

2.2.1 Expansión del sustrato de células MRC-5

Las células MRC-5 de un frasco del Banco de Células de Trabajo del Fabricante (MWCB) se expanden para crear el sustrato celular para la subsiguiente propagación del VVZ. Un Lote se define como la fuente de células MRC-5 obtenidas de la expansión del MWCB. Las células MRC-5 se expanden en "fábricas" de células. Se usan botellas "Roller" (tubos para fijar y hacer cultivos) para la expansión final de las células. Las botellas roller se dividen en un subgrupo pequeño para semilla de trabajo, un subgrupo grande para botellas roller de producción final y un subgrupo pequeño para controles. Las botellas de semilla de trabajo se plantan al mismo tiempo que las botellas roller para producción. Sus operaciones de realimentación, infección y recolección se realizan independientemente de las botellas roller de producción, a fin de generar un pasaje de virus de semilla de trabajo que se use para infectar las botellas roller de producción.

2.2.2 Manufactura de los fluidos de virus recolectados

Los HVF son células MRC-5 que contienen el virus varicela-zóster, recolectados a partir de botellas roller de producción. La célula y el proceso de cultivo de virus pueden generar 20-53 L de HVF.

La suspensión de la célula de semilla de almacenamiento se diluye con medio de mantenimiento. Las botellas designadas para la manufactura de semilla de trabajo se infectan con la suspensión de semilla de almacenamiento diluida. Las botellas infectadas con virus se incuban a 33.5-37.5 °C por 24 a 72 horas, hasta ser recolectadas. Las células infectadas con virus se recolectan mediante tratamiento con tripsina-citrato al 0.25%. La tripsina se neutraliza con medio de semilla y la suspensión de célula de semilla de trabajo se diluye con medio de mantenimiento hasta una concentración adecuada. Posteriormente la suspensión de la célula de semilla de trabajo se usa para inocular cultivos celulares para la producción de la vacuna.

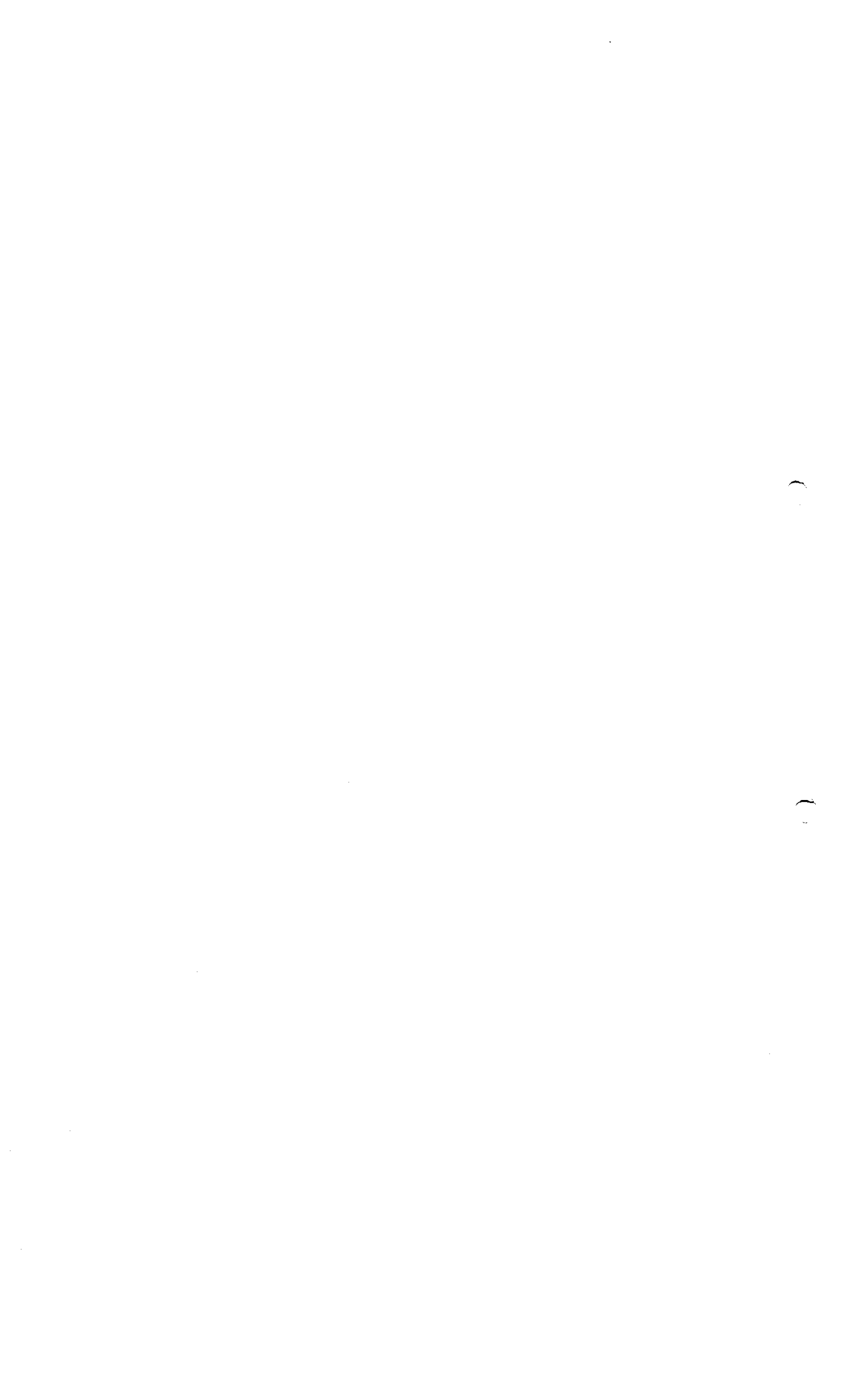
Las células de producción infectadas con virus se incuban a 33.5-37.5 °C por 24 a 72 horas, hasta alcanzar el tiempo de recolección designado. Al llegar el momento de recolección designado, cada cultivo celular se enjuaga con PBS (búfer en solución de fosfato). Este enjuague remueve el medio de cultivo, que contiene proteínas séricas de bovino y neomicina de los cultivos antes de la recolección de la capa celular.

MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.

Farm. MARIA CECILIA CAMPOS
DIRECTORA TECNICA
MATRICULA NACIONAL 12374

MERCK SHARP & DOHME ARGENTINA INC.

Dr. SANTIAGO RODRIGUE
DIRECTOR APODERADO PARA
ASUNTOS MEDICOS Y REGULATORIOS
MAT. NAC. 571525



infectadas se despegan mecánicamente de la superficie de las botellas. La suspensión se retira y transfiere a latas de acero inoxidable cerradas; tomándose muestras para Ensayo de esterilidad, y se congela. Las latas congeladas se almacenan a $\leq -60^{\circ}\text{C}$ antes del procesamiento descendente.

2.2.2.1 Ensayo de liberación

La Ensayo de liberación realizada en la vacuna a granel se describe en otra sección de la presente monografía.

2.2.3 Manufactura del granel dispensado

2.2.3.1 Definición de un lote

El granel dispensado de varicela es una mezcla de HVF obtenidos de hasta dos lotes de HVF. Las células en la suspensión de HVF se rompen por sonicación y se clarifican por filtración. Este volumen se dispensa a latas de acero inoxidable antes del congelamiento. Los contenedores de granel final dispensado (granel dispensado) se componen de un lote de la sustancia activa.

2.2.3.2 Descripción de la producción de granel dispensado

2.2.3.2.1 Combinación HVF

Un total de 20-53 L de HVF congelado en latas de acero inoxidable se derriten en baños de agua. Los HVF derretidos de las latas individuales de acero inoxidable se bombean hacia un tanque de acero inoxidable que servirá como fuente (granel presonicado y preclarificado). La temperatura del tanque se controla de 0 a 10°C , con agitación. Los HVF ya combinados se mezclan y se toma una muestra para Ensayos de control de calidad.

2.2.3.2.2 Sonicación de la vacuna a granel

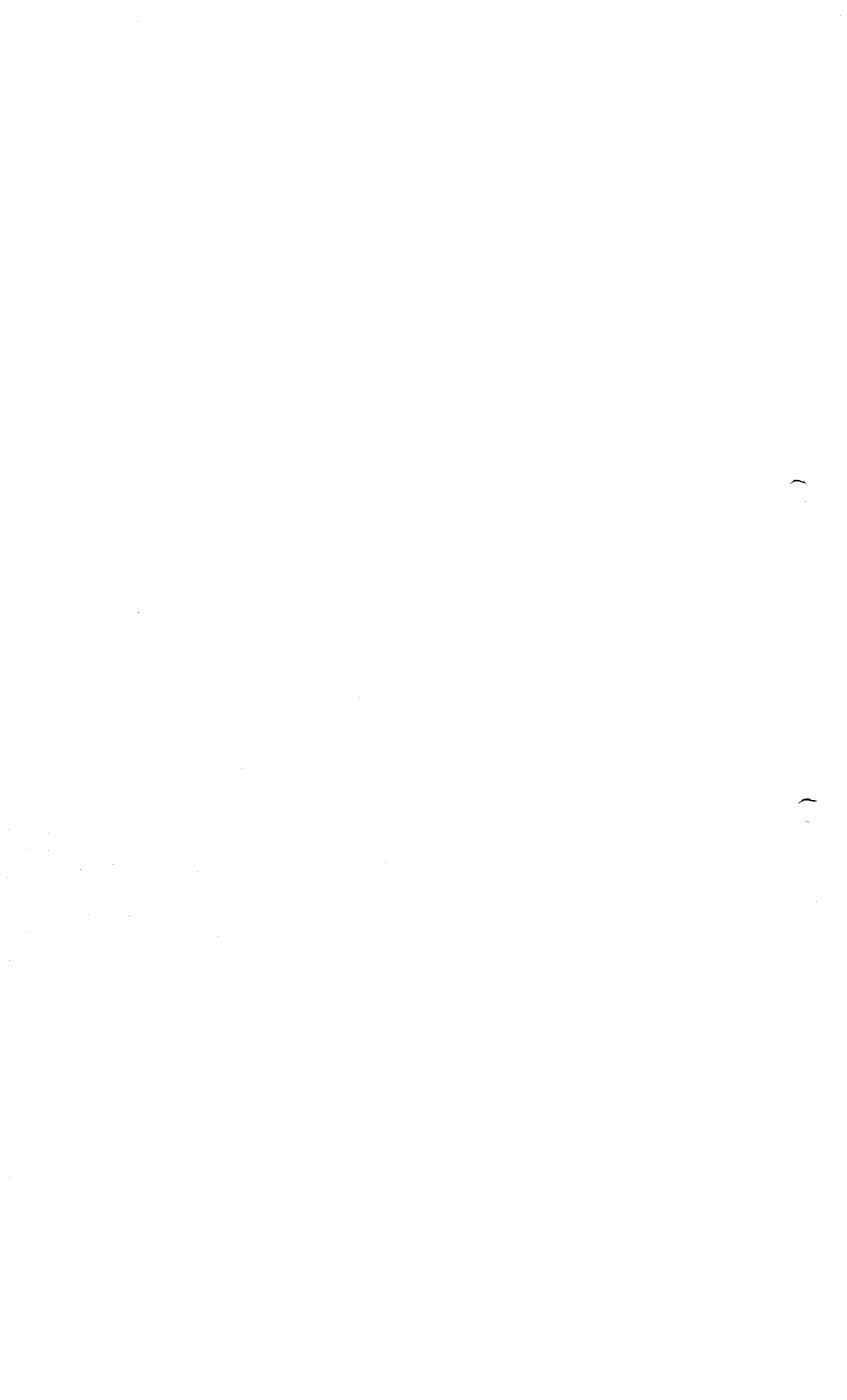
El granel preclarificado y presonicado se bombea a través de un sonicador de flujo (granel preclarificado y sonificado). El granel sonificado se recolecta en un segundo tanque de acero inoxidable enchaquetado, cuya temperatura se controla a $0 - 10^{\circ}\text{C}$. Después de concluir con el paso de sonicación, los graneles sonificados y preclarificados se mezclan. Se toma una muestra para Ensayos de control de calidad.

MERCK SHARP & DOHME ARG. INC

Farm. MARIA CECILIA CAMPOS
DIRECTORA TÉCNICA
MATRICULA NACIONAL 12374

MERCK SHARP & DOHME ARGENTINA INC.

Dr. SANTIAGO RODRIGUE
DIRECTOR APODERADO PARA
ASUNTOS MEDICOS Y REGULATORIOS
MAT. NAG. 51.828





2.2.3.2.3 Clarificación de la vacuna a granel

El granel sonicado y preclarificado se filtra a través de un conjunto de filtros que tienen un tamaño de poro de 8- μ m. El filtrado del primer conjunto de filtros se hace pasar posteriormente por otro conjunto de filtros con tamaño de poro de 3- μ m. El granel final se recolecta en un tercer tanque de acero inoxidable congelado (0-10°C).

2.2.3.2.4 Dispensación y almacenamiento de la vacuna a granel

El granel final se mezcla para asegurar la homogeneidad y se toman muestras para Ensayos de control de calidad. La vacuna a granel se dispensa entonces hacia latas de acero inoxidable que se congelan y almacenan a $\leq -60^{\circ}\text{C}$. Las latas de acero inoxidable dispensadas con granel final se designan como granel dispensado y se usan para la formulación y llenado de la vacuna.

2.2.3.3 Ensayo de liberación

La Ensayo de liberación llevada a cabo en los productos intermedios y en el granel dispensado se describe en otra sección de la presente monografía.

2.3 Control de Materiales

2.3.1 Materias primas, medios de cultivo y otros aditivos

Los medios de cultivo y suplementos para medios empleados en la manufactura de semilla madre, semillas para almacenamiento, bancos de células y vacunas a granel se resumen en la Tabla 1. Todas las materias primas y medios de cultivo empleados en la producción de la vacuna zóster se controlan y Ensayon, a fin de asegurar que se cumpla con los criterios de aceptación para calidad. Aquellas Ensayos que son más importantes para el uso propuesto de cada materia se listan en la Tabla 2.

MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.

GUYAGAMPOS

MERCK SHARP & DOHME ARGENTINA INC.

Dr. SANTIAGO RODRIGUE
DIRECTOR APODERADO PARA
MATERIAS REGULADORAS

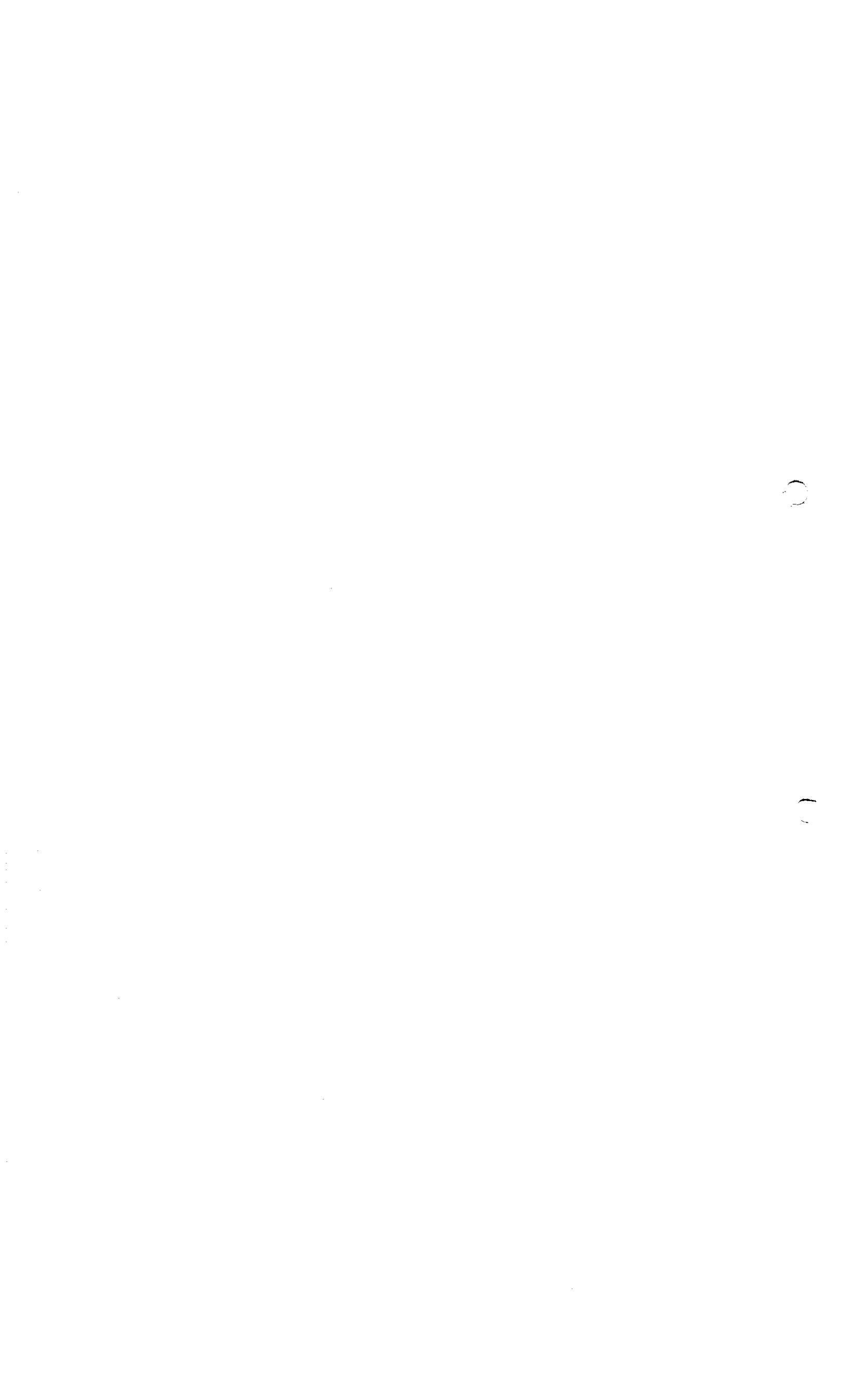




Tabla 1: Materiales empleados para manufacturar graneles de vacuna, Bancos de células MRC-5 y Semillas de virus

Medio de cultivo o suplemento	Propósito
Medio basal de Eagle con Sales de Earle (EBME) enriquecido con 2.2 g/L de bicarbonato de sodio	Medio de cultivo empleado para la expansión celular de semillas madres y de almacenamiento
Medio mínimo esencial de Eagle (MEME-45)	Medio de cultivo empleado en la infección y recolección de semillas madres y de almacenamiento
Suero bovino fetal (FBS, UV ^a -Irradiado)	Suplemento de medio para crecimiento, infección y recolección empleado en semillas de virus
Medio E modificado de Williams con sulfato de magnesio 4 mM (WMEM)	Medio de cultivo empleado para crecimiento de líneas celulares e infección por virus de bancos de células de trabajo y vacunas a granel
Suero bovino fetal enriquecido con hierro	Suplemento para crecimiento de líneas celulares, infección por virus y medio de recolección de vacuna a granel, semilla madre y bancos

12

0

0

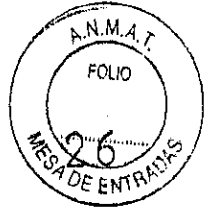


Tabla 1 (cont.): Materiales empleados para manufacturar graneles de vacuna, Bancos de células MRC-5 y Semillas de virus

Solución salina balanceada de Hanks Concentración 1X (1X HBSS)	Medio para enjuague
	Añadido para controlar botellas "roller" empleadas para Ensayos de hemadsorción después de recolección de control final
Sulfóxido de dimetilo (DMSO)	Empleado en la criopreservación de bancos de células y semillas de virus
Solución salina fisiológica	Añadida para controlar botellas "roller" empleadas en Ensayos de hemadsorción después de la recolección de control final
Solución de bicarbonato de sodio 2.8%	Suplemento para Medio mínimo esencial de Eagle
Solución de rojo de fenol 2.0%	Suplemento para medio de cultivo celular
L-Glutamina, 200 mM (Líquido)	Suplemento para medio de cultivo celular
Estabilizador de fosfato, gelatina y sacarosa (estabilizador FGS)	Estabilizador para vacuna

UV: Ultravioleta

MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.

Firma. MARIA CECILIA CAMPOS
DIRECTORA TECNICA
MATRICULA NACIONAL 12374

MERCK SHARP & DOHME ARGENTINA INC.

Dr. SANTIAGO RODRIGUE
DIRECTOR APODERADO PARA
ASUNTOS MEDICOS Y REGULATORIOS
MAT. NAC. 51.525



Tabla 2: Medios de cultivo/suplementos

Medios de cultivo/Suplementos	Ensayos	Especificaciones
Medio basal de Eagle con sales de Eagle (EBME) enriquecido con bicarbonato de sodio 2.2 g/L	Identidad	Debe cumplir
	Evaluación de dióxido de carbono	Emisión de 3.1-4.9 ml
	Promoción de crecimiento	Debe aprobar
Medio mínimo esencial de Eagle (MEME-46)	Promoción de crecimiento	Debe aprobar
	pH (Identidad)	7.0-7.5
	Punto de congelación (Identidad)	-0.46 a -0.54 °C
	Sodio (Identidad)	119-146 mEq/L
Suero bovino fetal ^a (FBS, UV^b-Irradiado)	Promoción de crecimiento/Toxicidad	Debe aprobar
	Identidad	Debe aprobar
Medio E modificado de Williams con sulfato de magnesio 4mM (WMEM)	Promoción de crecimiento	Debe aprobar
	Punto de congelación (Identidad)	-0.58 a -0.53°C
Suero bovino fetal enriquecido con hierro (y-irradiado)	Promoción de crecimiento	Debe aprobar
	Identidad	Debe aprobar
Solución de sulfato de neomicina	Potencia de neomicina	90-112 mg/ml
Solución salina con búfer de fosfato	pH	7.1-7.3
	Cloruro de sodio	0.79-0.98%
		(En etiqueta: 0.885%)
Tripsina-citrato 0.25% (UV-Irradiado, Porcino)	Neomicina	35-60 µg/ml
	Ensayo de uso de tripsina	Debe aprobar

^aActualmente, Merck compra suero bovino fetal y suero bovino fetal enriquecido con hierro a JRH Biosciences y a HyClone Laboratories, Inc. El Directorado Europeo para la Calidad de las Medicinas ha otorgado a ambos vendedores Certificados de Adecuabilidad, con lo cual certifica que el suero bovino adquirido con estos vendedores cumple con los criterios descritos en la monografía de la *European Pharmacopoeia* intitulada *Productos con riesgo de transmitir agentes de encefalopatías espongiiformes de animales (Ph. Eur., 1483)*.

^bUV: Ultravioleta

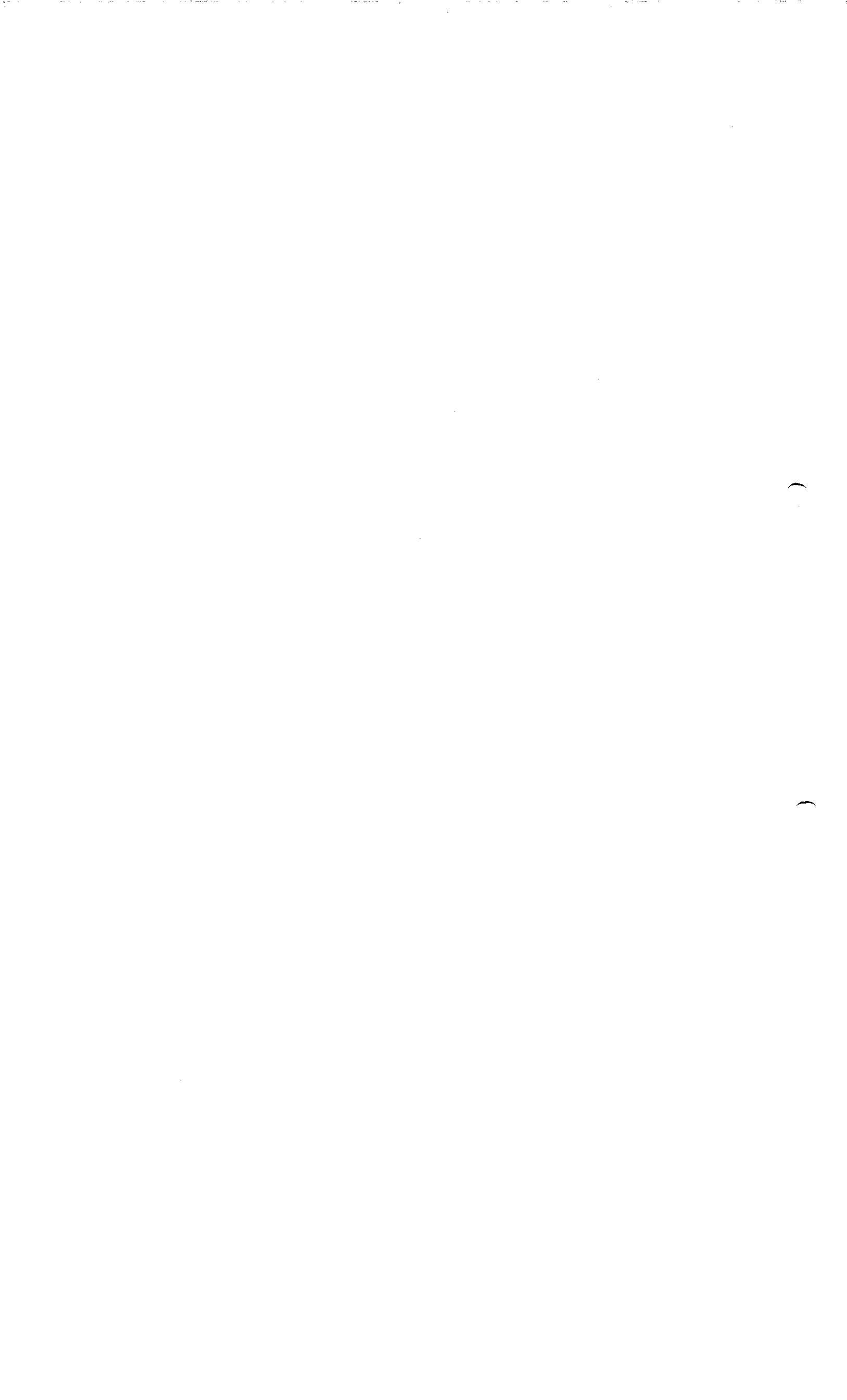
^cUSP: *United States Pharmacopoeia* / *Pharmacopoeia de Estados Unidos*

MERCK SHARP & DOHME ARGENTINA INC.

FANTI, MARIA CECILIA CAMPOS
DIRECTORA TECNICA
MATRICULA NACIONAL 12374

MERCK SHARP & DOHME ARGENTINA INC.

Dr. SANTIAGO RODRIGUE
DIRECTOR APODERADO PARA
ASUNTOS MEDICOS Y REGULATORIOS
MAT. NAC. 11.828



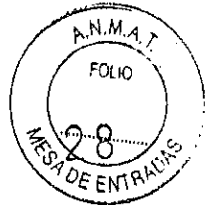


Tabla 2 (Cont.): Medios de cultivo/suplementos

Medios de cultivo/Suplementos	Ensayos	Especificaciones
Solución salina balanceada e incolora de Hanks (10X HBSS)	Sodio	1220-1520 mEq/L
Solución salina balanceada de Hanks, Concentración 1X (1X HBSS)	Sodio	119-153 mEq/L
Sulfóxido de dimetilo (DMSO)	Identidad	Cumple USP ^a
Solución fisiológica salina	Cloruro de sodio	0.82-1.00% Teórico: 0.90%
Solución de bicarbonato de sodio 2.8%	Bicarbonato de sodio	2.55-3.04% (En etiqueta: 2.8%)
Solución de rojo de fenol 2.0%	Identidad	Cumple
L-Glutamina, 200 mM (Líquido)	Rotación específica	Rango normal 30-34°C
Estabilizador de fosfato, gelatina y sacarosa (Estabilizador PGS)	pH	6.7-7.3
	Gravedad específica a 25°C	1.0173-1.0459

*Actualmente, Merck compra suero bovino fetal y suero bovino fetal enriquecido con hierro a JRH Biosciences y a HyClone Laboratories, Inc. El Directorado Europeo para la Calidad de las Medicinas ha otorgado a ambos vendedores Certificados de Adecuabilidad, con lo cual certifica que el suero bovino adquirido con estos vendedores cumple con los criterios descritos en la monografía de la *European Pharmacopoeia* intitulada *Productos con riesgo de transmitir agentes de encefalopatías espongiformes de animales (Ph. Eur., 1483)*.

^aUV: Ultravioleta

^aUSP: United States Pharmacopoeia (Farmacopea de Estados Unidos)

2.3.1.1 Preparación y filtración estéril

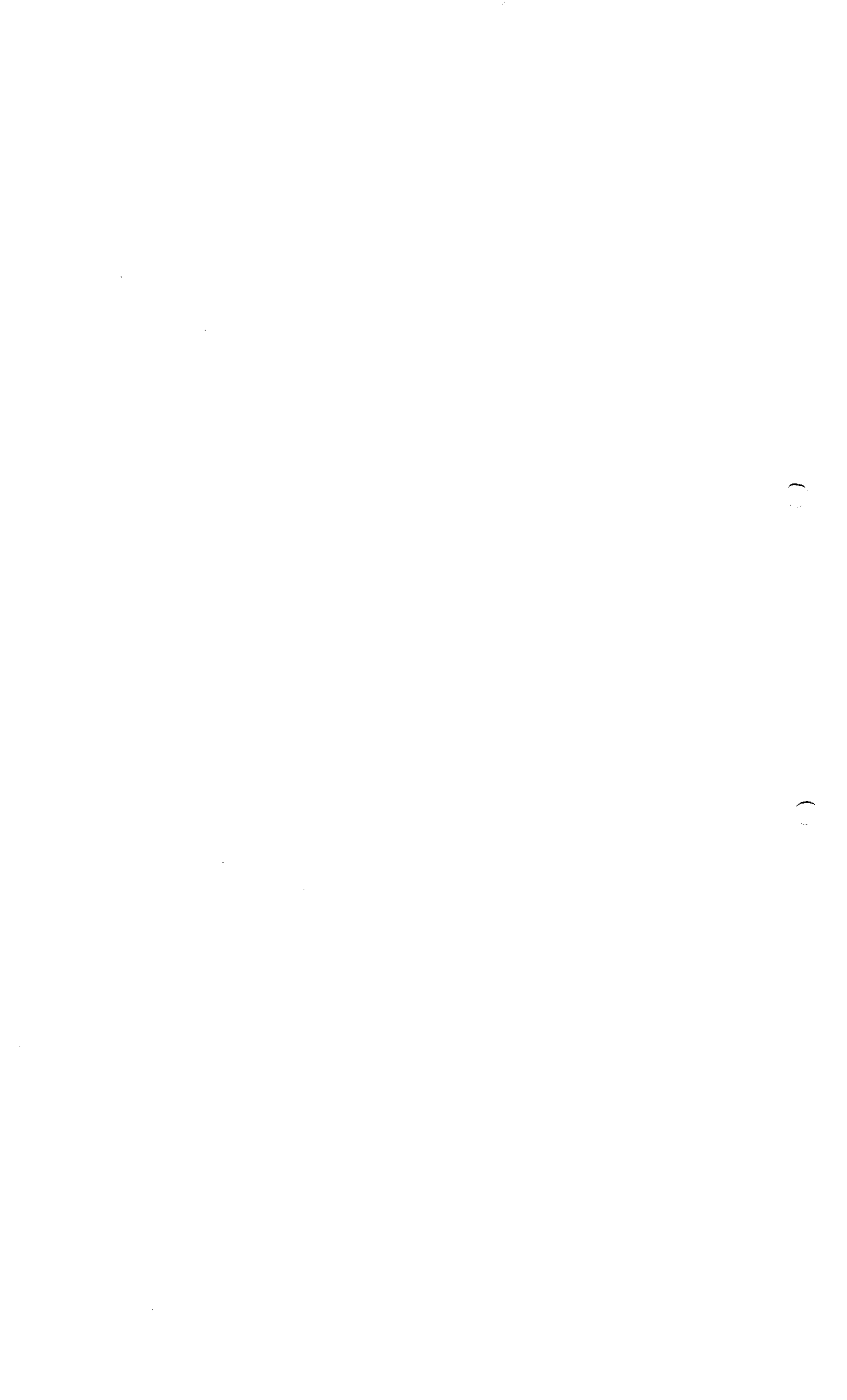
El medio mínimo esencial de Eagle (MEME-45), la solución de sulfato de neomicina, la solución salina con búfer de fosfato (PBS), el estabilizador PGS y la solución salina balanceada de Hanks (1X HBSS) son formuladas en Merck & Company, Inc. (Merck). Para formular estos medios, los componentes liberados individualmente se pesan y formulan en soluciones. Cada solución posteriormente se esteriliza por filtración, empleándose filtros de 0.2-µm y llevándose a contenedores previamente esterilizados en un ambiente de Clase 100.

MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.

Fam. MARIA CECILIA CAMPOS
DIRECTORA TÉCNICA
MATRICULA NACIONAL 12374

MERCK SHARP & DOHME ARGENTINA INC.

Dr. SANTIAGO RODRIGUE
DIRECTOR APODERADO PARA
ASUNTOS MEDICOS Y REGULATORIOS
MAT. NAC. 51.525



Antes de usarse en la manufactura, el suero bovino fetal (FBS) y la tripsina-citrato al 0.25% (tripsina en citrato 0.25% (p/v)), se irradian con luz ultravioleta (irradiación UV), se combinan en una fuente y se esterilizan por filtración en Merck. Todos los filtros deben pasar una Ensayo de integridad posterior a su uso.

Todos los medios de cultivo son considerados soluciones de inicio empleadas en la manufactura de vacunas a granel.

2.3.1.2 Medios de cultivo comprados

El Medio E Modificado de Williams con 4mM MgSO₄ (WMEM); el suero bovino fetal gama (γ)-irradiado y enriquecido con hierro (BCS), el Medio Basal de Eagle con Sales de Earle (EBME) enriquecido con bicarbonato de sodio 2.2 g/L; y la L-glutamina son preparados por vendedores aprobados. El MEME-45 se puede preparar a través de un vendedor aprobado o en Merck. Se realizan auditorías a los proveedores, a fin de mostrar que: todas las materias primas y los componentes de envase empleados en la fabricación de medio de cultivo o suplementos provengan de fuentes confiables y se almacenen y prueben antes de usarse; también se comEnsayo que exista un control adecuado en el proceso de manufactura; que se realicen adecuadamente Ensayos de control de calidad; y que el almacenamiento de producto terminado y el embarque sean satisfactorios.

En cada caso, el vendedor formula la materia prima para preparar el medio de cultivo que posteriormente se esteriliza por filtración y se dispensa asépticamente en envases esterilizados de antemano. Antes de poder liberar un lote, los filtros esterilizadores deben pasar una Ensayo de integridad después de usarse. Durante la dispensación, el departamento de control de calidad del vendedor toma muestras. Después de pasar satisfactoriamente las Ensayos del vendedor, el medio de cultivo se enviará a Merck, previa solicitud. Un subconjunto de las Ensayos realizadas por el vendedor se llevan a cabo en Merck, usando una alícuota del lote para establecer la identidad y utilidad antes de su uso en la manufactura.

2.3.1.3 Preparación final

Todos los medios de cultivo celular se preparan usando componentes que para liberarse deben ser estériles. Las adiciones finales a los medios de cultivo se realizan en cuartos de Clase 100, en el sitio de manufactura, usando técnicas asépticas. Los medios formulados se esterilizan por filtración de 0.2 μm

MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.

F. M. MARIA CECILIA CAMPOS
DIRECTORA TÉCNICA
MATRICULA NACIONAL 12374

MERCK SHARP & DOHME ARGENTINA INC.

Dr. SANTIAGO RODRIGUE
DIRECTOR APODERADO PARA
ASUNTOS MEDICOS Y REGULATORIOS
MAT. NAC. 51.525



antes de entrar a los procesos de cultivo. Todos los filtros deben pasar una Ensayo de integridad después de usarse.

2.3.1.4 Almacenamiento de medio de cultivo

Los medios esterilizados por filtración se almacenan a las temperaturas especificadas, en envases cerrados, hasta su liberación para manufactura. Los medios de cultivo liberados se transportan al área de manufactura y se almacenan en cuartos de Clase 100,000 hasta ser empleados. Los contenedores de medios se limpian con desinfectante antes de ser transportados hacia el área de manufactura.

2.3.1.5 Componentes de origen animal

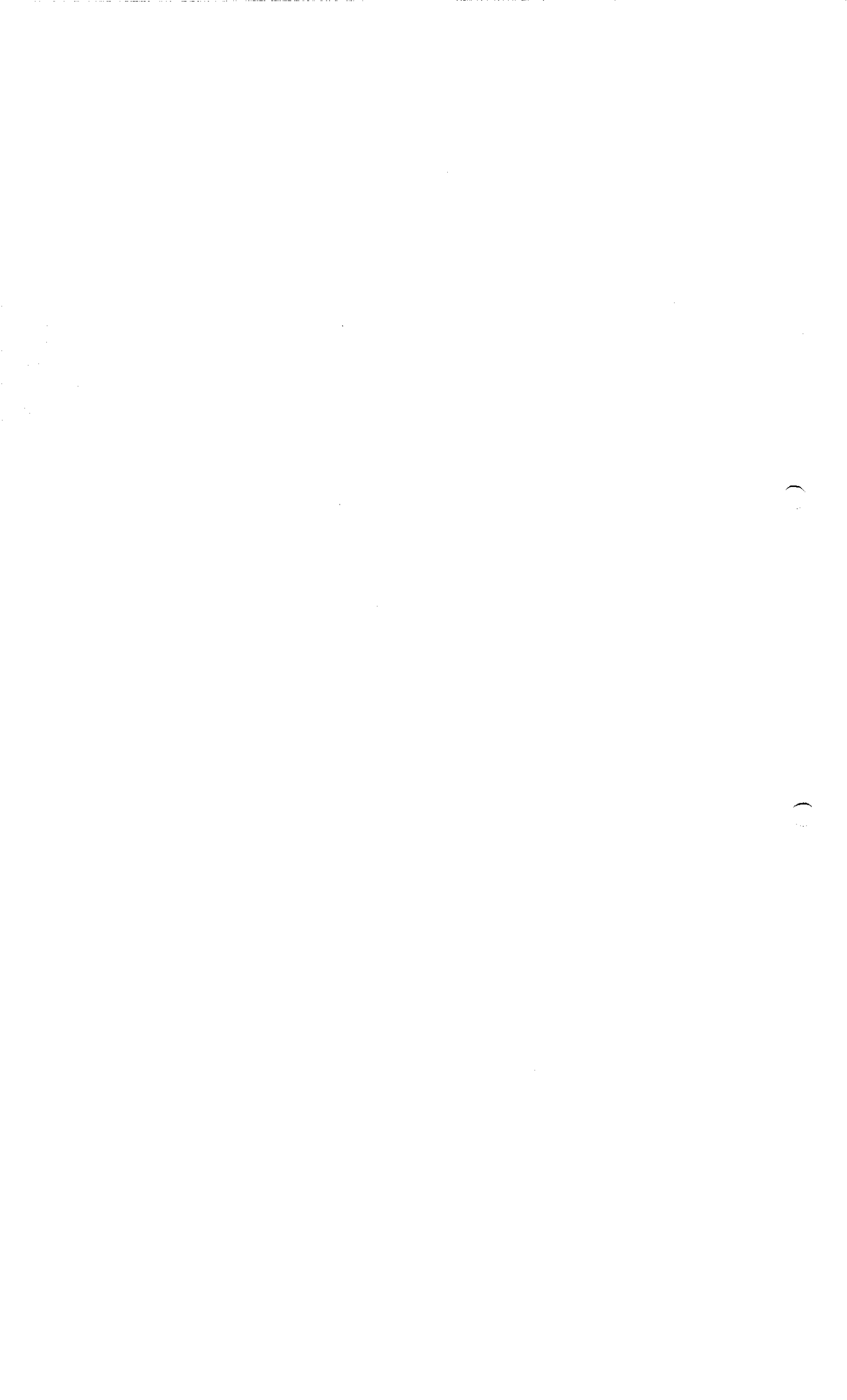
Las materias primas de origen animal empleadas en la fabricación de la vacuna a granel incluyen Suero Bovino Fetal enriquecido con Hierro (BCS), Suero Bovino Fetal (FBS), tripsina pancreática porcina 1:250 (1 unidad USP: 250 mg), gelatina de piel porcina hidrolizada ácida (gelatina procesada) y clorhidrato de L-cisteina monohidratado, diclorhidrato de L-cistina y dihidrato disódico de L-tirosina.

Las materias empleadas en la producción de la vacuna a granel cumplen con los requerimientos establecidos en la Agencia Europea para la Evaluación de Productos Medicinales (EMA) *Nota a los lineamientos para reducir al mínimo el riesgo de transmitir agentes de encefalopatía espongiforme de animales vía productos medicinales humanos y veterinarios (EMA/410/01, rev. 2)* y *Nota a los lineamientos sobre el uso de suero bovino en la fabricación de productos medicinales biológicos para seres humanos (CPMP/BWP/1793/02)*, así como en las recomendaciones 1993, 1996, 1997 y 2000 de la Agencia para Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (U.S. FDA) respecto a los pasos necesarios para reducir el riesgo potencial de transmitir agentes infecciosos, que ocasionan encefalopatía espongiforme bovina (BSE).

Todos los proveedores de las materias primas empleadas en la manufacturación de la vacuna a granel deben llenar satisfactoriamente el Cuestionario sobre Procuración y Procesamiento de Materiales de Origen Animal, de la División de Manufactura de Merck, y deberán haber obtenido el status de proveedor aprobado. El cuestionario específicamente resuelve los siguientes puntos clave: si la materia es de origen animal o se produce usando materias de origen animal, el país de origen de los animales, las prácticas para alimentar el rebaño, información sobre inspecciones del gobierno y monitoreo veterinario, así como información sobre la limpieza y uso de las instalaciones (esto es, medidas para evitar la contaminación cruzada).

MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.
Farm. MARTA CECILIA CAMPOS
DIRECTORA TÉCNICA
MATRICULA NACIONAL 12374

MERCK SHARP & DOHME ARGENTINA INC.
Dr. SANTIAGO RODRIGUE
DIRECTOR APODERADO PARA
ASUNTOS MEDICOS Y REGULATORIOS
MAT. NAC. 51.528





Así mismo, Merck realiza auditorías y Ensayos de forma regular en las plantas de los proveedores para asegurar que se cumpla con los estándares de calidad correspondientes. Por otra parte, Merck pide a los proveedores que notifiquen cualquier cambio en el proceso o en la fuente del rebaño. Estos cambios posteriormente son evaluados y la aprobación de los mismos determina si continúa o no vigente el status de proveedor.

2.3.1.5.1 L-Cisteína, L-Cistina y L-Tirosina

El clorhidrato de L-cisteína monohidratado, el diclorhidrato de L-cistina y el dihidrato disódico de L-tirosina se usan en la preparación de WMEM (Medio E modificado de Williams) manufacturado por HyClone Laboratories, Inc. (HyClone; Logan, Utah, U.S.). Estos aminoácidos se extraen de cabello humano cuya fuente es China, Korea e India.

El diclorhidrato de L-cistina y el dihidrato disódico de L-tirosina se usan en la preparación de EBME (Medio basal de Eagle con Sales de Earle) fabricado por BioWhittaker, Inc. (Walkersville, Maryland, U.S.). La L-tirosina se extrae de plumas de ave o piel porcina originadas en Francia y Alemania. La L-cistina se extrae de cabello humano o plumas de ave cuyo origen es China.

El diclorhidrato de L-cistina y el dihidrato disódico de L-tirosina se usan en la preparación del polvo MEME-45 (Medio mínimo esencial de Eagle) manufacturado por HyClone. Ambos se extraen de cabello humano originado en China, Korea e India.

Antes de ser liberados, se Ensayo la esterilidad de los medios WMEM, EBME y MEME-45. Así mismo, estos medios se hacen pasar por filtros esterilizantes de 0.2 μ m antes de usarse. Además de las Ensayos de esterilidad, Merck realiza Ensayos de promoción del crecimiento y toxicidad en estos medios de cultivo y de agente extraño en la vacuna a granel.

2.3.1.5.2 Suero bovino fetal

Actualmente, Merck compra FBS (suero bovino fetal) a HyClone y a JRH Biosciences (Lenexa, Kansas, U.S.). Ambos proveedores cuentan con Certificados de Idoneidad (CoS) emitidos por el Directorado Europeo para la Calidad de las Medicinas (EDQM) para este producto.

MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.

Farm. MARIA GEBILIA CAMPOS
DIRECTORA TÉCNICA
MATRICULA NACIONAL 12874

MERCK SHARP & DOHME ARGENTINA INC.

Dr. SANTIAGO RODRIGUE
DIRECTOR APODERADO PARA
ASUNTOS MEDICOS Y REGULATORIOS
MAT. NAC. 51.628

