

Figura 8
Liberación de las partículas parecidas a virus del tipo 18.

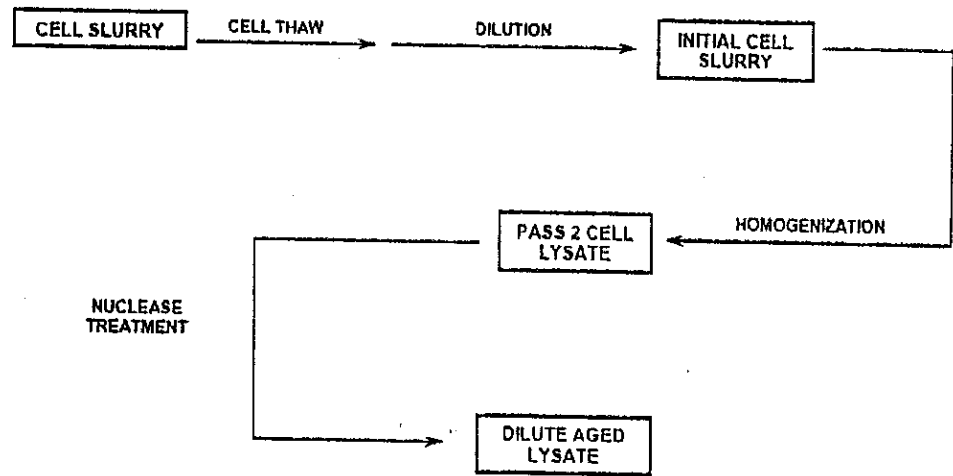
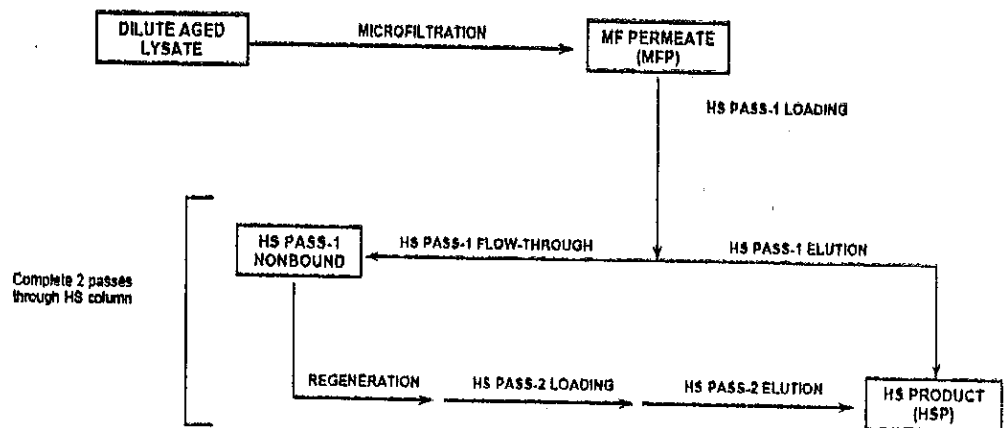


Figura 9
Microfiltración y cromatografía HS del tipo 18.



JH
Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.
José Nerone
Apoderado

MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.
Farm. Sebastián Darío Goldentor
DIRECTOR TÉCNICO
MATRÍCULA NACIONAL 15436

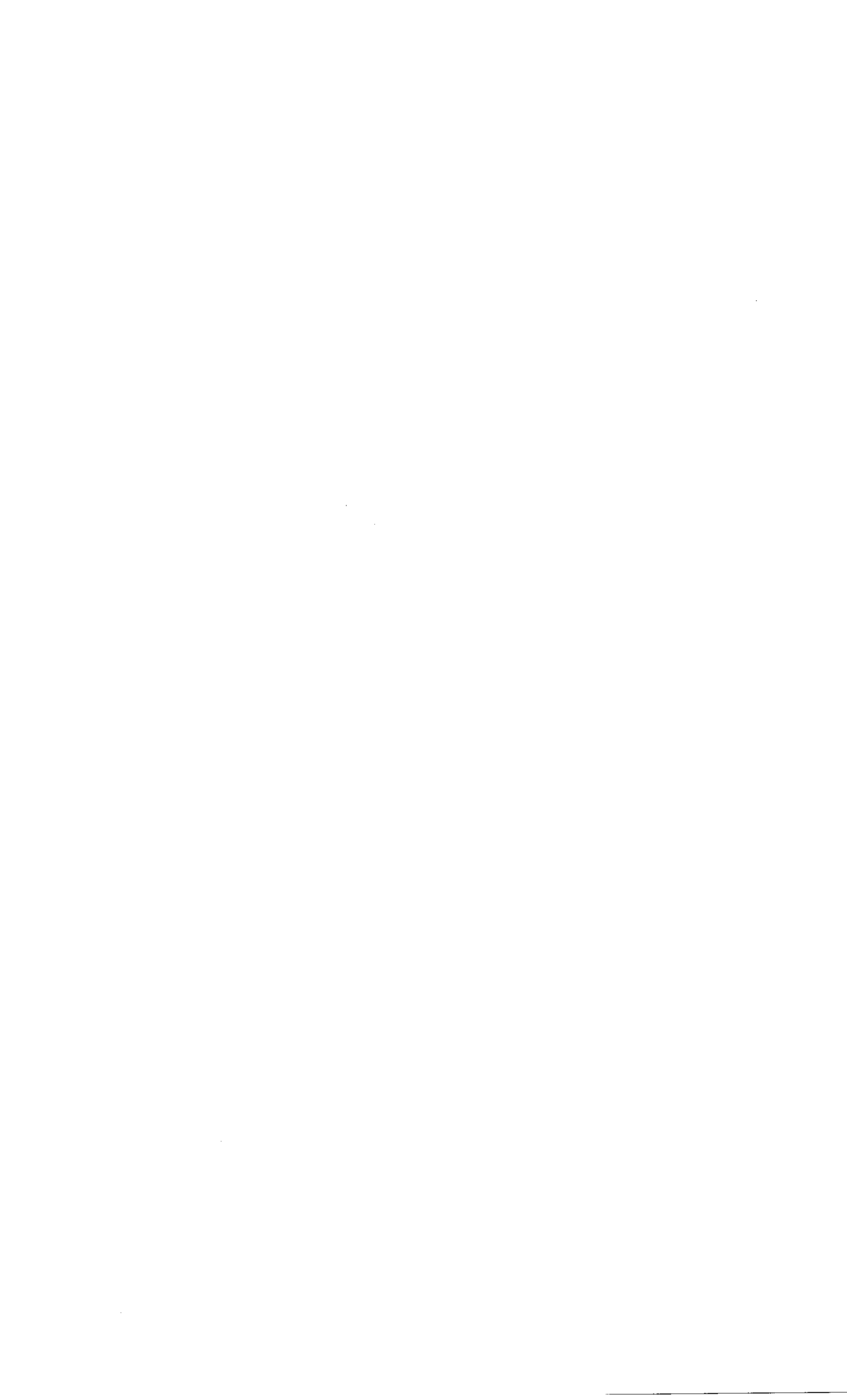
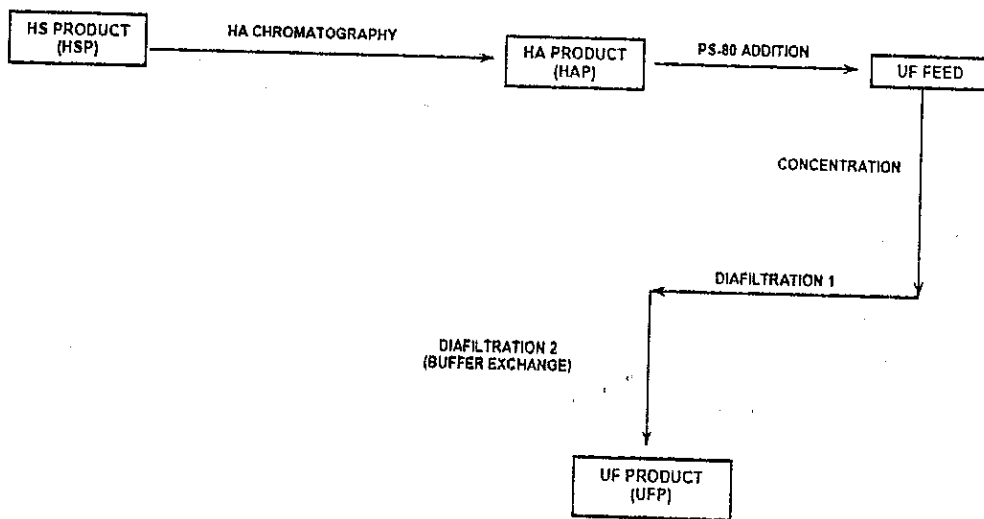


Figura 10
Cromatografía con hidroxiapatita (HA) del tipo 18, reensamblado de las PPV e intercambio de buffer.



2.3 Control de Materiales

2.3.1 Introducción materias primas y medios de cultivo

El proceso de fabricación de los principios activos no emplea materiales de origen animal que impliquen un riesgo de contaminación con encefalopatía espongiforme transmisible (EEB), según lo indica la "Note for Guidance on Minimising the Risk of Transmitting Animal Spongiform Encephalopathy Agents via Human and Veterinary Medicinal Product" (Nota sobre directrices para minimizar el riesgo de transmisión de los agentes de la encefalopatía espongiforme de los animales a través de productos medicinales para uso humano y veterinario), de la EMEA (Agencia Europea para la Evaluación de Productos Medicinales – EMEA/410/01 rev. 2, julio de 2004). Se emplea D-galactosa en un medio de cultivo para fermentación, obtenida de leche de bovinos ordeñada de animales saludables (de igual manera que la leche para consumo humano), pero se considera que la leche y sus derivados cumplen en toda su amplitud con las mencionadas directrices de la EMEA y están excluidos de

Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.
José Verone
Apoderado

MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.
Farm. Sebastián Darío Goldentul
DIRECTOR TÉCNICO
MATRICULA NACIONAL 15436



las restricciones de importación del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (Federal Register/ Vol. 63 No. 3/6 de junio de 1988, página 407).

2.3.1.1 Materias primas y medios de cultivo para la fermentación

La Tabla 1 ofrece un resumen de las materias primas, soluciones, buffers acuosos y medios de cultivo empleados en el proceso de fermentación de VPH; los componentes se presentan en las tablas 2, 3 y 4. Todas las materias primas se someten a ensayos de conformidad con las normas apropiadas para el uso al que están destinadas.

Tabla 1

Materias primas, soluciones, buffers y medios de cultivo empleados en el proceso de fermentación del VPH

Medios de cultivo y suplementos	Finalidad
Medio de fermentación para el inóculo semilla de VPH	Aumentar la densidad celular de las levaduras para su transferencia subsecuente a la fermentadora de producción.
Medio definido para VPH	Apoyar un incremento ulterior en la densidad celular y propagar las partículas parecidas a virus (proteína L1) para su recuperación y purificación.
Solución vitaminada para VPH	Brindar micronutrientes para sustentar una mayor crecimiento celular y producción de antígenos en la fermentadora de producción.
Solución de dextrosa para VPH	Servir como fuente primaria de carbono para aumentar la densidad celular, tanto en el inóculo semilla como en la fermentadora de producción.
Galactosa 40% (peso/volumen)	Inducir la transcripción de la proteína L1 a partir del promotor de GAL1.
Buffer para cultivo de levaduras con VPH	Lavar a las células de levadura como parte del proceso de diafiltración.

Tabla 2

Componentes de los medios de cultivo para el inóculo semilla de VPH y del medio para la fermentación

Sulfato de amonio	L-lisina HCl	Hidróxido de sodio
Dextrosa (D-glucosa)	L-metionina	Ácido Succínico
L-arginina HCl	L-fenilalanina	Uracilo
Monohidrato de L-histidina HCl	L-triptofano	Base nitrogenada para levaduras sin aminoácidos ni sulfato de amonio
L-isoleucina	L-tirosina	
Agente antiespumante (polipropilenglicol monobutil éter)		Glicerol (sólo medios de cultivo para el inóculo semilla)

JF
Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.
José Berone
Aprobado

MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.
Farm. Sebastián Darío Goldentul
DIRECTOR TÉCNICO
MATRICULA NACIONAL 15436

Tabla 3
Componentes del medio definido para VPH

Sulfato de amonio	Inositol	Cloruro de potasio
Ácido bórico	Sulfato de magnesio heptahidratado	Fosfato dibásico de potasio ^a
Cloruro de calcio dihidratado		Cloruro de sodio
Cloruro de colina	Sulfato de manganeso monohidratado	Hidróxido de sodio
Cloruro de cobalto hexahidratado		Molibdato de sodio dihidratado
Sulfato de cobre pentahidratado	L-glutamato monosódico monohidratado	Ácido succínico
Sulfato ferroso de amonio hexahidratado	Cloruro de níquel hexahidratado	Uracilo
Agente antiespumante (polipropilenglicol monobutil éter)		Sulfato de zinc heptahidratado

^a Aparece en la Farmacopea Europea (Ph. Eur.) como fosfato dipotásico.

Tabla 4
Componentes de otras soluciones para la fermentación y buffers

Solución	Componentes
Solución vitaminada para VPH	Pantotenato de calcio, clorhidrato de piridoxina, D-biotina, clorhidrato de tiamina, ácido nicotínico ^a
Solución de dextrosa para VPH	Dextrosa (D-glucosa), sulfato de magnesio heptahidratado
Galactosa 40% (P/P)	D (+) galactosa
Buffer para cultivo de levaduras con VPH	MOPS ^b (ácido libre), hidróxido de sodio, cloruro de magnesio hexahidratado

^a Aparece en la Farmacopea de Estados Unidos (USP) como niacina.

^b MOPS: ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico

2.3.1.2 Materias primas y medios de cultivo para la purificación

La Tabla 5 presenta un resumen de las soluciones, amortiguadores acuosos y otras materias primas empleadas en los procesos de purificación del VPH y adsorción en el adyuvante. Dado que se emplean muchos componentes iguales en varios buffers para la purificación, también se ha presentado la composición de dichos buffers. Los buffers y las soluciones se preparan con agua inyectable. Los componentes del adyuvante de aluminio se presentan en la Tabla 6.

gm
 Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.
 José Herone
 Apoderado

MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.
 Farm. Sebastián Darío Goldentul
 DIRECTOR TÉCNICO
 MATRICULA NACIONAL 15436



Tabla 5

Buffers, soluciones y materias primas empleados en el proceso de purificación del VPH

Soluciones y materias primas para la purificación del VPH	Finalidad
Buffer para cultivo de levaduras con VPH	Se emplea para diluir el lisado de levaduras después de la homogeneización para los tipos 6, 11 y 16.
Buffer para enriquecer el lisado envejecido	Se emplea para diluir el lisado después de la incubación (paso del tratamiento con nucleasas) para los tipos 6, 11 y 16.
Buffer de equilibrio HS ^a	Se emplea para diafiltrar el producto durante el paso de la microfiltración. También se emplea para equilibrar la columna de cromatografía HS antes de alimentar la carga para los tipos 6, 11 y 16.
Buffer de equilibrio del tipo 18	Se emplea para diluir el lisado de levaduras después de la homogeneización para el tipo 18. También se emplea para diafiltrar el producto durante el paso de la microfiltración y para equilibrar la columna de cromatografía HS antes de alimentar la carga.
Buffer de lavado HS	Se emplea para arrastrar todo el material no ligado de la columna de cromatografía HS.
Buffer de lavado HA ^b	Se emplea para eluir el producto de la columna HS durante el paso de la cromatografía HS y para equilibrar y lavar la columna HA después de la carga de alimentación durante el paso de la cromatografía HA.
Buffer de empaquetado HA	Se emplea para empaquetar y regenerar la columna de cromatografía HA.
Buffer de elución HA	Se emplea para eluir el producto de la columna HA durante el paso de la cromatografía HA.
Buffer de UF ^c del tipo 18 (más PS-80) ^d	Se emplea para diafiltrar el producto durante la diafiltración DF1 o en el módulo de intercambio de buffer para el tipo 18.
Buffer de UF (más PS-80)	Se emplea para diafiltrar el producto durante el módulo de intercambio de Buffer y para diluir el producto acuoso final a 640 µg/ml.
Solución tris/EDTA ^e	Se emplea para desensamblar el producto de la cromatografía HA de los tipos 6, 11 y 16.
Solución de polisorbato 80 al 10%	Se emplea para desensamblar el producto de la cromatografía HA de los tipos 6, 11 y 16 y como excipiente en el producto final.
Solución de DTT ^f 0.2 M	Se emplea para desensamblar el producto de la cromatografía HA de los tipos 6, 11 y 16.
Buffer de extracción del DTT	Se emplea para enjuagar las membranas de UF antes del uso y durante la diafiltración (DF1) del módulo de reensamblado de las PPV ^h para los tipos 6, 11 y 16.
Buffer de reensamblado (más PS-80)	Se emplea para diafiltrar el producto durante las diafiltraciones DF2 y DF3 del módulo de reensamblado de las PPV para los tipos 6, 11 y 16.
Alumbre 2X en solución salina	Se emplea como formulación adyuvante para la adsorción de las PPV.
Cloruro de sodio 5 M	Se emplea durante el paso de eliminación de los desechos celulares para minimizar la degradación proteolítica de las PPV para el tipo 18.
Benzonase ^g	Se emplea durante la homogeneización, para ayudar a la depuración de ácidos nucleicos durante los pasos subsecuentes de purificación por cromatografía.
Ribonucleasa T1	Se agrega al lisado diluido después de la homogeneización, para ayudar a eliminar el ARN de levadura contaminante para el tipo 18.


Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.
José Berone
Apoderado

MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.
Farm. Sebastián Darío Goldentul
DIRECTOR TECNICO
MATRICULA NACIONAL 15436



- ^a HS: se refiere al medio para la cromatografía de intercambio catiónico, que se funcionaliza con grupos sulfopropilo.
- ^b HA: hidroxiapatita
- ^c UF: ultrafiltración
- ^d Las palabras "más PS-80", cuando aparecen en paréntesis después del nombre del amortiguador, indican que se agrega polisorbato 80 (PS-80) al buffer liberado, a razón de 0.012%, antes de emplearlo en el proceso. El PS-80 se somete a ensayos y se libera por separado. Los buffers se usan solos o con PS-80.
- ^e Tris: tris(hidroximetil)aminometano
- ^f EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
- ^g DTT: ditioneitol
- ^h PPV: partículas parecida a virus

Tabla 6
Componentes del adyuvante sulfato hidroxifosfato de aluminio amorfo
(alumbre 2X en solución salina)

Sulfato potásico de aluminio	Fosfato dibásico de sodio ^a
Cloruro de sodio	Fosfato monobásico de sodio monohidratado ^b
Hidróxido de sodio	Borato de sodio ^c

- ^a Aparece en la Farmacopea Europea (Ph. Eur.) como fosfato disódico.
- ^b Aparece en la Farmacopea Británica (BP) como fosfato de sodio dihidrogenado monohidratado.
- ^c Aparece en Ph. Eur. como bórax.

2.3.2 Sustrato celular

2.3.2.1 Construcción de los vectores de expresión de las levaduras

Para la expresión de las cuatro proteínas L1 se empleó el vector pGAL110 de expresión de las levaduras. Las diferencias en los sustratos celulares entre los tipos de VPH se introdujeron al clonar el marco de lectura abierto (ORF, por sus siglas en inglés) particular de la L1 del VPH, al insertar el ORF en el vector pGAL110 y al transformar el inóculo de levadura huésped con el vector resultante. Se elaboraron genotecas de plásmidos o fagos a partir del ADN obtenido de muestras clínicas de seres humanos o de estirpes celulares positivas para VPH de los tipos 6, 11, 16 y 18.

2.3.2.2 Construcción de el inóculo madre huésped de levadura

El inóculo huésped de *Saccharomyces cerevisiae* empleada para la Vacuna recombinante tetravalente contra el VPH es el inóculo CANADE 3C-5, también designada como inóculo 1895. El inóculo CANADE 3C-5 se derivó de el inóculo de *S. cerevisiae* 2150-2-3 (MATa, leu2-04, ade1, cir⁺). Se emplearon técnicas estándar de genética molecular.


 Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.
 José Verone
 Apoderado

MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.
 Farm. Sebastián Darío Goldentul
 DIRECTOR TECNICO
 MATRICULA NACIONAL 15436



2.3.2.3 Transformación de el inóculo madre huésped de levadura con los vectores de L1 de

VPH.

2.3.2.3.1 Transformación de el inóculo huésped CANADE 3C-5

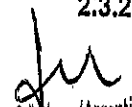
Se emplearon los vectores de expresión de las levaduras relacionados con el pGAL110 para cada uno de los cuatro tipos de VPH, a fin de transformar los esterooplastos de el inóculo CANADE 3C-5 de *S. cerevisiae*. Las transformaciones se llevaron a cabo en forma independiente para cada uno de los tipos de VPH siguiendo un método publicado, con obtención de los transformandos en agar selectivo carente de leucina (agar leu/sorbitol). El pasaje de colonias individuales en el agar leu/sorbitol produjo aislados clonales. En esta fase y las subsecuentes, los aislados se conservaron como cultivos de reserva en glicerol al 17% a una temperatura ≤ -60 °C o inferior. Los aislados clonales se cultivaron, se indujeron con galactosa y luego se recolectaron. Los aislados celulares se evaluaron mediante radioinmunovaloración en cuanto a la expresión de partículas parecidas a virus de L1 del VPH, usando anticuerpos conformacionales de tipo específicos para la proteína L1 de VPH que se estaba produciendo.

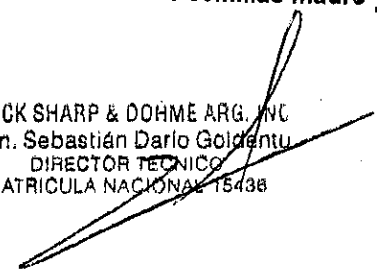
Para cada uno de los cuatro tipos, se eligieron los tres clones que mostraran los niveles más altos de expresión de PPV L1 VPH a fin de someterlos a evaluación ulterior en volúmenes mayores de cultivo. De cada tipo, se eligió un clon que mostrara los niveles más altos de expresión de PPV L1 VPH en un matraz como el primer aislado de clonación.

2.3.2.3.2 Establecimiento de las inóculos semillas originales

El primer aislado de clonación de cada tipo de VPH se sometió a una segunda vuelta de aislamiento por clonación. Basado en el análisis de productividad de la expresión de las PPV de VPH, se eligió un aislado altamente productivo de cada tipo como el inóculo semilla original para preparar una inóculo semilla premadre (premaster seed).

2.3.2.4 Establecimiento de las inóculos semillas madre y de trabajo


Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.
José Berone
Apoderado


MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.
Farm. Sebastián Darío Goldentú
DIRECTOR TÉCNICO
MATRICULA NACIONAL 15438



Los procesos para establecer las inóculos semilla madre y de trabajo se resumen en las figuras 11 y 12 respectivamente.

Figura 11

Proceso para establecer el inóculo semilla madre

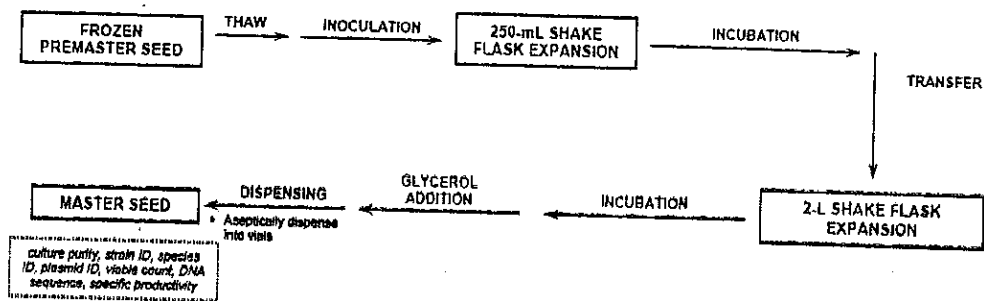
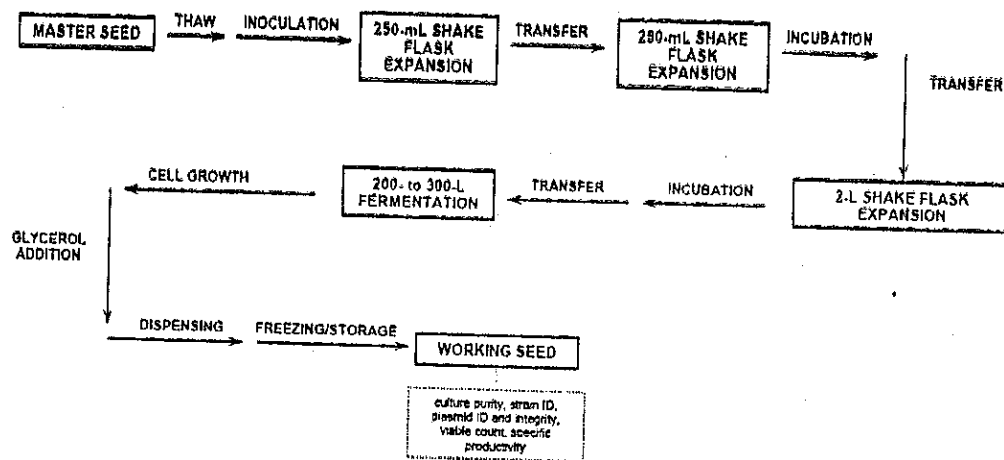


Figura 12

Proceso para establecer las Inóculos semilla de trabajo



2.3.2.5 Caracterización y ensayos de los bancos celulares

En la tabla 7 se presentan los resúmenes de los ensayos a los que se somete cada uno de las inóculos semilla madre de VPH, inóculos semilla de trabajo y células resultantes de la producción. En cada análisis, todos los lotes mostraron los resultados esperados. Los resultados de la cuenta de viabilidad, el único análisis cuantitativo, se presentan en la tabla 8.

JM
 Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.
 José Nefone
 Apoderado

MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.
 Farm. Sebastián Darío Goldentul
 DIRECTOR TÉCNICO
 MATRICULA NACIONAL 15436

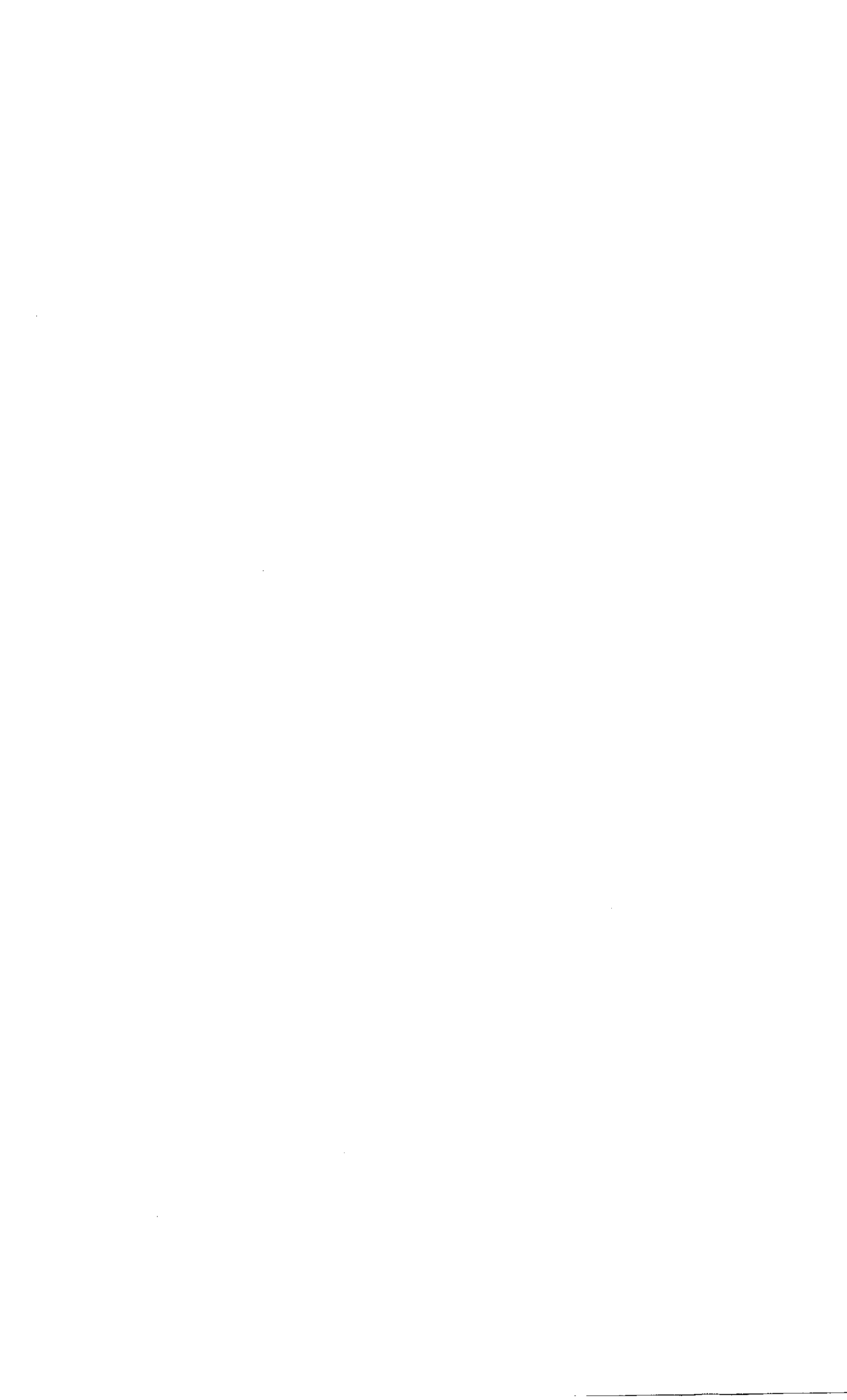


Tabla 7

Resumen de las ensayos del inóculo primario para la vacuna, el inóculo secundario y las células resultantes de la producción

Valoración	Resultados esperados
Pureza del cultivo	Sin crecimiento salvo la característica del huésped
Identidad de especie	<i>S. cerevisiae</i>
Identidad de el inóculo huésped mediante replicación en placa de agar (<i>replica plating</i>)	Ade ⁺ , Can ^R , Leu ⁺
Identidad de el inóculo huésped mediante inmunoelctrotransferencia (<i>Southern blotting</i>) ^a	Se detectaron desviaciones en bandas específicas
Identidad e integridad de plásmidos mediante mapeo de restricción	Sin diferencias con respecto a las bandas esperadas
Secuencia de ADN de los genes y uniones codificadores de L1 ^b	Sin diferencias con respecto a la secuencia esperada
Productividad específica ^c	Producción del antígeno específico

^a Para las células resultantes de la producción, esta ensayo se había realizado previamente en células de una fermentación a gran escala de cada tipo por separado. Los resultados fueron los esperados.

^b Esta ensayo no se realizó en el inóculo semilla de trabajo.

^c Esta ensayo no se realizó en las células resultantes de la producción.

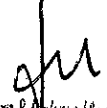
Tabla 8

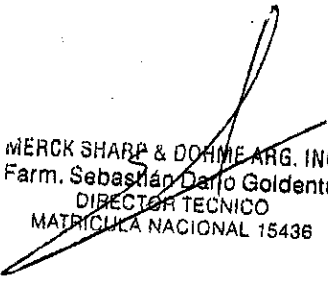
Enumeración de las inóculos semilla madre y de las inóculos semilla de trabajo

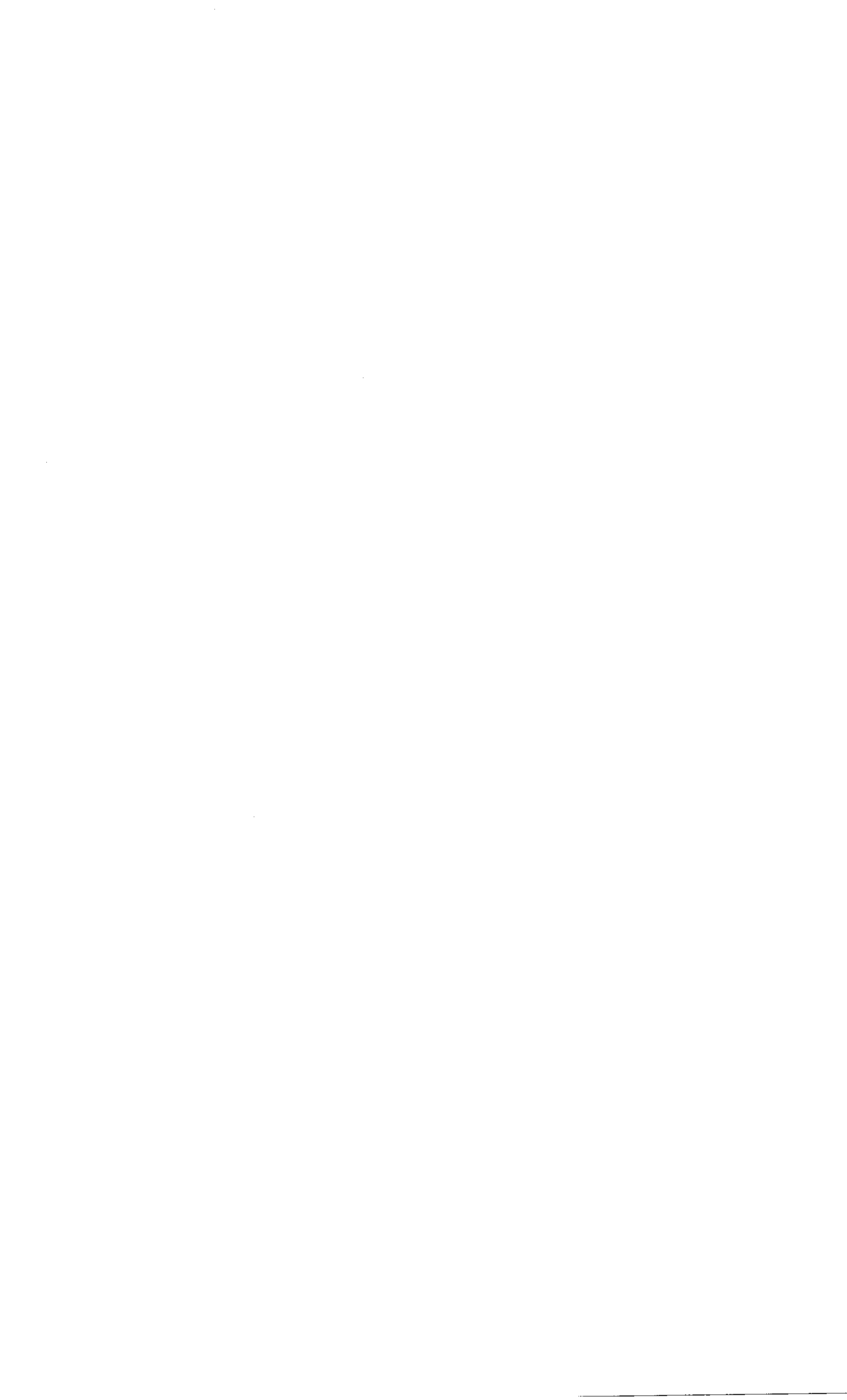
Tipo	Cuenta de viabilidad de el inóculo semilla madre ^a y número de lote	Cuenta de viabilidad de el inóculo semilla de trabajo ^a y número de lote
6	1.2 × 10 ⁷	7.2 × 10 ⁶
	HPV6MS98008	HPV6aWS0001
11	7.9 × 10 ⁶	4.9 × 10 ⁶
	HPV11MS98025	HPV11WS0001
16	9.5 × 10 ⁶	1.6 × 10 ⁶
	HPV1697.01-.02	HPV16WS0001
18	1.1 × 10 ⁷	1.4 × 10 ⁶
	HPV1898.01-.02	HPV18WS0001

^a Las unidades son unidades formadoras de colonias (UFC) por ml.

Se realizaron ensayos adicionales para demostrar la estabilidad del sustrato celular y del sistema de expresión durante los cultivos y hasta llegar a las células resultantes de la producción. Para cada tipo de inóculo semilla de trabajo, se llevó a cabo una fermentación a gran escala (en recipiente de 3000 litros) y se sometió a ensayos de pureza del cultivo,


Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.
José Verone
Apoderado


MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.
Farm. Sebastián Darío Goldentul
DIRECTOR TÉCNICO
MATRÍCULA NACIONAL 15436



identidad de la especie, identidad de el inóculo huésped, mapeo con endonucleasas de restricción y secuencia de ADN. Se demostraron la pureza del cultivo, la identidad de el inóculo huésped y la estabilidad del sistema de expresión de estas células, cultivadas desde el nivel de las inóculos semilla madre hasta las células resultantes de la producción para los cuatro tipos.

2.3.2.6 Retención de plásmidos en las inóculos semilla madre, las inóculos semilla de trabajo y las células resultantes de la producción.

Por única vez, se evaluó la retención de la estructura de los plásmidos en las inóculos semilla y en las células resultantes de la producción, usando una valoración del número de copias del plásmido. Los resultados confirmaron la retención del vector de expresión desde el inóculo semilla madre hasta el final de la producción, y por lo tanto son un indicio de estabilidad.

2.3.2.7 Viabilidad de los inóculos semilla madre y inóculos semilla de trabajo.

La viabilidad de las inóculos semilla de trabajo se confirma por su desempeño en los lotes de fermentación de rutina. La viabilidad de el inóculo semilla madre se confirma por la preparación y calificación exitosa de nuevas inóculos semilla de trabajo.

2.3.2.8 Criterios de liberación de las nuevas inóculos semilla de trabajo

En la tabla 9 se presentan los ensayos y los criterios de aceptación para la liberación de los nuevos lotes de inóculo secundario. La expresión del antígeno L1 específico de cada tipo también se confirma usando un nuevo lote de inóculo semilla de trabajo en el proceso de fabricación a escala completa y, subsecuentemente, realizando ensayos de identidad como parte del proceso de liberación del los principios activos.

Tabla 9

Ensayos de liberación y criterios de aceptación para el inóculo secundario

Ensayo	Procedimiento	Criterio de aceptación
Pureza del cultivo	PC 9110.775	Sin crecimiento excepto <i>S. cerevisiae</i>
Cuenta de viabilidad	PC 9110.771	>8.5 x 10 ⁵ UFC ^a /ml
Identidad de el inóculo huésped	PC 9110.770	Debe identificarse como <i>S. cerevisiae</i> CANADE 3C-5

^a Las unidades son unidades formadoras de colonias (UFC) por ml.

Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.
 José Nerone
 Apoderado

MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.
 Farm. Sebastián Darío Goldentul
 DIRECTOR TÉCNICO
 MATRICULA NACIONAL 15436



2.3.2.9 Documentación y procedimientos de etiquetado de las Inóculos semilla madre y de trabajo.

En la fabricación de inóculos semilla madre y de trabajo se emplean hojas batch aprobadas. Las etiquetas en cada recipiente de el inóculo contienen el número de lote, la descripción del contenido, el número de recipiente y la fecha de fabricación.

2.3.2.10 Protección contra acontecimientos catastróficos

Las inóculos semilla madre de VPH se almacena a ≤ -60 °C en dos congeladores por separado que contienen sistemas de back-up de manera de protegerlas contra cortes en el suministro eléctrico y fallas del equipo. Las inóculos semillas de trabajo de VPH se almacena en las mismas condiciones, pero en congeladores distintos de los del las inóculos semilla madre.

2.4 Controles de los pasos críticos e intermedios

En esta sección se presentan los controles de los procesos críticos para la fabricación de rutina. Todos estos controles se supervisaron durante la validación de los procesos.

2.4.1 Fermentación y cultivo


Los procesos de expansión de las inóculos de VPH (en 200 litros), fermentación de producción (en 3000 litros) y cultivo se diseñaron para ser robustos y están validados. Los parámetros críticos de los procesos que se supervisan en la fabricación de rutina son:

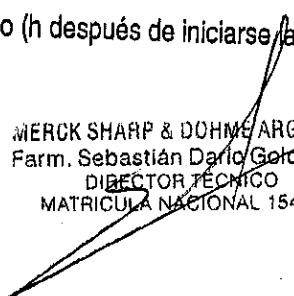
Fermentación en 200 litros

- Concentración final de dextrosa (g/l)

Fermentación en 3000 litros

- Rango de control del pH
- Momentos de adición de las alícuotas de galactosa
- Velocidad del flujo de alimentación de la solución de galactosa al 40% (g/min)
- Total de solución de galactosa al 40% añadida (Kg)
- Tiempo de cultivo (h después de iniciarse la alimentación de dextrosa)


Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.
José Verone
Aprobado


MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.
Farm. Sebastián Darío Goldentui
DIRECTOR TÉCNICO
MATRICULA NACIONAL 15436



Cultivo

- Temperatura (°C)
- Cronograma de adición de las alícuotas de galactosa

2.4.2 Purificación y adsorción

Los procesos de purificación y adsorción de las partículas parecidas a virus se diseñaron para ser robustos y están validados.

** Los parámetros críticos de los procesos que se supervisan en la fabricación de rutina de los tipos 6, 11 y 16 son:

Desensamblado de las PPV

- Concentración de ditiotreitol

Adsorción

- Razón entre las velocidades de flujo del producto acuoso final diluido y del adyuvante.

** Los parámetros críticos de los procesos que se supervisan en la fabricación de rutina del tipo 18 son:

Liberación de las PPV

- Cantidad de Benzonase® (endonucleasa)
- Cantidad de ribonucleasa


Adsorción

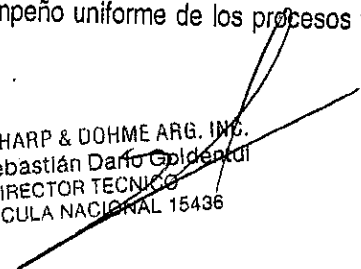
- Razón entre las velocidades de flujo del producto acuoso final diluido y del adyuvante

2.5 Validación y evaluación de los procesos

2.5.1 Resumen

La presente sección documenta la exitosa validación de los procesos para la fabricación del principio activo contra el VPH: granel monovalente de producto adsorbido para los tipos 6, 11, 16 y 18. En la fecha en que se realizó el estudio de validación de los procesos, se definió un atributo crítico de calidad (ACC) como una propiedad mensurable de un producto intermedio o terminado tal que, al cumplir con los criterios predeterminados de aceptación de los atributos críticos de calidad, garantizaría un desempeño uniforme de los procesos y la calidad final del


Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.
José Verone
Apoderado


MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.
Farm. Sebastián Darío Goldentul
DIRECTOR TÉCNICO
MATRICULA NACIONAL 15436




producto. Un parámetro crítico del proceso (PCP) se definió como una variable de ingreso del proceso que, si se mantenía dentro del rango, resultaría en un desempeño uniforme de los procesos y en resultados aceptables de los atributos críticos de calidad. Los estudios de validación se ejecutaron con éxito, de conformidad con protocolos aprobados prospectivamente que se basaban en estas definiciones.

Más adelante, Merck reevaluó sus definiciones de los parámetros críticos de los procesos y de los atributos críticos de calidad. Las mediciones de consistencia (uniformidad) de los procesos ya no se consideran atributos críticos de calidad, y los parámetros críticos de los procesos ahora se limitan a aquellos parámetros en los cuales una desviación tiene un potencial significativo de ocasionar una falla en un atributo crítico de calidad. Además, se introdujeron dos categorías nuevas: un atributo clave de los procesos (ACP) se define como una propiedad medible empleada para evaluar el desempeño o la consistencia de los procesos. Un parámetro clave de operación (PCO) es un parámetro con respecto al cual una desviación del rango determinado entraña el potencial de repercutir en el desempeño o la uniformidad de los procesos. Al igual que los demás parámetros de los procesos, los parámetros clave de operación se monitorean, y cualquier desviación se investiga para evaluar su repercusión en la calidad del producto. Debido al cambio en las definiciones, sólo algunos de los parámetros críticos de los procesos y atributos críticos de calidad aplicados durante los estudios de validación de los procesos se consideran controles críticos. Los restantes atributos críticos de calidad (ACC) y atributos clave de los procesos (ACP) no se monitorearan de manera rutinaria. La realización exitosa de los estudios de validación ha brindado la garantía de que puede cumplirse con estos criterios de manera consistente. Para la validación de la fermentación y la purificación, se empleó un método matricial.

2.5.2 Fermentación y cultivo

Los procesos de fermentación y cultivo se validaron exitosamente. En la Figura 13 se presenta una panorámica de los pasos que conforman los procesos de fermentación de las inóculos, fermentación de producción y proceso de cultivo.

La selección de los parámetros críticos de los procesos y los atributos críticos de calidad, así como sus rangos respectivos, se estableció con base en los datos de producción en


Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.
Jose Nerone
Apoderado


MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.
Farm. Sebastián Dario Goldentul
DIRECTOR TECNICO
MATRICULA NACIONAL 15436

laboratorio, en forma piloto y a escala completa. En esta sección se ofrecen breves descripciones de los objetivos de cada paso de los procesos.

Figura 13

Módulos de los procesos de fermentación y cultivo

Módulo	Finalidad	Pasos del proceso
Fermentación de las inóculos	<ul style="list-style-type: none"> • aumentar la densidad celular 	Descongelación de las inóculos Inoculación Crecimiento celular
Fermentación de producción	<ul style="list-style-type: none"> • aumentar la densidad celular • generar partículas parecidas a virus 	Inoculación Fase de dextrosa en lote Fase de alimentación de dextrosa Fase de inducción con galactosa
Cultivo	<ul style="list-style-type: none"> • eliminar el medio de fermentación • concentrar las células 	Cultivo Envasado Congelación

El objetivo del proceso de fermentación del inóculo (en 200 litros) es aumentar la masa celular para inocular la etapa de producción. Todos los lotes cumplieron con todos los criterios de aceptación para este módulo.

Los objetivos de la fermentación de producción de las inóculos son aumentar todavía más la masa celular y generar partículas parecidas a virus para su obtención y purificación. Todos los lotes de validación cumplieron con todos los criterios de aceptación, con una excepción. Un lote del tipo 6 no cumplió con el criterio de parámetro crítico del proceso para el tiempo de evolución del pico de dióxido de carbono, pero tal desviación no repercutió adversamente en la calidad o consistencia del proceso de fermentación de producción.

Los objetivos de los pasos de cultivo celular son eliminar el medio de fermentación y concentrar las células antes de congelarlas. Todos los lotes de validación cumplieron con todos los criterios de aceptación para este módulo.

Todos los lotes aprobaron todas las ensayos de liberación del principio activo que estaban en vigor al momento de la validación (la ensayo de identidad de la especie se eliminó

JM
 Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.
 José Merone
 Apoderado

[Signature]
 MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.
 Farm. Sebastián Darío Goldentul
 DIRECTOR TÉCNICO
 MATRICULA NACIONAL 15436



subsecuente como un ensayo de liberación independiente, porque se realiza como parte del análisis de identidad de el inóculo huésped).

2.5.3 Purificación y adsorción

Los procesos de purificación y adsorción, como parte de la fabricación, se validaron exitosamente fabricando nueve lotes que cumplieron con todos los criterios de validación. El cuadro Figura 14 ofrece una panorámica de los módulos (grupos de pasos) de los procesos para la purificación y adsorción de los tipos 6, 11 y 16, y la Figura 15 ofrece una panorámica para el tipo 18. Las diferencias clave en los procesos para el tipo 18 son: 1) se emplean Benzonase® y ribonucleasa para depurar los ácidos nucleicos; 2) se emplea cloruro de sodio en lugar de citrato de sodio en los pasos de microfiltración (MF) y cromatografía en columna HS; 3) no se requiere el desensamblado y reensamblado químico de las partículas parecidas a virus y 4) la composición del buffer inicial para la ultrafiltración (UF) es ligeramente diferente.

La selección de los parámetros críticos de los procesos y los atributos críticos de calidad, así como sus rangos respectivos, se estableció con base en los datos de producción en laboratorio, en forma piloto y a escala completa. En esta sección se ofrecen breves descripciones de los objetivos de cada paso de los procesos.


Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.
Jose Nerone
ApoDERADO

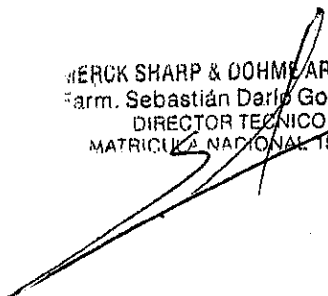

MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.
Farm. Sebastián Darío Goldentul
DIRECTOR TÉCNICO
MATRICULA NACIONAL 15436

Figura 14

Módulos de los procesos de purificación y adsorción de los tipos 6, 11 y 16.

<u>Módulo</u>	<u>Finalidad</u>	<u>Pasos del proceso</u>
Liberación de las PPV	<ul style="list-style-type: none"> romper las células y liberar las PPV digerir los ácidos nucleicos 	Descongelación de las células Homogeneización Tratamiento con nucleasas
Captura y purificación de las PPV	<ul style="list-style-type: none"> eliminar los desechos celulares capturar y purificar las PPV 	Microfiltración Cromatografía HS
Purificación de pulido	<ul style="list-style-type: none"> purificar las PPV 	Cromatografía HA
Desensamblado de las PPV	<ul style="list-style-type: none"> desensamblar las PPV 	Adición de sustancias químicas Reacción con el DTT
Reensamblado y formación de enlaces cruzados	<ul style="list-style-type: none"> reensamblar las PPV formar enlaces disulfuro 	Diafiltración 1 Diafiltración 2 Filtración pre-incubación Diafiltración 3 Incubación
Intercambio de buffer	<ul style="list-style-type: none"> concentrar el producto lograr la concentración meta de excipiente 	Concentración Diafiltración 4 Concentración/dilución
Filtración estéril	<ul style="list-style-type: none"> filtrar el producto a través de un filtro esterilizante 	Filtración estéril
Adsorción	<ul style="list-style-type: none"> formular el producto monovalente 	Dilución Adsorción del adyuvante Envasado

PPV: partículas parecidas a virus; DTT: ditiotreitól.

JM
 Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.
 José Merdne
 Apoderado

MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.
 Farm. Sebastián Darfo Goldental
 DIRECTOR TÉCNICO
 MATRICULA NACIONAL 15436

Figura 15

Módulos de los procesos de purificación y adsorción del tipo 18

Módulo	Finalidad	Pasos del proceso
Liberación de las PPV	<ul style="list-style-type: none"> romper las células y liberar las PPV dissociar el ARN de las PPV 	Descongelación de las células Homogeneización Tratamiento con nucleasas
Captura y purificación de las PPV	<ul style="list-style-type: none"> eliminar los desechos celulares capturar y purificar las PPV 	Microfiltración Cromatografía HS
Purificación de pulido	<ul style="list-style-type: none"> purificar las PPV 	Cromatografía HA
Intercambio de buffer	<ul style="list-style-type: none"> concentrar el producto lograr las concentración meta de excipiente 	Concentración Diafiltración Concentración/dilución
Filtración estéril	<ul style="list-style-type: none"> filtrar el producto a través de un filtro esterilizante 	Filtración estéril
Adsorción	<ul style="list-style-type: none"> formular el producto monovalente 	Dilución Adsorción del adyuvante Envasado

PPV: partículas parecidas a virus.

La liberación de las partículas parecidas a virus a partir de las células de levadura se logra mediante la homogeneización. A continuación, los ácidos nucleicos se disocian de las partículas parecidas a virus y son digeridos. En el módulo de captura y purificación de las partículas parecidas a virus, estas se cultivan y purifican eliminando los desechos celulares durante el paso de microfiltración y eliminando las proteínas de las células huésped y otras impurezas durante el paso de cromatografía con intercambio catiónico con grupos sulfopropilo (HS). En el módulo de purificación y pulido, la cromatografía con hidroxapatita (HA) elimina las impurezas residuales y las partículas parecidas a virus agregadas.

En el módulo de desensamblado, las partículas parecidas a virus de los tipos 6, 11 y 16 se desensamblan químicamente para permitir un reensamblado controlado. En la fabricación de rutina, el pH del producto desensamblado no se medirá directamente, sino que se controlará confirmando el pH de una solución stock de EDTA/DTT. El módulo de reensamblado v

Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.
 José Neri
 Apoderado

MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.
 Farm. Sebastián Darío Goldentul
 DIRECTOR TÉCNICO
 MATRICULA NACIONAL 15436

formación de enlaces cruzados (exclusivamente para los tipos 6, 11 y 16) produce una población homogénea de partículas parecidas a virus reensambladas, con enlaces cruzados disulfuro y antigénicamente estables.

El módulo de intercambio del buffer concentra el producto, logra la composición objetivo de los excipientes y elimina los residuos. El módulo de filtración estéril garantiza la esterilidad del producto acuoso final. En el módulo de adsorción, las partículas parecidas a virus se adsorben sobre el adyuvante sulfato hidroxifosfato de aluminio amorfo mediante la mezcla en línea del producto acuoso final diluido con la formulación de adyuvante.

Todos los lotes de validación del principio activo cumplieron con todos los criterios de aceptación de los parámetros críticos de los procesos (PCP) y de los atributos críticos de calidad (ACC), y el periodo de hold time del producto acuoso final diluido se validó hasta por 30 días a una temperatura entre 2 y 8 °C. En unos cuantos casos (porcentaje de pureza, porcentaje de monómeros intactos y potencia relativa in vitro), los criterios de aceptación de las especificaciones propuestas se han vuelto más estrictos desde el estudio de validación. Algunos ensayos se eliminaron más adelante como ensayos de liberación.

Todos los lotes de validación cumplieron con los requisitos de depuración tanto de impurezas de las células huésped (ADN, ARN, lípidos y carbohidratos) como de residuos del proceso (ditiotreitolo). El ditiotreitolo se empleó como un marcador representativo durante la validación de los procesos para demostrar la depuración de otros residuos de bajo peso molecular (como fosfato, citrato y EDTA). Siempre que fue posible, se especificaron los objetivos de depuración del producto acuoso final. Sin embargo, con relación a la depuración de lípidos, se hicieron los ensayos en el producto de la cromatografía con hidroxiapatita (PHA), porque el polisorbato 80 de las muestras de producto acuoso final interfiere con el análisis. Se cumplió con todos los criterios de aceptación de los estudios de validación de la depuración.

2.5.4 Validación de los filtros

Los filtros empleados en el proceso de fabricación se validaron para demostrar que son apropiados para el uso al que se les destina, como se resumen en la Tabla 10.

Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.
Jose Terone
Apoderado

MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.
Farm. Sebastián Darlo Goldental
DIRECTOR TÉCNICO
MATRICULA NACIONAL 15436

