hidrocortisona puede acentuar este fenómeno afectando el metabolismo embrionario.

Como la presencia de hidrocortisona no induce un incremento de la ovoalbúmina en el producto, no aumenta el riesgo de incumplimiento debido a un exceso de esta impureza en la vacuna (especificación ≤ 100 ng/mL en el producto terminado). Por el contrario, el uso de hidrocortisona parece reducir significativamente la concentración de esta impureza, lo que es positivo para el producto; dado que la ovoalbúmina es un alérgeno potente, una mayor reducción de su concentración en una dosis de la vacuna mejora el producto.

Tabla 11: Masa de ovoalbúmina (g)

Etapa	Referencia					Hidrocortisona			
	FA357977	FA357978	FA357979	FA357980	FA357981	FA357982	FA357983	FA357984	
Etapa 7: Masa total de ovoalbúmina en el lote (g)	1518,9	1240,12	1320,45	1359,46	545,34	971,45	541,28	476,68	
Etapa 8: Masa de ovoalbúmina en el lote (g)	734,7978	948,7544	874,0224	802,152	311,6984	646,3872	465,1404	396,2182	
Etapa 15: Masa de ovoalbúmina (g)	0,0011141	0,00170431	0,00178153	0,00363808	0,00080028	0,00136453	0,00086004	0,00076695	
Etapa 18: Masa de ovoalbúmina (g)	0,00143911	0,00133464	0,0014553	0,00093292	0,00126431	0,00150165	0,00098526	0,00096116	
Etapa 21: Masa de ovoalbúmina (g)	0,00125947	0,00151088	0,0014807	0,00143097	0,00077325	0,0012429	0,00076854	0,00077154	

ROXANA MONTEMILORE
DIRECTORA TÉCNICA
APCORDERADA
SANOFI PASTEUR S. A.





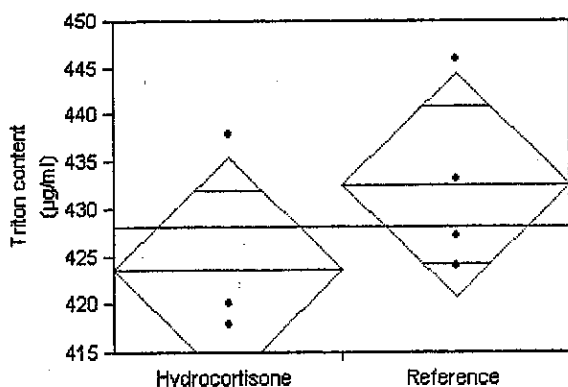
2.3.2.2.2 Octoxinol 9

Este detergente se utiliza para fragmentar las partículas virales durante la etapa 16 y siempre se añade a la suspensión viral estandarizada en la misma proporción volumen/volumen (0,5 % v/v).

El octoxinol 9 se considera una impureza y su concentración en el DS estaba sujeta a un límite de especificación ($\leq 560 \mu\text{g/mL}^a$); el objetivo de la etapa de diafiltración (etapa 17) del proceso consiste en reducir la concentración de octoxinol 9 de modo que los lotes cumplan esta especificación.

Los resultados del análisis de octoxinol 9 en la etapa 21 (DS) se presentan en la Figura 7 y en la Tabla 12.

Figura 7: Análisis de octoxinol 9 ($\mu\text{g/mL}$) en el DS



La línea de la mediana representa el valor medio de un grupo. Los diamantes representan el intervalo de confianza del 95 % de la media y las marcas de traslape trazadas en $\pm((\sqrt{2}CI)/2)$ a ambos lados de esta línea permiten evaluar si existe (o no) una diferencia significativa entre las medias de los grupos.

Estos resultados mostraron que la hidrocortisona no redujo la eliminación del octoxinol 9 dado que el resultado promedio de los lotes tratados con hidrocortisona fue un 2 % menor que el resultado medio de los lotes de referencia. Esta diferencia se puede considerar insignificante.

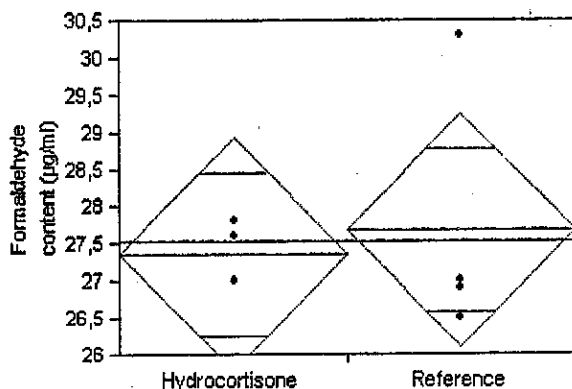
2.3.2.2.3 Formaldehído

Los resultados del análisis de formaldehído en el DS (etapa 21) se presentan en la Figura 8.

^a Especificaciones para el octoxinol 9 para el DS de la TIV. Para el DS de la QIV, la especificación se define como $\leq 800 \mu\text{g/mL}$.



Figura 8: Análisis de formaldehído en el DS



La línea de la mediana representa el valor medio de un grupo. Los diamantes representan el intervalo de confianza del 95 % de la media y las marcas de traslape trazadas en $\pm((\sqrt{2}CI)/2)$ a ambos lados de esta línea permiten evaluar si existe (o no) una diferencia significativa entre las medias de los grupos.

Estos resultados muestran que la adición de hidrocortisona no afecta el contenido medio de formaldehído del DS.

Los resultados del análisis de octoxinol 9 y formaldehído en el DS se presentan en la Tabla 12.

Tabla 12: Contenido de formaldehído y octoxinol 9 (µg/mL) en el DS

Modalidad	Lote n.º	Análisis de formaldehído (µg/mL)	Análisis de octoxinol 9 (µg/mL)
Referencia	FA357977	30,3	427
Referencia	FA357978	27	433
Referencia	FA357979	26,5	424
Referencia	FA357980	26,9	446
Hidrocortisona	FA357981	27,6	418
Hidrocortisona	FA357982	27,8	420
Hidrocortisona	FA357983	27	418
Hidrocortisona	FA357984	27	438

2.3.2.2.4 Nitrógeno proteico

Los resultados obtenidos en distintos pasos bajo la forma de masa promedio de nitrógeno proteico (calculada basándose en el volumen y en el análisis de ovoalbúmina en cada etapa; los datos brutos se presentan en la Tabla 13) se muestran en la Figura 9. La curva azul corresponde a los lotes con hidrocortisona y la curva roja a los lotes de referencia. Debido a los cambios en la masa



Sanofi Pasteur

Sección 3.2.3

Yacuna antigripal tetravalente (virión fraccionado, inactivada)

Validación y/o evaluación del proceso

de nitrógeno ocurridos durante el proceso, se utiliza una escala logarítmica para el eje de la masa de nitrógeno para que los datos resulten más claros.

Tabla 13: Masa de nitrógeno proteico (g)

Etapa	Referencia					Hidrocortisona				
	FA357977	FA357978	FA357979	FA357980	FA357981	FA357982	FA357983	FA357984		
Etapa 7: Masa total de nitrógeno proteico en el lote (g)	1981962	1239460	2245733	1222770	2035980	1994349	1085310			1080328
Etapa 7: Masa total de nitrógeno proteico en el lote (g)	1873541	914753	1704509	745711	1485503	1444135	1143321			869630
Etapa 8: Masa de nitrógeno proteico en el lote (g)	275	349	345	481	306	347	297			245
Etapa 15: Masa de nitrógeno proteico (g)	7,5	6,1	5,5	5,3	8,8	8,0	7,6			9,5
Etapa 18: Masa de nitrógeno proteico (g)	6,0	4,4	4,0	3,9	6,9	6,5	6,2			7,7
Etapa 21: Masa de nitrógeno proteico (g)	5,1	4,3	3,6	3,6	6,5	5,6	5,6			7,2

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
APODERADA
SANOFI PASTEUR S.A.

