

La Ensayo para agente extraño realizada por el proveedor y por Merck se detalla en otra seccion de la presente monografía.

El FBS se irradia con UV antes de usarse en la propagación de cultivo de células. El suero crudo, proveedor, que ha pasado todas las Ensayos de control de calidad (QC) se derrite y mezcla en un tanque de acero inoxidable. El material derretido se hace pasar a través de un pre-filtro de 5 μ m y después por un filtro clarificador de 0.2 μ m, en dirección a un segundo tanque de acero inoxidable. Para el proceso de irradiación UV, el material clarificado se hace pasar por un irradiador líquido de capa delgada, en dirección a un tercer tanque de acero inoxidable. Finalmente, el suero irradiado de UV se hace pasar por un filtro esterilizante de 0.2 μ m y se dispensa en contenedores pre-esterilizados, dentro de una cabina de flujo laminar Clase 100. El suero se congela hasta ser requerido para la manufactura.

Los estudios de validación para la irradiación UV efectuados por un laboratorio contratado, usando virus modelos representativos, han demostrado la reducción de virus potencialmente encontrados en el suero bovino. En resumen, las Ensayos realizadas en el suero bovino fetal, así como la verificación de las fuentes y las medidas de inactivación validadas, aseguran la seguridad y utilidad del suero para emplearse en la fabricación de vacunas.

2.3.1.5.3 Gelatina porcina hidrolizada

La gelatina hidrolizada derivada de fuente porcina se usa como componente de la formulación estabilizadora para la vacuna zóster. La gelatina es manufacturada por DynaGel Inc. (Chicago, Illinois, U.S.) y se vende bajo el nombre comercial de SOL-U-PRO. Esta gelatina tiene su origen en pieles de cerdo obtenidas de plantas empacadoras de carne inspeccionadas por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA). Las pieles de cerdo enjuagadas se trituran y tratan con ácido clorhídrico por 6 horas. Las pieles se lavan para retirar la grasa y después se someten a dos extracciones con agua a temperaturas cada vez más elevadas: 54°C y 66°C. El fluido de la segunda extracción se filtra a través de un lecho de tierra diatomácea. El filtrado se evapora al vacío para alcanzar un contenido de sólidos del 40% y subsecuentemente se hidroliza con papaína en una solución de bisulfito sódico. La papaína se inactiva por calentamiento a 91°C durante 30 minutos. Esta materia posteriormente se filtra y es secada por atomización.

En otra seccion de la presente monografía se muestra el ensayo para agentes extraños realizada en esta materia prima.

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. 81.625



2.3.1.5.4 Tripsina pancreática porcina

La tripsina en polvo 1:250 (1 unidad USP:250 mg) es fabricada por Intergen Biomanufacturing Corporation (IBC; Toronto, Ontario, Canadá). El producto manufacturado es reacondicionado y distribuido por Life Technologies Inc. (LTI; Grand Island, Nueva York, EE.UU.). Esta es la misma tripsina que se usa en la manufactura de M-M-R™II, VARIMAX™ y VAQTA™¹.

¹ M-M-R, VARIVAX y VAQTA son marcas registradas de Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, New Jersey, EE.UU

Los páncreas porcinos inspeccionadas por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA), se convierten en hojuelas y posteriormente se extraen con ácido. El extracto se trata a un pH neutro para inactivar la proenzima tripsinógeno. Se usa sulfato de amonio para precipitar la tripsina. La solución se centrifuga para formar una capa de sedimento de manera que el precipitado pueda recolectarse. El material recolectado se extrae adicionalmente con alcohol isopropílico, y la solución vuelve a centrifugarse. La pastilla final se seca en un horno al vacío. El material seco se muele para aumentar la homogeneidad antes de mezclar con lactosa a un nivel objetivo de actividad por unidad de masa. El material pulverizado ha sido γ -irradiado antes del paso final de mezclado. En otra sección de la presente monografía se proporciona información sobre la Ensayo para agente extraño en la materia prima. Así mismo, la solución de tripsina resuspendida se irradia con UV en Merck, como parte del proceso de manufactura. La irradiación con UV ha sido validada para reducir eficazmente la carga de virus en la solución de tripsina.

Adicionalmente, se usa lactosa, derivada de leche bovina, durante la manufactura de la tripsina. La EMEA en su *Nota a los lineamientos para reducir al mínimo el riesgo de transmitir agentes de encefalopatía espongiforme de animales vía productos medicinales humanos y veterinarios* (EMEA/410/01, rev. 2) excluye a la leche, lana y derivados de cabello. La FDA de EE.UU. ha indicado que no es probable que la leche y los productos lácteos sean susceptibles de transmitir el agente de la EEB. La lactosa se obtiene de animales sanos en EE.UU., de la misma manera que la leche para consumo humano. Ninguna otra materia proveniente de rumiantes se usa en la producción de la lactosa.

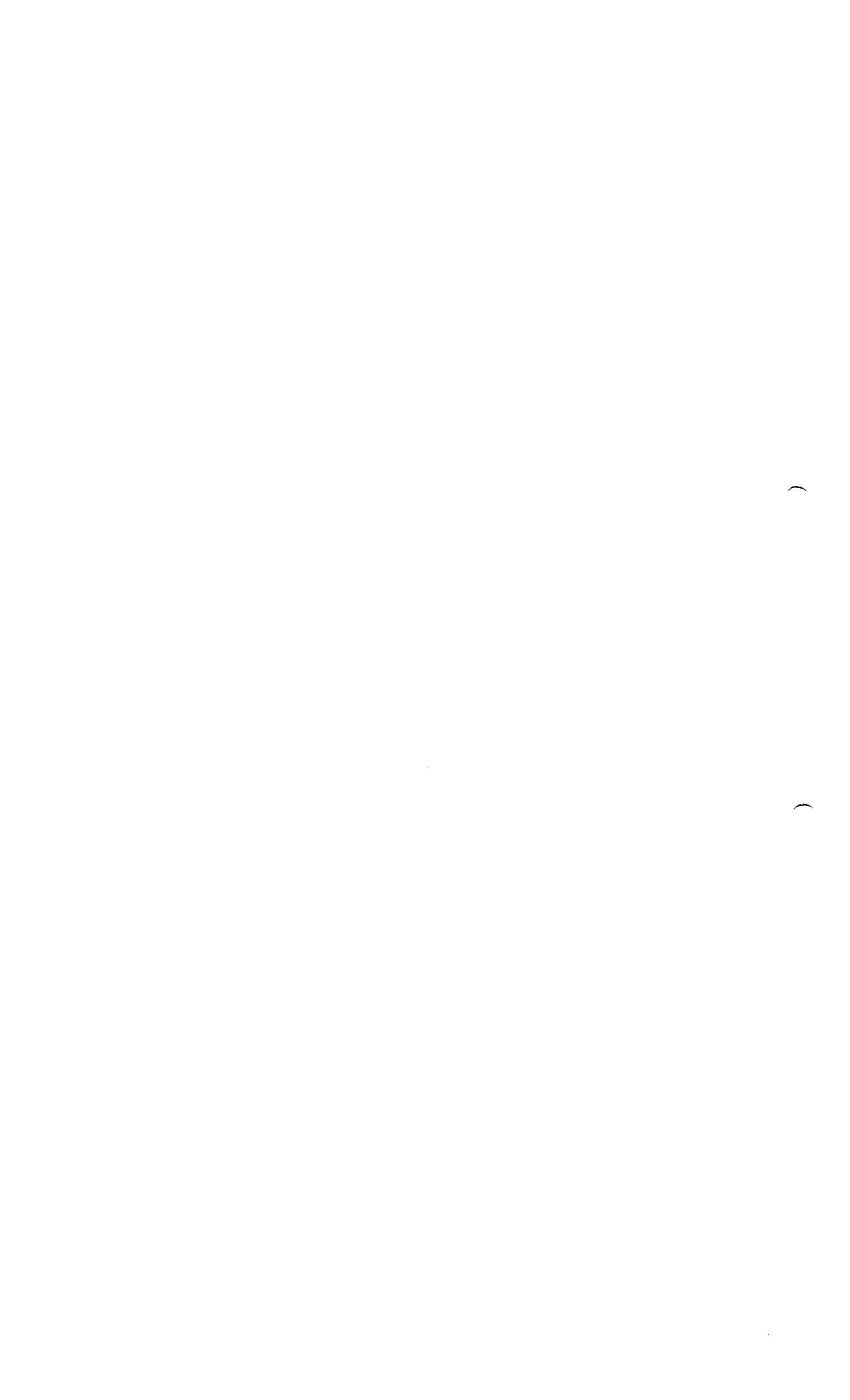
Después de la formulación, la tripsina-citrato al 0.25% se esteriliza por filtración usando un filtro de 0.2 μ m. Después de la filtración, se practica una Ensayo de integridad post-uso en el filtro, a fin de asegurar

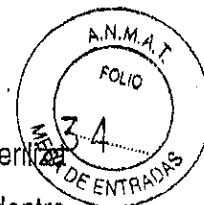
MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.

FARM. MARIA DECILIA CAMPOS
DIRECTORA TÉCNICA
MATRICULA NACIONAL 12374

MERCK SHARP & DOHME ARGENTINA INC.

Dr. SANTIAGO RODRIGUE
DIRECTOR APODERADO PARA
ASUNTOS MEDICOS Y REGULATORIOS
MAT. NAC. 51.523





que el filtro haya estado intacto. La solución se irradia con UV en Merck como parte del proceso de manufactura y, después de mezclarse para formar una fuente, se esteriliza nuevamente por filtración usando un filtro de 0.2 μ m y se dispensa en envases pre-esterilizados, dentro de una área de llenado de Clase 100. La irradiación UV ha sido validada para reducir eficazmente la carga de virus en las soluciones de tripsina.

2.3.1.5.5 Suero bovino fetal enriquecido con hierro

El suero bovino fetal (SBF) se obtiene de HyClone y de JRH BioSciences. Ambos proveedores cuentan con Certificados de Idoneidad del EDQM para este producto. Cada proveedor realiza Ensayos de seguridad exhaustivos antes de que el suero sea γ -irradiado y antes de la liberación de cada lote. Los proveedores realizan la Ensayo para agentes extraños de acuerdo con los requerimientos del *Código de Regulaciones Federales* de EE.UU. (9 CFR 113.53) y reportan la ausencia de estos agentes en sus Certificados de Análisis.

La γ -irradiación del SBF, antes de usarse para células de cultivo, proporciona mayor seguridad de que no haya presentes agentes extraños. La irradiación gama directamente modifica el ADN y ARN por ionización de los ácidos nucleicos, dando por resultado la escisión de la cadena y/u otras modificaciones en las bases. La radiación ionizante también produce otros productos intermedios reactivos de otras proteínas, lípidos y moléculas pequeñas, mismos que pueden reaccionar con el ADN o ARN y dañar indirectamente los ácidos nucleicos genómicos. Tanto JRH como HyClone usan plantas inspeccionadas por la FDA, operadas por ISOMEDIX, Inc. (Libertyville, Illinois y Salt Lake, Utah, EE.UU.) para la γ -irradiación del suero. ISOMEDIX, Inc. ha realizado estudios de mapeo de dosis para validar los ciclos de irradiación empleados por ambos proveedores de suero. Estos estudios se repiten anualmente. ISOMEDIX, Inc. incluye dosímetros de referencia con cada irradiación de suero, a fin de asegurar una dosis consistente en cada corrida. Los estudios de validación realizados usando virus modelo representativos han demostrado la reducción de virus que potencialmente se encuentran en el suero bovino.

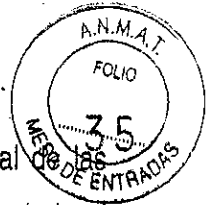
2.3.2 Substrato celular - Sistema de Banco de Células MRC-5

La vacuna se propaga en células MRC-5, una línea celular de fibroblastos de pulmón de embrión humano (diploides, macho) originalmente aislada por J.P. Jacobs en el Instituto Nacional de Investigación Médica, Londres, Inglaterra y depositada en un nivel de duplicación de población (PDL) de aproximadamente 7 en el Instituto Nacional para Estándares y Controles Biológicos (NIBSC) en

MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.
Farm. MARIA DECILIA CAMPOS
DIRECTORA TÉCNICA
MATRICULA NACIONAL 12374

MERCK SHARP & DOHME ARGENTINA INC.
Dr. SANTIAGO RODRIGUE
DIRECTOR APODERADO PARA
ASUNTOS MEDICOS Y REGULATORIOS
MAT. NAC. 41625





Hertfordshire, Inglaterra. El repositorio del NIBSC es un recurso único y es la fuente original de las células MRC-5. Las células MRC-5 de esta fuente han sido probadas por muchos grupos en todo el mundo y se han usado con seguridad para preparar vacunas por décadas para millones de personas.

En septiembre de 1994, se estableció un banco de células madres (MCB) de células MRC-5 cuyo origen fue el NIBSC, a fin de establecer un sistema de banco de células de dos capas en Merck. Las células del NIBSC fueron transferidas dos veces, produciendo 123 frascos de MCB de MRC-5 a una PDL de aproximadamente 15. Cada frasco de MCB de MRC-5 es suficiente para plantar un banco de células de trabajo del fabricante (MWCB) con un nivel de duplicación de población (PDL) de aproximadamente 26. El PDL de las células MRC-5 expandidas a partir del MWCB de MRC-5 para fabricación de vacuna tiene un PDL aproximado de 40, usando el sistema de dos niveles. El PDL 40 está significativamente por debajo del PDL de senescencia aproximado de 89, establecido para el banco de células madres MRC-5.

2.3.2.1 Banco de células madres MRC-5

2.3.2.1.1 Certificación del Banco de células madres MRC-5

Las células del Banco de células madres MRC-5 fueron subcultivadas hasta el nivel PDL de banco de trabajo (29-34) para demostrar seguridad y ausencia de agentes extraños. De ahí en adelante, las células se subcultivaron a intervalos de 4-6 días hasta que las células alcanzaron senescencia (aproximadamente PDL 89) usando procedimientos de cultivo, equipo y reactivos similares a los procesos de la vacuna.

2.3.2.1.2 Ensayo de control analítico para el Banco de células madres MRC-5

En otra sección de la presente monografía, se encuentran las descripciones de los procedimientos de control analítico realizados en el Banco de células madres MRC-5, excepto por las Ensayos de seguridad para cobayos y conejo, Ensayo de tumorigénesis, Ensayo de embrión de huevo (ruta de saco vitelino) y Ensayo de bacteriófagos que se describen a continuación. (estas Ensayos aplican también al Banco de células de trabajo del fabricante MRC-5).

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. 61.525

2.3.2.1.2.1 Procedimiento de control 9110.338: Ensayo de seguridad para Bancos de células de trabajo en animales

El procedimiento CP 9110.338, Ensayo de seguridad para Bancos de células de trabajo-en animales, es una Ensayo de seguridad realizada en células diploides humanas (HDC) y en líneas celulares continuas de MWCB u otras fuentes. El procedimiento Ensayo la presencia de agentes extraños al inocular la suspensión de células en cobayos, conejos y ratones adultos y ratones lactantes.

Muestras para la Ensayo:

Banco de células madres MRC-5

Banco de células de trabajo del fabricante MRC-5

Referencias y controles:

Control negativo: Medio de cultivo MRC-5

Líneas celulares y animales para la Ensayo:

Ratones adultos (*Mus musculus*), albinos, 15-20 g

Ratones lactantes (*Mus musculus*), albinos, <24 horas de edad

Cobayos (*Cavia porcellus*), albinos Hartley, de cualquier sexo, 350-450 g

Conejos (*Oryctolagus cuniculus*), blancos de Nueva Zelanda, de cualquier sexo, 1.5-2.5 kg

Procedimiento:

Para las Ensayos en ratones adultos y lactantes se usan suspensiones de células de 1×10^7 células/ml; y para las Ensayos en cobayos y conejo se usan suspensiones de células de 2×10^6 células/ml. Cada animal se pesa antes de iniciar la Ensayo, a fin de confirmar el rango de peso adecuado. Se administra una inyección intramuscular en el flanco posterior, consistente en 0.1 ml de la suspensión de células 1×10^7 , a cada ratón adulto y lactante. A los cobayos y conejos se les administra una inyección de 0.5 ml en cada pata trasera para una inoculación total de 1.0 ml de suspensión de células 2×10^6 . Los animales que sirven como control negativo reciben una inyección con medio de cultivo MRC-5.

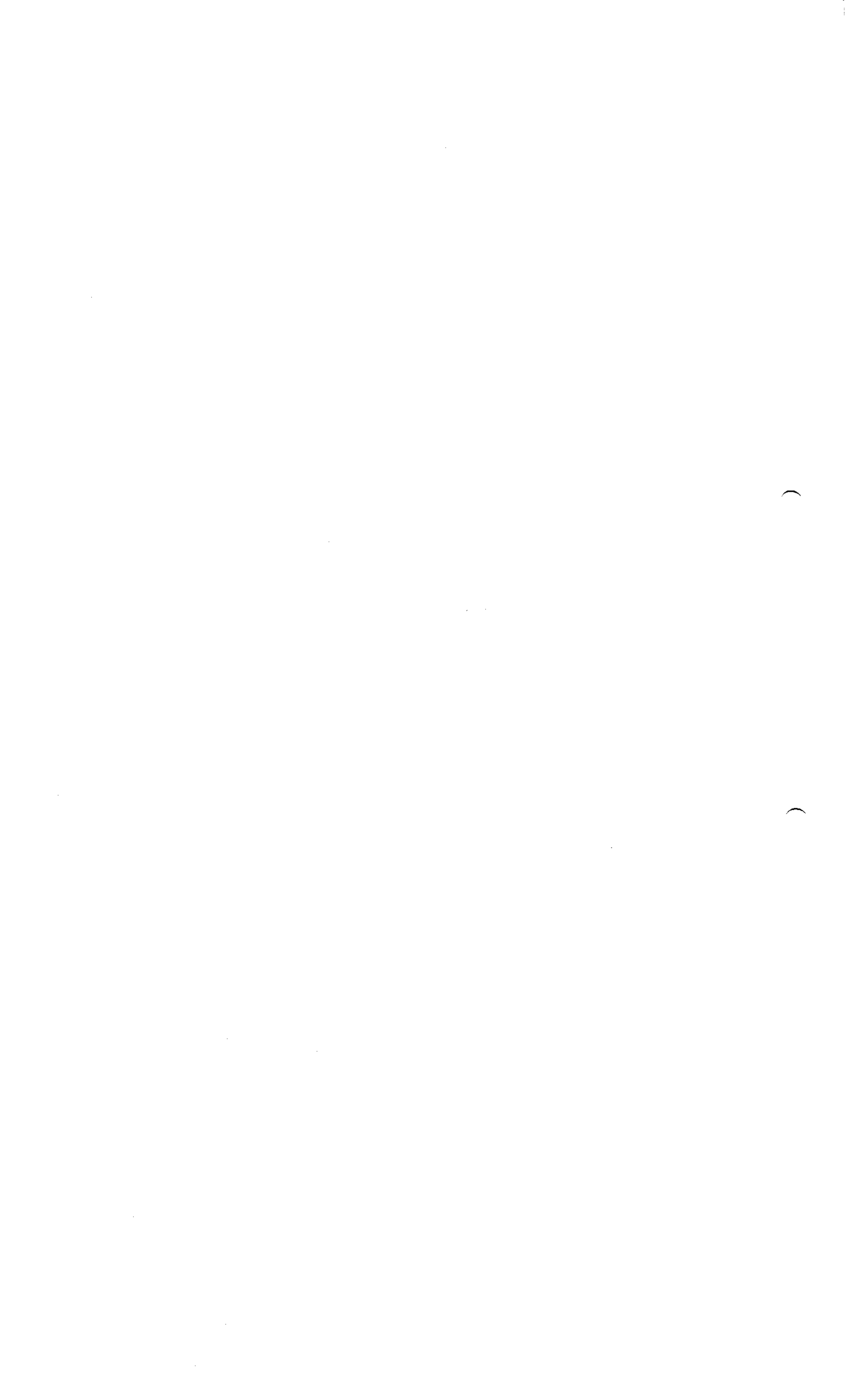
Todos los animales son observados por 28 días; las observaciones y muertes quedan registradas. Los animales que mueren durante la Ensayo debido a enfermedad o lesión son evaluados en busca de evidencia de cualquier condición patológica que pueda ser atribuida a la suspensión de células

MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.

FAMILIA MARIA CESILIA CAMPOS
DIRECTORA TÉCNICA
MATRÍCULA NACIONAL 12374

MERCK SHARP & DOHME ARGENTINA INC.

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



inyectada. Al término de la Ensayo, todos los animales son sacrificados por eutanasia y se les practica la autopsia.

La Ensayo es satisfactoria si $\geq 80\%$ de cada uno de los cuatro grupos de animales de Ensayo sobreviven al período de observación y ningún animal muestra evidencia de una condición patológica atribuible a la suspensión de células inyectada. Todas las Ensayos consideradas como no válidas se investigan y las conclusiones se documentan en el registro de Ensayo.

Cumplimiento de Regulaciones Internacionales:

El procedimiento CP 9110.338 ha sido revisado contra requerimientos y lineamientos regulatorios de todo el mundo y es consistente con:

Ph. Eur. *Farmacopea europea*, 5.2.3. Substratos de células para la producción de vacunas para uso humano.

OMS Organización Mundial de la Salud, Serie de reportes técnicos, número 878, 1998, Anexo 1, *Requerimientos para el uso de células animales como sustratos in vitro para la elaboración de productos biológicos* (Requerimientos para sustancias biológicas núm. 50), C.2.3.4

Validación del ensayo:

Este ensayo no ha sido validado debido a que no pueden aplicarse significativamente los parámetros de validación típicos a Ensayos in vivo, como la del procedimiento CP 9110.338. Siguiendo la Política Corporativa 9 de Merck; esto es, la Política Mundial de Merck sobre Cuidado y Uso de Animales, la compañía apoya la investigación de metodologías de Ensayo alternativas, científicamente válidas, y reduce al mínimo el número de animales para investigación al emplear alternativas científicamente válidas que no contemplen la utilización de animales cuando sea posible. En consecuencia, en lugar de la validación, el procedimiento ha sido revisado contra requerimientos y lineamientos regulatorios de todo el mundo (Tabla: 3) para asegurar el cumplimiento a todas las regulaciones pertinentes.

MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.

Farm. MARIA DECILIA 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 3: Ensayo de seguridad para Bancos de células de trabajo en animales: Comparación de requerimientos y lineamientos regulatorios de todo el mundo

| Parámetro | Procedimiento de control 9110.338 | Organización Mundial de la Salud | Farmacopea Europea |
|----------------------------------|--|---|---|
| Número y tipo de animal | Ratones adultos = 10 Ratones lactantes = 10 (<24 horas de edad, de 2 camadas) Cobayos = 5 Conejos = 5 | Igual que el Procedimiento de control 9110.338 | Igual que el Procedimiento de control 9110.338 |
| Rango de peso | Ratones adultos = 15-20 g Ratones lactantes = N/A Cobayos = 350-450 g Conejos = 1.5-2.5 kg | Igual que el Procedimiento de control 9110.338 | No especifica rangos de peso |
| Vía de la inyección | Intramuscular, flanco posterior | Intramuscular | Intramuscular, o subcutánea profunda para los ratones lactantes |
| Dosis | Ratones = 1×10^6 células cada uno Cobayos = 2×10^6 células cada uno Conejos = 2×10^6 células cada uno | $\geq 1 \times 10^7$ células divididas equitativamente entre los animales de cada grupo | $\geq 1 \times 10^7$ células divididas equitativamente entre los animales de cada grupo |
| Volumen inyectado (Por animal) | Ratones = 0.1 ml Cobayos = 2×10^6 células cada uno Conejos = 2×10^6 células cada uno | No se especifica | No se especifica |
| Etapas del producto en la Ensayo | Banco de células madres, banco de células de trabajo del fabricante, o líneas celulares continuas | Banco de células madres y banco de células de trabajo del fabricante | Banco de células de trabajo del fabricante |

| Días de la Ensayo | 28 días | 4 semanas | 4 semanas |
|---|--|---|---|
| Validez de la Ensayo y parámetros de aprobación/fracaso | La Ensayo es satisfactoria si $\geq 80\%$ de cada uno de los cuatro grupos de Ensayo en animales sobreviven al periodo de observación y ningún animal muestra evidencia de una condición patológica atribuible a las células | $\geq 80\%$ de cada grupo de animales deben sobrevivir y permanecer sanos; sin evidencia de agentes extraños en las células | $\geq 80\%$ de cada grupo de animales deben sobrevivir y permanecer sanos; sin evidencia de agentes extraños en las células |
| Control negativo | Ratones = 5 adultos, 5 lactantes Cobayos = 2 Conejos = 2 | No se especifica ninguno | No se especifica ninguno |

Conclusión:

El procedimiento CP 9110.338 satisface los requerimientos de la *Farmacopea Europea (Ph. Eur.)* y de la Organización Mundial de la Salud (OMS), Serie de Reportes Técnicos, núm. 878, 1998, Anexo I, *Requerimientos para el uso de células animales como substratos in vitro para la elaboración de productos biológicos* (Requerimientos para sustancias biológicas núm. 50).

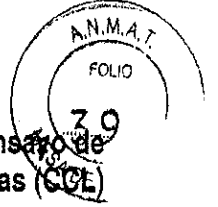
MERCK SHARP & DOHME ARG. INC

Fam. MARIA DECILIA CAMPOS
DIRECTORA TÉCNICA
MATRICULA NACIONAL 12374

MERCK SHARP & DOHME ARGENTINA INC.

Dr. SANTIAGO RODRIGUE
DIRECTOR APODERADO PARA
ASUNTOS MEDICOS Y REGULATORIOS
MAT. NAC. 51.526





2.3.2.1.2.2 Procedimiento de control 9110.700: Procedimiento de 12 semanas para Ensayo de tumorigénesis en cultivos de células diploides humanas (HDC) y líneas celulares continuas (CCL)

La Ensayo CP 9110.700, Procedimiento de 12 semanas para Ensayo de tumorigénesis en cultivos de células diploides humanas (HDC) y líneas celulares continuas (CCL) se realiza para evaluar el potencial tumorigénico de las células MRC-5 cuando se Ensayon en ratones atímicos inmunodeficientes.

Muestras para la Ensayo:

Banco de células madres MRC-5

Banco de células MRC-5

Referencias y controles:

Control positivo: células HeLa de células epiteliales con adenocarcinoma (*Homo sapiens*)

Control negativo: medio de cultivo

Líneas celulares y animales de Ensayo:

Ratones desnudos, desnudos atímicos, de 6 a 8 semanas de edad, hembras

Procedimiento:

Un grupo de treinta ratones se inyecta subcutáneamente en el centro del abdomen con 0.2 ml de 5×10^7 células/ml o 1×10^7 células/ratón. Treinta ratones del grupo de control negativo se inyectan subcutáneamente en el centro del abdomen con 0.2 ml de medio de cultivo. Diez ratones del grupo de control positivo se inyectan subcutáneamente en el centro del abdomen con 0.2 ml de 5×10^6 células/ml o 1×10^6 células/ratón. Los animales son observados por 84 días y se palpan e inspeccionan visualmente a intervalos programados durante toda la Ensayo. Un subgrupo de los animales de Ensayo y de control negativo se somete a eutanasia y se les practica la autopsia a intervalos de tiempo intermitente (21, 42 y 84 días) a lo largo de todo el período de observación. En caso de una enfermedad aparente o el desarrollo de nódulos ulcerosos o largos, los animales se pueden retirar de la Ensayo antes de lo planeado. A los animales que se retiran tempranamente se les hace la autopsia. Al término del período de observación, todos los animales sobrevivientes se someten a eutanasia y se les practica la autopsia. Una muestra de la Ensayo es satisfactoria si al menos el 80% de los ratones en cada grupo de Ensayo sobrevive al período de Ensayo de dicho grupo (21, 42 u 84 días) y al menos el 90% de los animales de control positivo muestran evidencia de desarrollo progresivo de tumor, confirmado por autopsia y examen histopatológico.

MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.

Fam. MARIA DECILIA 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



Cumplimiento de Regulaciones Internacionales:

El procedimiento CP 9110.700 ha sido revisado contra requerimientos y lineamientos regulatorios de todo el mundo y es consistente con:

- CFR *Código 21 de Regulaciones Federales Parte 610.18(cXii)*
 - CBER PTC *Puntos a considerar en la caracterización de líneas celulares empleadas para elaborar productos biológicos (1993), Centro de evaluación e investigación biológica*
 - ICH *Conferencia Internacional sobre Armonización de Requerimientos Técnicos para el Registro de Productos Farmacéuticos de Uso Humano, Lineamientos tripartitas armonizados de la ICH, Derivación y caracterización de substratos celulares usados para la elaboración de productos biotecnológicos/biológicos, 1997, Sección 2.3.4.*
- Ph. Eur. *Farmacopea Europea, 5.2.3. Substratos celulares para la elaboración de vacunas para uso humano*

Validación del ensayo:

Los parámetros de validación típicos no son aplicables a este CP debido a que no pueden aplicarse significativamente a Ensayos in vivo; por tal motivo, este ensayo no ha sido validado. Siguiendo la política de Merck, la compañía apoya la investigación de metodologías de Ensayo alternativas, científicamente válidas, y reduce al mínimo el número de animales para investigación al emplear alternativas científicamente válidas que no contemplen la utilización de animales cuando sea posible. En consecuencia, en lugar de la validación, el procedimiento ha sido revisado contra requerimientos y lineamientos regulatorios de todo el mundo. El procedimiento es consistente con los siguientes requerimientos regulatorios en vigor: *21 CFR Parte 610.18(cXii)*; *Puntos a considerar (PTC) en la caracterización de líneas celulares empleadas para elaborar productos biológicos (1993)* del CBER; la *Conferencia Internacional sobre Armonización de Requerimientos Técnicos para el Registro de Productos Farmacéuticos de Uso Humano*, Lineamientos tripartitas armonizados de la ICH, Derivación y caracterización de substratos celulares usados para la elaboración de productos biotecnológicos/biológicos, 1997, Sección 2.3.4; y la *Farmacopea Europea, 5.2.3 Substratos celulares para la elaboración de vacunas para uso humano.*

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. 61.818



Conclusión:

El procedimiento CP 9110.700 cumple con todos los requerimientos regulatorios para la Ensayo de tumorigénesis de cultivos celulares diploides humanos y líneas celulares continuas. Se considera que el banco de células del fabricante MRC-5 y el banco de células MRC-5 son aptos para usarse como muestras en este procedimiento CP.

2.3.2.1.2.3 Procedimiento de control 9110.409: Ensayo de seguridad en embrión de huevo - Fuentes de vacuna de virus humano por ruta alantoica

El procedimiento CP 9110.409, Ensayo de seguridad en embrión de huevo - Fuentes de vacuna de virus humano por ruta alantoica, describe una Ensayo de pureza in-vivo para la detección de agentes extraños. Esta Ensayo se usa para la detección de agentes extraños en productos intermedios de vacuna a granel. Las vacunas de virus vivo y los bancos de células se Ensayon a través de la vía alantoica de huevos de pollo embrionados, debido a que sirven como substrato de crecimiento adecuado para muchos tipos de virus. Esta Ensayo está diseñada para incrementar el crecimiento de agentes extraños, especialmente aquellos capaces de hemaglutinación.

Muestras para la Ensayo:

- Banco de células madres MRC-5
- Banco de células de trabajo del fabricante MRC-5
- Semilla madre
- Semilla de almacenamiento

Referencias y controles:

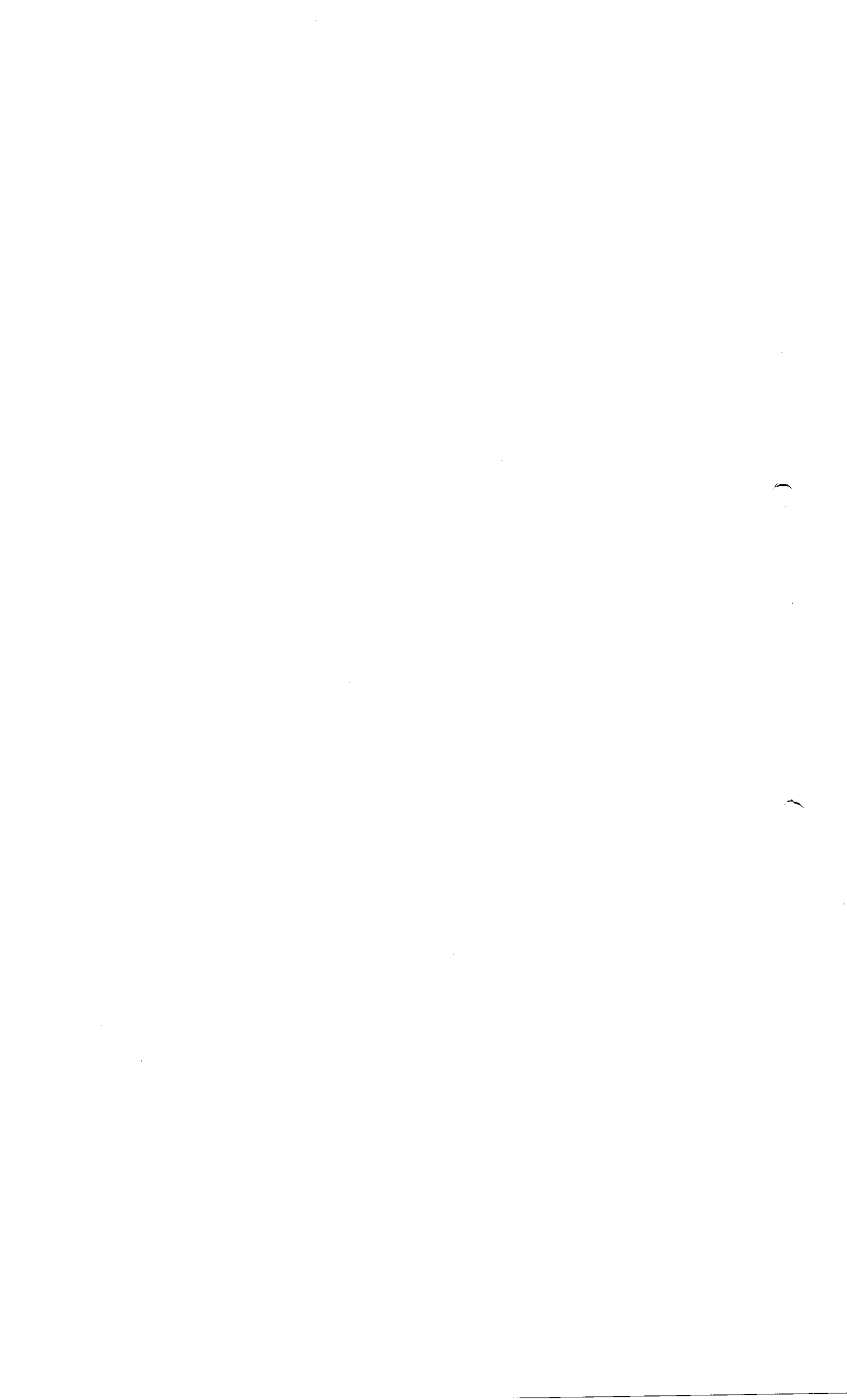
- Controles positivos:
 - Antígeno soluble tipo B del virus de la influenza
 - Fluido alantoico infectado por virus de influenza (A/Guandong/25/93)
- Controles negativos:
 - Huevos de control sin inocular
 - Huevos de control de medio
- Control sérico:
 - Antisuero usado para neutralización

MERCK SHARP & DOHME ARG INC

Firm: 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



Líneas celulares y animales de Ensayo:

Huevos de gallina embrionados, de 10 a 11 días de edad, exentos de patógeno específico, con calidad para investigación, con certificado de estar exentos de virus de anemia del pollo (CAV) (Charles River SPAFAS, Inc., Wilmington, Massachussetts, EE.UU.)

Glóbulos rojos de cobayo, de cobayos de 2 a 4 meses de edad, en Solución de Alsever

Glóbulos rojos de pollo adulto (Charles Rivers SPAFAS, Inc.)

Procedimiento:

Los fluidos alantoicos de huevos embrionados de 10-11 días de edad (30 huevos para las muestras de semilla) se inoculan con 0.5 ml de la muestra. Los huevos se incuban por 3 días a 34-36°C y a una humedad relativa del 50-70%; los huevos se examinan a trasluz aproximadamente a las 24, 48 y 72 horas después de la inoculación. Después del examen a trasluz a las 72 horas, se forman fuentes de 2-5 ml de fluidos alantoicos de cada grupo de 3-5 huevos y se Ensayon posteriormente para virus hemaglutinantes, usando controles positivos y negativos adecuados. Cada una de las fuentes se transfiere a cuatro huevos, usando la vía alantoica. Después de una segunda incubación de 3 días, se forman fuentes con los fluidos alantoicos, de acuerdo con el inóculo inicial, y se examinan los embriones. Las fuentes se Ensayon a dos condiciones de temperatura (temperatura ambiente y 2-8°C) para virus hemaglutinantes con glóbulos rojos de cobayo y de pollo. La muestra es satisfactoria si todas las muertes de huevo (no atribuibles a trauma por inoculación) son negativas para los agentes extraños, no hay evidencia de anomalías gruesas en los embriones y las muestras no exhiben actividad hemaglutinante con los glóbulos rojos de pollo o cobayo a ninguna temperatura.

Cumplimiento de Regulaciones Internacionales:

El procedimiento CP 9110.409 ha sido revisado contra requerimientos y lineamientos regulatorios de todo el mundo y es consistente con:

CBER PTC *Puntos a considerar en la caracterización de líneas celulares empleadas para elaborar productos biológicos (1993), CBER FDA, V.C.1, Ensayos de Control de Calidad, Ensayos para la Presencia de Virus, Ensayos de Rutina para Virus Extraños, p 19*

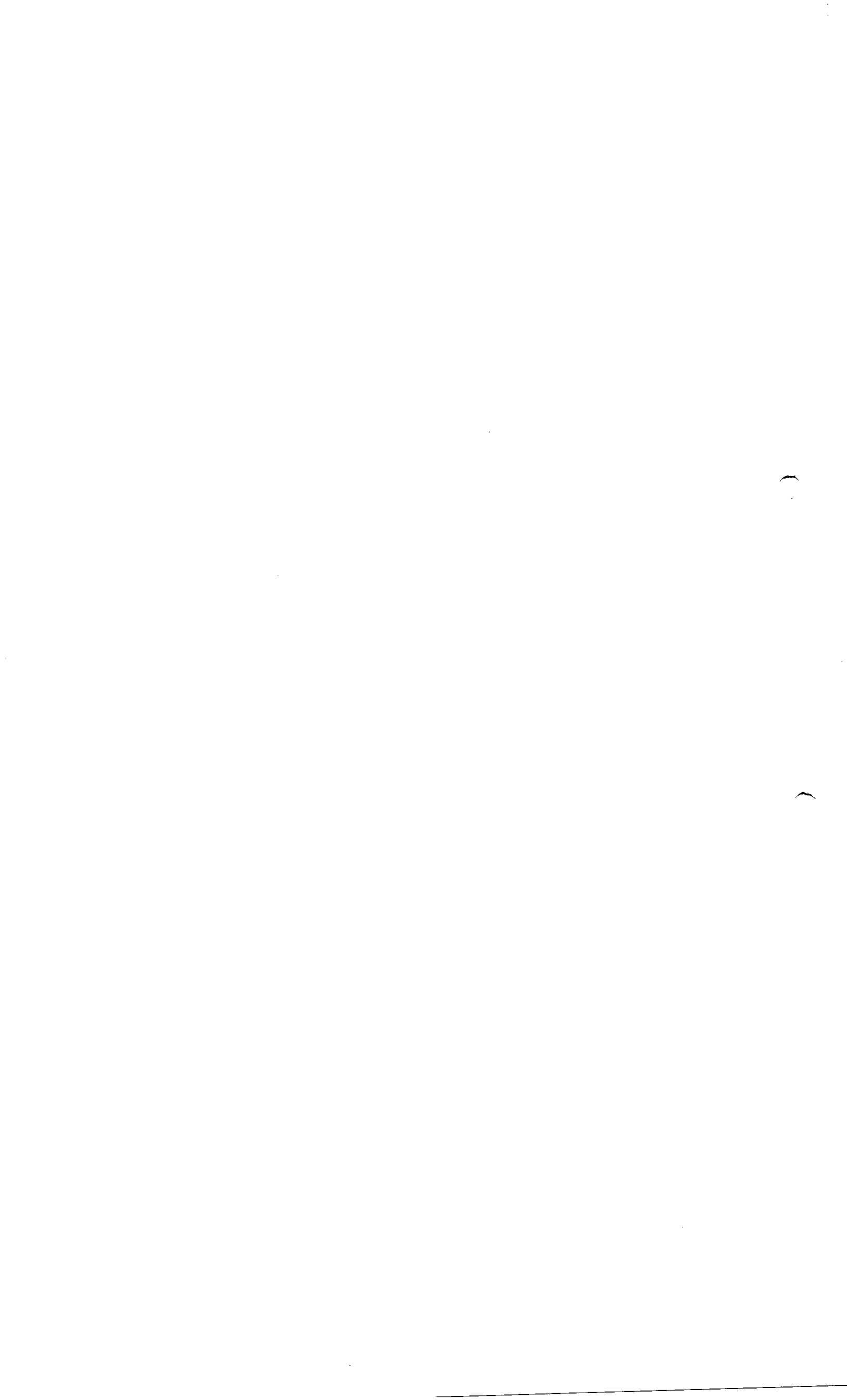
Ph. Eur. *Farmacopea Europea*, 2.6.16. Ensayos para Agentes Extraños en Vacunas Virales para Uso Humano

MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.

FANTI, MARIA BECHIA CAMPOS
DIRECCIONA TECNICA
MATRICULA NACIONAL 12374

MERCK SHARP & DOHME ARGENTINA INC.

Dr. SANTIAGO RODRIGUE
DIRECTOR APODERADO PARA
ASUNTOS MEDICOS Y REGULATORIOS
MAT. NAC. 51.528



Validación del ensayo:

Los parámetros de validación típicos no se pueden aplicar significativamente a la porción in vivo de la Ensayo de huevo; sin embargo, el ensayo de hemaglutinación se validó para los parámetros de especificidad, precisión intermedia y repetibilidad. Adicionalmente otros cambios a la optimización del ensayo se validaron subsecuentemente para hemaglutinación. El ensayo optimizado incluyó el cambio del recipiente de reacción, de un tubo de fondo redondo a una placa de microtitulación de fondo cónico; el cambio del diluyente de solución salina a PBS; y el cambio de volumen del paquete de glóbulos rojos de cobayo de 1.0% a 0.5%.

Todas las muestras probadas no deben exhibir actividad hemaglutinante con glóbulos rojos de pollo o cobayo a temperatura ambiente o a 2-8°C. Las muertes de huevo no atribuidas a trauma por inoculación deben estar exentas de agentes extraños como lo determinarán Ensayos adicionales para contaminación bacteriana o por moho o por sub-paso satisfactorio hacia cuatro huevos sin fluidos alantoicos contaminados.

En la [Tabla 4] se lista un resumen de cada parámetro evaluado durante la validación del método (únicamente ensayo de hemaglutinación). Los parámetros de valoración abordados fueron especificidad, precisión intermedia y repetibilidad. Durante la validación de este ensayo no se evaluaron la exactitud, precisión intra-ensayo, límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ), linealidad, repetibilidad y rango.

MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.

Fam. MARIA-CECILIA CAMPOS
 DIRECTORA TÉCNICA
 MATRICULA NACIONAL 12374

MERCK SHARP & DOHME ARGENTINA INC.

Dr. SANTIAGO RODRIGUEZ
 DIRECTOR APODERADO PARA
 ASUNTOS MEDICOS Y REGULATORIOS
 MAT. NAC. 81.528

