

Tabla 4: Resumen de parámetros evaluados durante la validación del método para el ensayo de hemaglutinación

Parámetro de validación	Criterios de aceptación	Resultado exacto
<b>Precisión Intermedia</b> (Precisión inter-ensayo)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Los datos de los ensayos independientes de una muestra determinada (en condiciones definidas) deben estar dentro de las tres diluciones probadas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Precisión inter-ensayo del 85% dentro de tres diluciones de Ensayo para GR<sup>a</sup> de cobayo a temperatura ambiente</li> <li>Precisión inter-ensayo del 90% dentro de tres diluciones de Ensayo para GR de cobayo a 4°C<sup>b</sup></li> <li>Precisión inter-ensayo del 95% dentro de tres diluciones de Ensayo para GR de pollo a temperatura ambiente y 4°C<sup>b</sup></li> </ul>
<b>Especificidad</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>El fluido alantoico de huevos infectados con virus de influenza produce hemaglutinación.</li> <li>El fluido alantoico no infectado no produce hemaglutinación.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Material de virus de la influenza (inactivado, purificado A/PR/8/34 o B/Mass/3/66) y el virus de la influenza (A/Guandong/25/95) produjo hemaglutinación en fluidos alantoicos.</li> <li>Los controles sin infectar no demostraron hemaglutinación.</li> <li>La optimización durante la validación (que incluyó restricción a una incubación de 2-8 hrs) demostró la especificidad del ensayo.</li> </ul>
<b>Repetibilidad</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Los resultados no deben variar en más de una dilución sencilla al doble por arriba o abajo del título de hemaglutinación.</li> <li>Las variaciones en el tiempo de incubación no deben tener efecto sobre los resultados.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>En cuanto a las cepas de influenza A/PR/34 y B/Mass/3/66, 95% y &gt;80%, respectivamente, estuvieron dentro de una dilución simple al doble por arriba y abajo de los títulos de hemaglutinación.</li> <li>La optimización durante la validación (que incluyó restricción a una incubación de 2-8 hrs) generó resultados de repetibilidad consistentes.</li> </ul>

<sup>a</sup>GR: glóbulos rojos

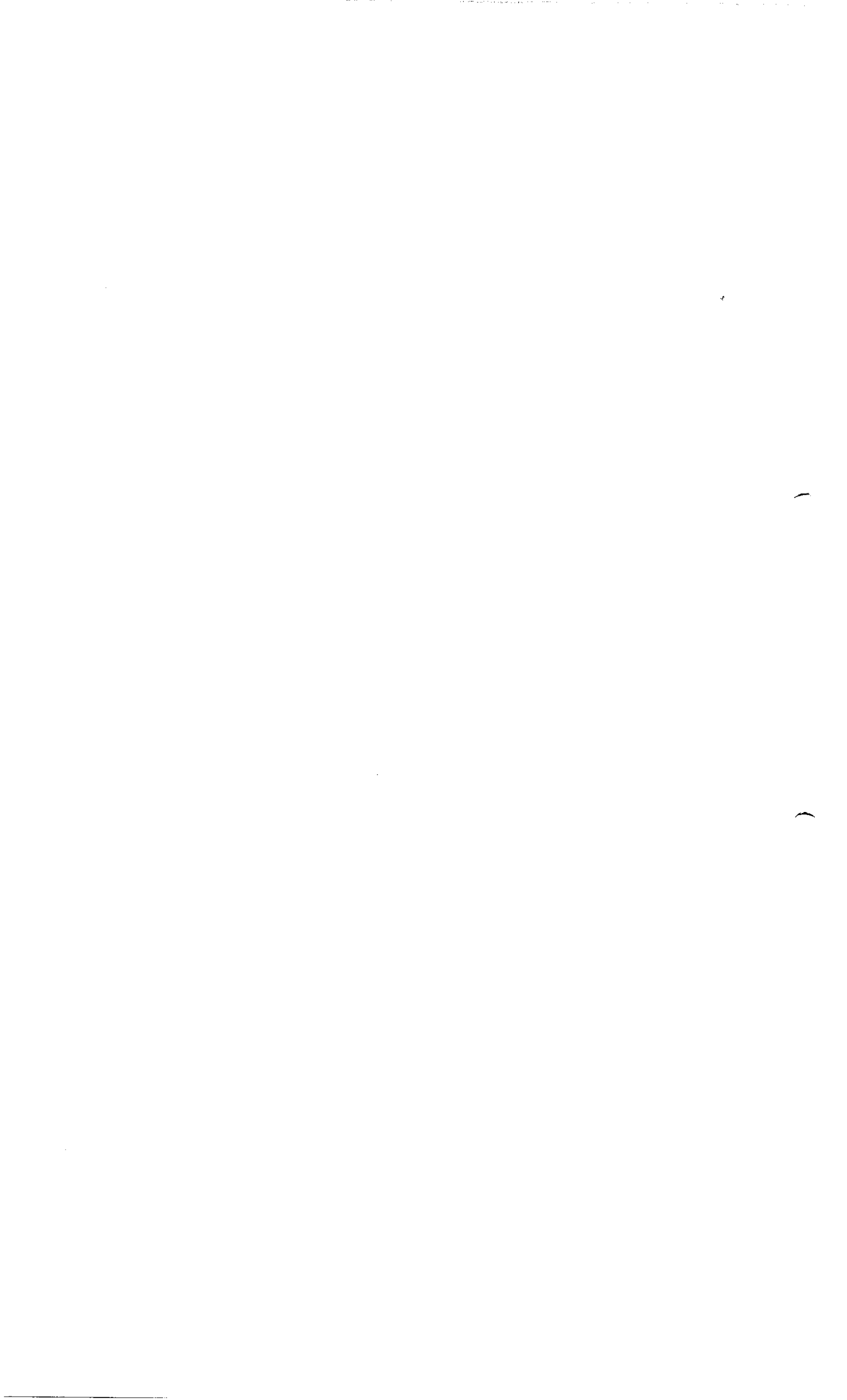
<sup>b</sup>Rango de temperatura exacto: 2-8°C

MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.

Farm. 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. 51.526



**Conclusión:**

El procedimiento CP 9110.409 cumple con todos los requerimientos regulatorios para Ensayo de seguridad con huevos de vacunas de virus vivos vía la ruta alantoica. Se considera que las muestras de Ensayo son adecuadas para usarse en este procedimiento.

**2.3.2.1.2.4 Procedimiento de control 9110.410: Ensayo de seguridad en embrión de huevo Fuentes de vacuna de virus humano por ruta del saco de la yema**

El procedimiento CP 9110.410, Ensayo de seguridad en embrión de huevo - Fuentes de vacuna de virus humano por ruta del saco de la yema, describe una Ensayo de pureza in-vivo para la detección de agentes extraños en producto intermedio de la vacuna a granel. Las vacunas de virus vivo se Ensayon vía la ruta del saco de la yema de huevos de pollo embrionados, debido a que los sacos de la yema sirven como substrato de crecimiento para muchos tipos de virus. Esta Ensayo está diseñada para promover el crecimiento de agentes extraños, especialmente aquellos que son teratogénicos.

**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 negativos: Huevos de control sin inocular  
Huevos de control para inoculación de medio
- Suero control: Antisuero empleado para la neutralización de virus

**Líneas celulares y animales de Ensayo:**

Huevos de pollo embrionados, de 6 a 7 días de edad, con certificación de estar exentos de virus de anemia de pollo (CAV), calidad para investigación y exentos de patógenos específicos (Charles River SPAFAS, Inc.).

MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.

Dr. MARIA CECILIA CAMPOS  
DIRECTORA TÉCNICA  
MATRICULA NACIONAL 12374

MERCK SHARP & DOHME ARGENTINA INC.

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



**Procedimiento:**

El ensayo contempla la inoculación de muestra en el saco de la yema de huevos embrionados con edad de 6 a 7 días. Después de una incubación de 9 días, los sacos de la yema se colecta, forman una fuente y se sub-transfieren hacia huevos embrionados frescos de 6 a 7 días de edad, para un periodo de incubación adicional de 9 días. La muestra es satisfactoria si ninguna muerte de huevo o muestra de tejido embrional anormal puede atribuirse a virus extraños.

**Cumplimiento de Regulaciones Internacionales:**

Este procedimiento 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*

**Validación del ensayo:**

Los parámetros típicos de validación no son aplicables a este CP debido a que no pueden aplicarse significativamente a Ensayos in vivo. En consecuencia, este ensayo no ha sido validado. Siguiendo la política Corporativa 9 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.

**Conclusión:**

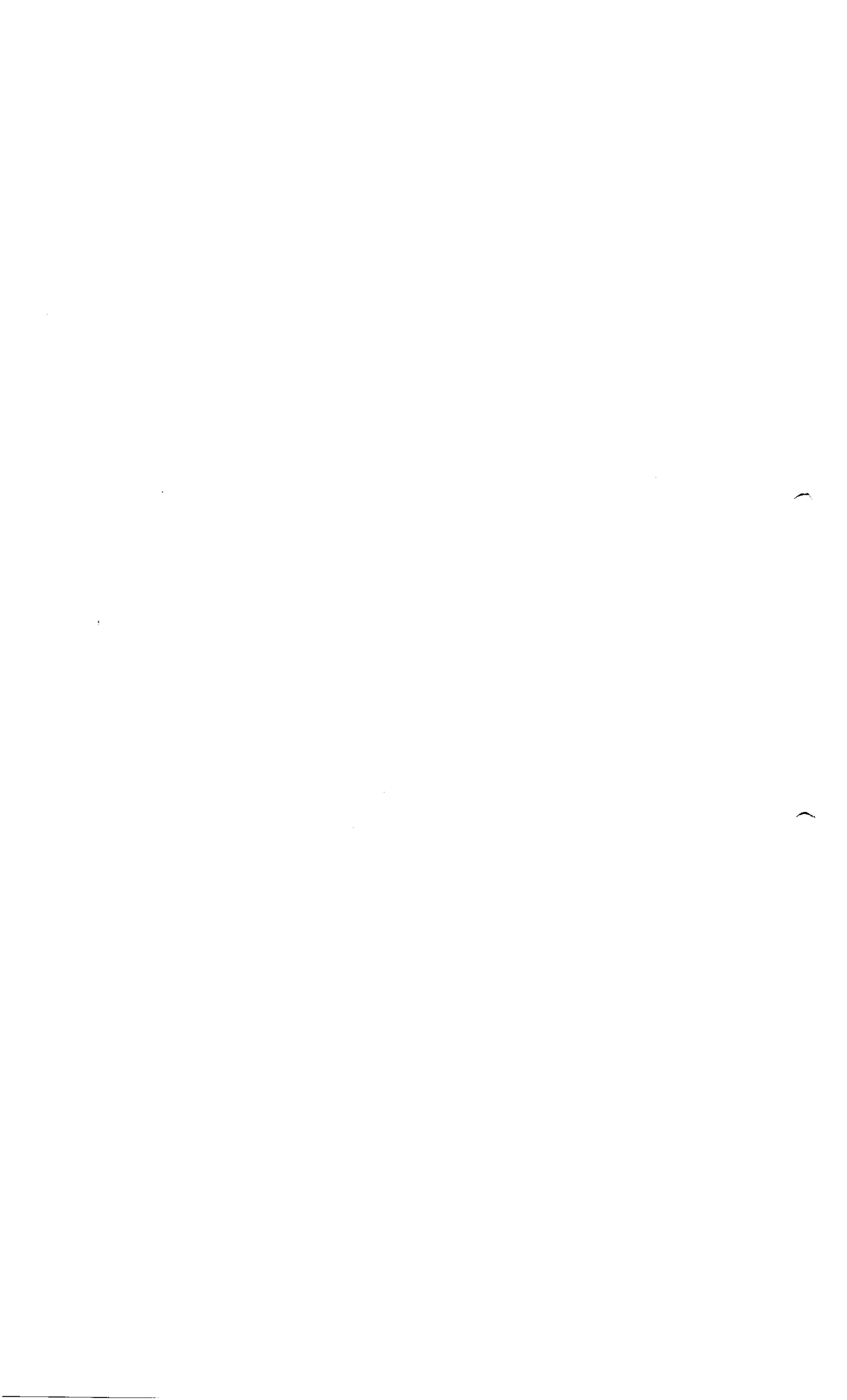
El procedimiento CP 9110.410 cumple con todos los requerimientos regulatorios para Ensayo de seguridad en huevos usando vacunas de virus vivos y bancos de células vía la ruta del saco de la yema. Se considera que las muestras de la Ensayo son adecuadas para usarse en este procedimiento.

MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.

Maria Geolija Campos  
DIRECTORA TÉCNICA  
MATRICULA NACIONAL 12374

MERCK SHARP & DOHME ARGENTINA INC.

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



### 2.3.2.1.2.5 Procedimiento de control 9110.220: Ensayo para bacteriófago

El procedimiento CP 9110.220, Ensayo para bacteriófago, describe una Ensayo de pureza in-vitro para la detección de agentes extraños. Esta Ensayo se usa para detectar contaminación por bacteriófagos en granel de vacuna o producto intermedio del granel, producida en cultivo celular aviario o mamífero.

#### Muestras para la Ensayo:

Banco de células madres MRC-5

Banco de células de trabajo del fabricante MRC-5

Semilla madre preclarificada y sonicada

Semilla de almacenamiento preclarificada y sonicada

#### Referencias y controles:

Control positivo: Phage  $\Phi$ VI - American Type Culture Collection (ATCC-Colección Americana de Tipos de Cultivo) 15597-B2

Control negativo: Solución salina amortiguadora de tris

#### Líneas celulares y animales de Ensayo:

*Escherichia coli* C-3000 - ATCC 15597

#### Procedimiento:

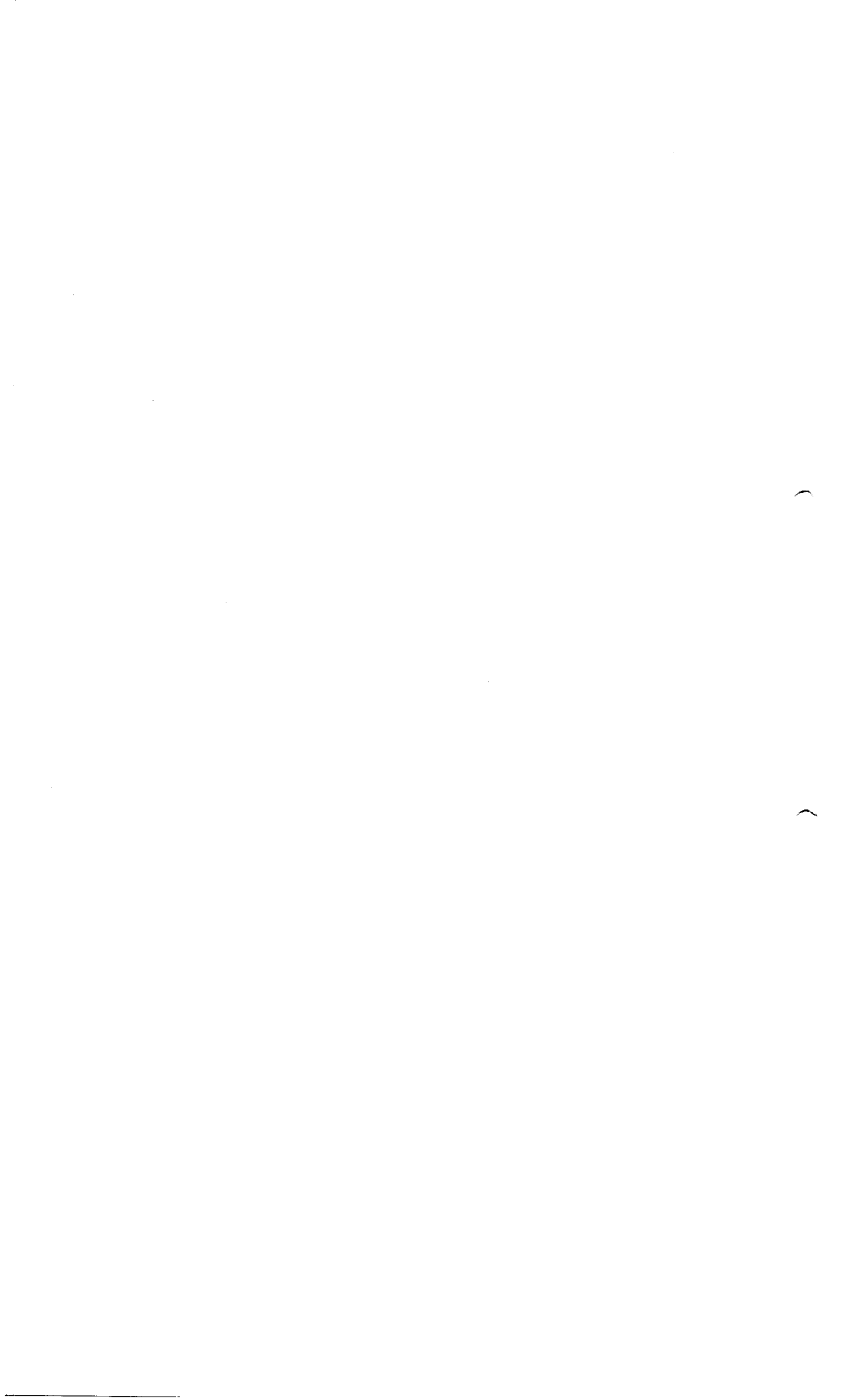
Un cultivo de huésped colifago, *Escherichia coli* C-3000, se inocula con muestra, enriquecida y se coloca en placa. El paso de enriquecimiento se realiza al inocular la muestra en el cultivo bacteriano huésped (células de enriquecimiento) e incubar a 36-38°C en una incubadora con agitación por 5 a 8 horas, a 125 rpm. Después del enriquecimiento, alícuotas del cultivo de muestra-huésped enriquecido se colocan en placa usando la técnica clásica de cubrimiento con agar. En la técnica de cubrimiento, las células huésped-muestra enriquecidas se mezclan con agar fundido no caliente (agar superior) y se vierten sobre agar sólido (base de agar). Se permite que estas placas solidifiquen a temperatura ambiente y después se incuban a 37.0-40.0 °C. Las células huésped forman un césped bacteriano en el agar superior, y el bacteriofago, de estar presente, infecta las células individuales y les ocasiona lisis. Las células con lisis se detectan al observar claros en el césped bacteriano, conocidos como placas; el

MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.

FARM. MARIA CESILIA CAMPOS  
DIRECTORA TECNICA  
MATRICULA NACIONAL 12374

MERCK SHARP & DOHME ARGENTINA INC.

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



bacteriófago se cuantifica en unidades formadoras de placa (UFP). La Ensayo es satisfactoria si no se detecta evidencia de bacteriófagos.

**Cumplimiento de Regulaciones Internacionales:**

El CP 9110.220 ha sido revisado contra requerimientos regulatorios de todo el mundo. Actualmente no existe una monografía para la vacuna zóster de virus vivo en la *Farmacopea de los Estados Unidos (USP)* o la *Ph. Eur.*

**Validación del ensayo:**

Los parámetros evaluados durante la validación fueron especificidad, precisión inter-ensayo, LOD, repetibilidad y robustez. La exactitud, LOQ, linealidad y rango no son aplicables a este ensayo y no se evaluaron durante la validación. La precisión intra-ensayo tampoco fue evaluada durante la validación. En los experimentos de validación se empleó granel preclarificado y sonicado. En la [Tabla 3.2.S.2.3-varicela: 5] se lista un resumen de cada parámetro evaluado durante la validación del método.

**Tabla 5: Resumen de los resultados de validación para el Procedimiento de Control 9110.220: Ensayo para bacteriófagos**

Parámetro de validación	Criterios de aceptación	Resultado exacto
Especificidad	La placa de Phage $\Phi$ VI debe ser recuperada después de la inoculación de cultivos C-3000 de <i>Escherichia coli</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Los cultivos infectados con Phage <math>\Phi</math>VI produjeron evidencia de formación de placa, indicando lisis celular.</li> <li>Los controles negativos no mostraron evidencia de formación de placa.</li> </ul>
Precisión intermedia (Precisión inter-ensayo)	Recuperación reproducible de placas de Phage $\Phi$ VI en $\geq 75\%$ de las Ensayos en el límite de detección y en cada nivel de inoculación superior	$\geq 75\%$ de las Ensayos recuperaron placas en el nivel de inoculación 5 UFP <sup>a</sup> /100 ml de caldo en un diseño experimental de 2 x 2 x 2.
Límite de detección	El ensayo deberá detectar un nivel de inoculación que produzca recuperación de la formación de placa en $\geq 75\%$ de las Ensayos.	El límite de detección del nivel de inoculación es 5 UFP/100 ml de caldo, donde 88% de las Ensayos demostraron recuperación de placas.
Repetibilidad	Recuperación reproducible de placas de Phage $\Phi$ VI en $\geq 75\%$ de las Ensayos al límite de detección y en cada nivel de inoculación superior	$\geq 75\%$ de las Ensayos recuperó placas en el nivel de inoculación de 5 UFP/100 ml de caldo en un diseño experimental de 2 x 2 x 2.
Robustez	<p>Las condiciones siguientes no deben tener impacto sobre el desempeño de la validación:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Almacenamiento de las células enriquecidas a 2-8°C</li> <li>Almacenamiento de células en placa a 2-8°C</li> <li>Tiempos de centrifugación diversos (recuperación de fago)</li> <li>Almacenamiento de pellet resuspendido después de la centrifugación</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Recuperación consistente de células enriquecidas almacenadas a 2-8 °C por hasta 24 horas</li> <li>Recuperación consistente de fago de células en placa almacenadas a 2-8 °C por hasta 48 horas</li> <li>La variación en los tiempos de centrifugación no tuvo impacto sobre la recuperación de fago</li> <li>Recuperación consistente de fago a partir de pellet resuspendido almacenado por hasta 7 días después de la centrifugación</li> </ul>

MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.

FARM. MARTA 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



**Conclusión:**

El procedimiento CP 9110.220 ha sido validado para la detección de contaminación por bacteriófagos en bancos de células MRC-5 y semillas stock y semillas madres preclarificadas y sonicadas. Se cumplieron todos los criterios de aceptación para la validación de este ensayo. El LOD del ensayo se demostró que fue de 5 UFC/0.1 ml de caldo enriquecido. Se demostró la precisión intermedia y la repetibilidad del ensayo mediante la recuperación consistente de bacteriófago a partir de diferentes niveles de inoculación, distintos analistas y repeticiones.

**2.3.2.1.3 Ensayo de liberación en el banco de células madres (MCB) MRC-5**

El banco de células madres MRC-5 se sometió a una batería de Ensayos para asegurar que está exento de agentes extraños y para asegurar que las células se comportan normalmente durante el nivel de duplicación de población "producción-uso". Estas Ensayos se listan en la [Tabla 6].

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. 51.525

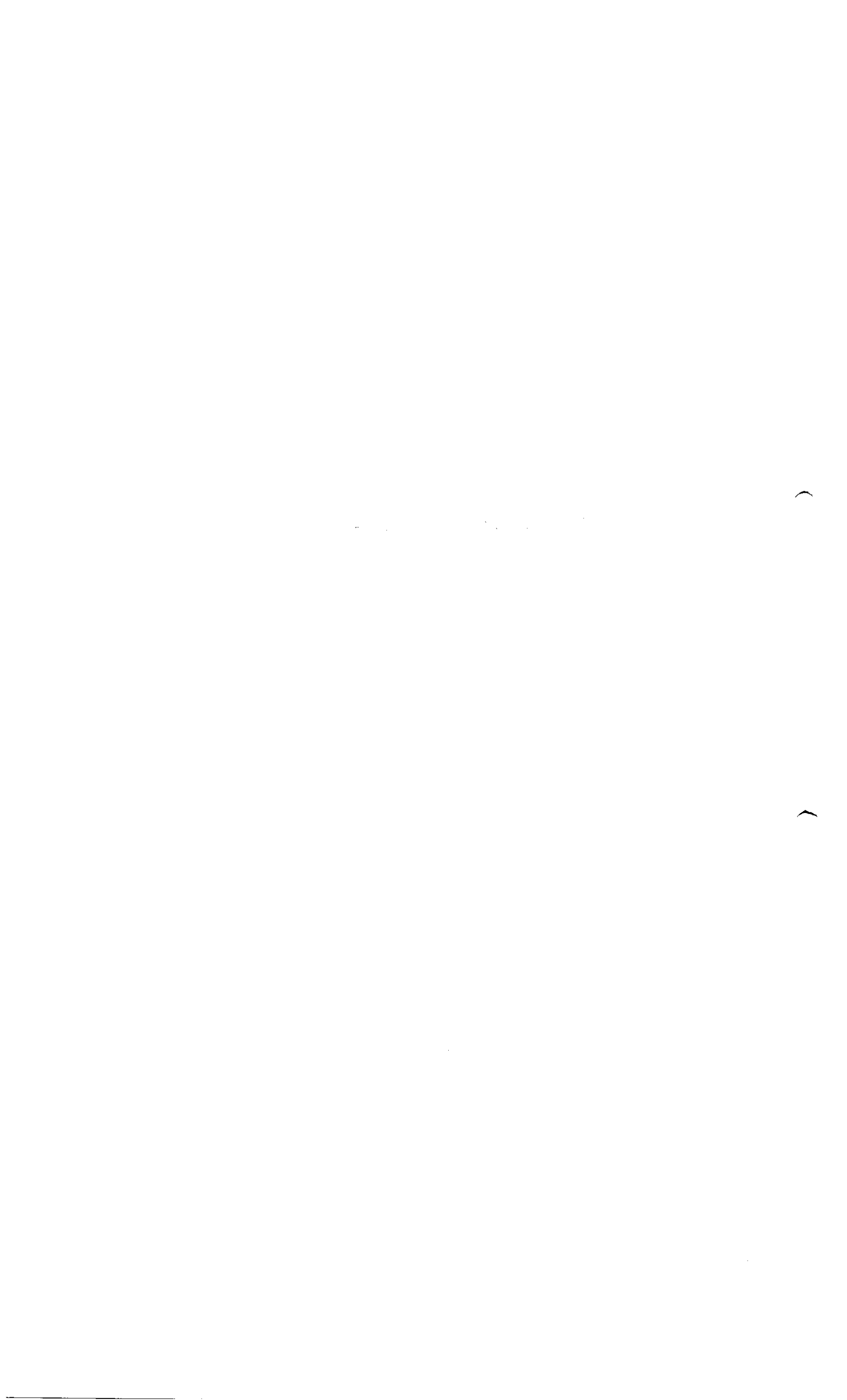


Tabla 6: Ensayo de liberación en el Banco de Células Madres MRC-5

50

Ensayo	Especificación	Procedimiento	Banco de células madres, lote 2025458
<b>Frasco de banco de células madres</b>			
Esterilidad <sup>a</sup>	No debe haber crecimiento	Procedimiento de control 9110.001	Sin crecimiento
<b>Medio ya utilizado (de células <math>\geq</math> Nivel de duplicación de población del banco de trabajo)</b>			
Esterilidad <sup>a</sup>	No debe haber crecimiento	Procedimiento de control 9110.001	Sin crecimiento
Cultivo de células Vero <sup>a</sup>	No debe observarse un efecto citopático	Procedimiento de control 9110.668	No se observó un efecto citopático
Cultivo de células MRC-5 <sup>a</sup>	No debe observarse un efecto citopático	Procedimiento de control 9110.668	No se observó un efecto citopático
Micoplasma, caldo/agar <sup>a</sup>	No debe observarse crecimiento	Procedimiento de control 9110.113	Sin crecimiento
<b>Medio ya utilizado a partir de experimentos de co-cultivo (véase en Retrovirus)</b>			
Transcriptasa inversa <sup>a</sup>	No debe haber señales indicativas de retrovirus	Procedimiento Normalizado de Operación 874-3338	Sin signo indicativo de retrovirus
<b>Células (<math>\geq</math> Nivel de duplicación de población del banco de trabajo)</b>			
Esterilidad <sup>a</sup>	No debe haber crecimiento	Procedimiento de control 9110.001	Sin crecimiento
Micoplasma, caldo/agar <sup>a</sup>	No debe haber crecimiento	Procedimiento de control 9110.113	Sin crecimiento
Micoplasma, Hoechst <sup>a</sup>	No debe haber fluorescencia extranuclear	Procedimiento de control 9110.339	No hay fluorescencia extranuclear
Ratones adultos <sup>a</sup>	Supervivencia de ratones $\geq 80\%$	Procedimiento de control 9110.338	$\geq 80\%$ de los ratones sobreviven
Ratones lactantes <sup>a</sup>	Supervivencia de ratones $\geq 80\%$	Procedimiento de control 9110.338	$\geq 80\%$ de los ratones sobreviven
Seguridad en cobayos <sup>a</sup>	Supervivencia $\geq 80\%$	Procedimiento de control 9110.338	$\geq 80\%$ sobreviven
Seguridad en conejos <sup>a</sup>	Supervivencia $\geq 80\%$	Procedimiento de control 9110.338	$\geq 80\%$ sobreviven
Tumorigenicidad <sup>a</sup>	La necropsia debe ser satisfactoria	Procedimiento de control 9110.700	Necropsia satisfactoria
Embrión de huevo - Ruta alantoica <sup>a</sup>	No debe haber muertes de huevos o anomalías gruesas, ni hemaglutinación <sup>b</sup>	Procedimiento de control 9110.409	No hubo muertes de huevos o anomalías gruesas/ni hemaglutinación <sup>b</sup>
Embrión de huevo - Ruta de saco de yema <sup>a</sup>	No debe haber muertes de huevos o anomalías gruesas <sup>c</sup>	Procedimiento de control 9110.410	No hubo muertes de huevos o anomalías gruesas <sup>c</sup>
Mycobacterium tuberculosis in vitro <sup>a</sup>	No debe haber crecimiento	Procedimiento de control 9110.117	No hubo crecimiento

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. 51.525



Tabla 6 (Cont.): Ensayo de liberación en el Banco de Células Madres MRC-5

Ensayo	Especificación	Procedimiento	Banco de células madres, lote 2025458
<b>Células (≥ Nivel de duplicación de población del banco de trabajo)</b>			
Cultivo de células Vero <sup>a</sup>	No debe observarse un efecto citopático	Procedimiento de control 9110.668	No se observó efecto citopático
Cultivo de células MRC-5 <sup>a</sup>	No debe observarse un efecto citopático	Procedimiento de control 9110.668	No se observó efecto citopático
Bacteriófagos <sup>a</sup>	No se deben detectar bacteriófagos	Procedimiento de control 9110.220	No se detectaron bacteriófagos
Retrovirus: Microscopia de transmisión de electrones (TEM) <sup>a</sup>	No debe haber presentes retrovirus identificables o partículas como de retrovirus	N/A <sup>d,a</sup>	No hubo presentes retrovirus identificables o partículas como de retrovirus
Retrovirus: Co-cultivo <sup>a</sup>	Debe ser negativo para retrovirus	N/A <sup>d,e</sup>	Negativo para retrovirus
Senescencia <sup>a</sup>	Ensayo realizada únicamente para propósitos de caracterización	N/A <sup>e</sup> ; las células se propagan a senescencia bajo condiciones de producción	PDL <sup>b</sup> ≈ 89

<sup>a</sup>Ensayo para agente extraño.

<sup>b</sup>La especificación ha sido actualizada a lo siguiente: sin muertes de huevo o anomalías gruesas, negativa para agentes extraños transmisibles, sin hemaglutinación.

<sup>c</sup>La especificación ha sido actualizada a lo siguiente: sin muertes de huevos o anomalías gruesas, negativa para agentes extraños transmisibles.

<sup>d</sup>Ensayos realizados por laboratorio contratado.

<sup>e</sup>N/A indica que el número de procedimiento no es aplicable.

<sup>f</sup>PDL: Nivel de duplicación de la población

### 2.3.2.2 Ensayo para retrovirus

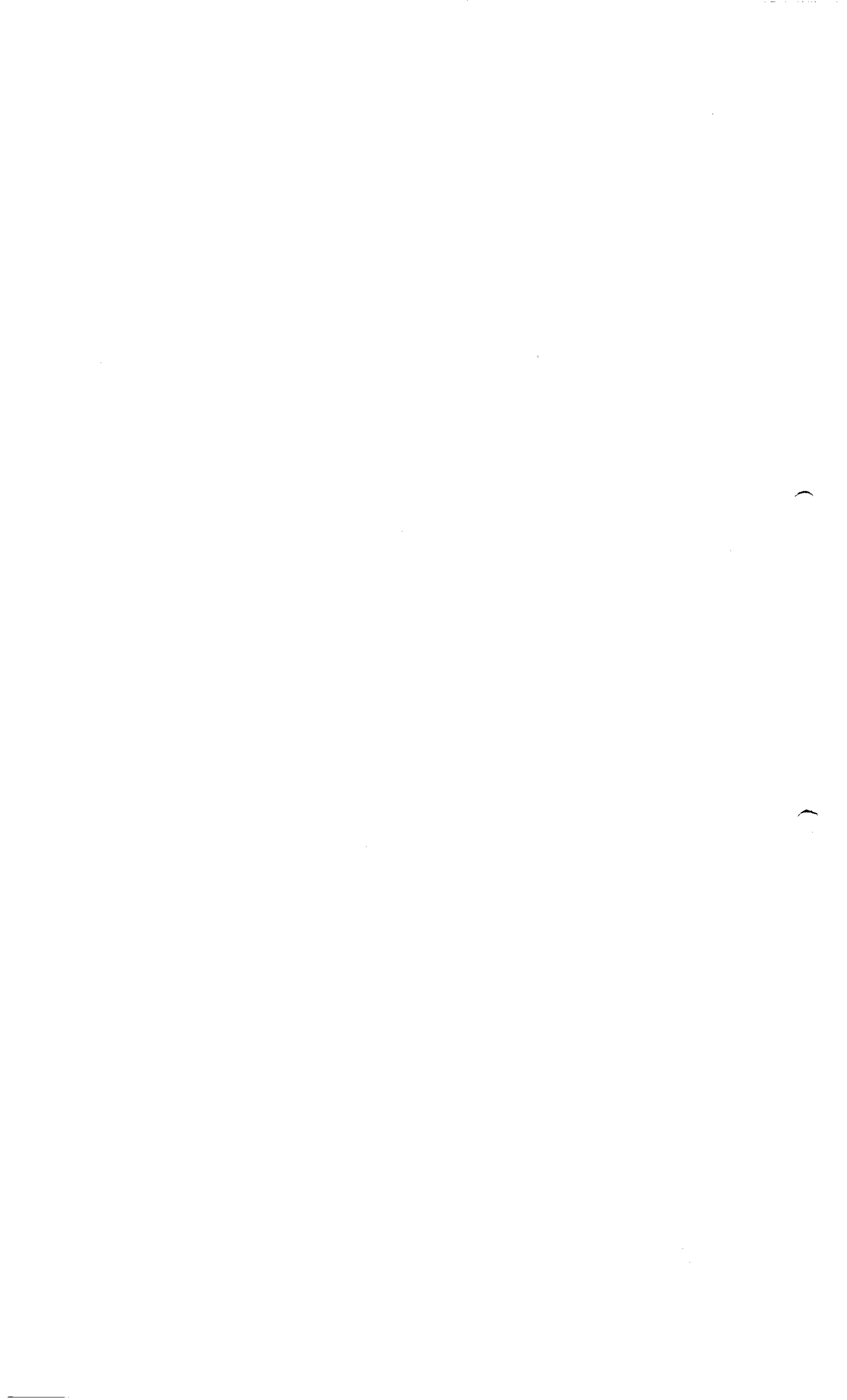
Para verificar la presencia potencial de retrovirus infecciosos, cultivos de células del banco de células madres MRC-5, lote 2025458, se probaron para presencia de transcriptasa inversa. Las células MRC-5 primero se co-cultivaron a través de múltiples transferencias con distintas líneas de células indicadoras. Este enfoque experimental permitiría que cualquier retrovirus potencial que pudiera estar presente se amplificara a través del pasaje con las células indicadoras. Se seleccionaron células indicadoras que soportan un rango amplio de tipos de retrovirus. En cada pasaje, se recolectaron los medios usados en los cultivos. Los medios usados en los cultivos del primer y último pasaje se sometieron a la Ensayo para transcriptasa inversa en el ensayo "transcriptasa inversa en producto enriquecido" (PERT). No se produjo un resultado indicativo de la presencia de algún retrovirus infeccioso en las células MRC-5. Todas las muestras de control positivo y negativo produjeron los resultados esperados.

MERCK SHARP & DOHME ARG. INC

Firma: *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



**2.3.2.3 Bancos de células de trabajo del fabricante MRC-5**

Un frasco de banco de células madres MRC-5 se derrite y planta en matraces que contienen medio de cultivo. El subcultivo se continúa hasta un nivel de duplicación de la población aproximado de 26, momento en el cual las células se recolectan usando tripsina-citrato al 0.25%, y se congelan en medio criopreservativo.

Un tamaño de lote típico de banco de células de trabajo del fabricante genera aproximadamente 650 frascos que contiene aproximadamente  $9 \times 10^6$  células cada uno. Cada frasco es suficiente para plantar un solo lote de vacuna. Los frascos de las células se almacenan a largo plazo a  $\leq -120^{\circ}\text{C}$  (fase de vapor de nitrógeno líquido). El almacenamiento del banco de células se distribuye en varios congeladores de las instalaciones de Merck en West Point, Pennsylvania, EE.UU.

**2.3.2.3.1 Certificación del banco de células de trabajo del fabricante MRC-5**

Las células de cada banco de células madres del fabricante MRC-5 se subcultivan para alcanzar el nivel de duplicación de población necesario en la producción de la vacuna o más allá para la Ensayo de certificación (aproximadamente hasta un PDL 48). Aunque se lleva a cabo a menor escala, las condiciones de cultivo de las células para su certificación se asemejan a las empleadas en la producción de la vacuna y se usan procedimientos de cultivo, equipo y reactivos similares a los empleados en el proceso de fabricación de la vacuna. Un banco maestro de células de trabajo del fabricante MRC-5 se certifica cuando las células en el nivel de duplicación de población requerido para la producción de la vacuna pasan la Ensayo de liberación que se muestra en la [Tabla 6].

**2.3.2.3.2 Ensayo de control analítico para el banco de células de trabajo del fabricante MRC-5**

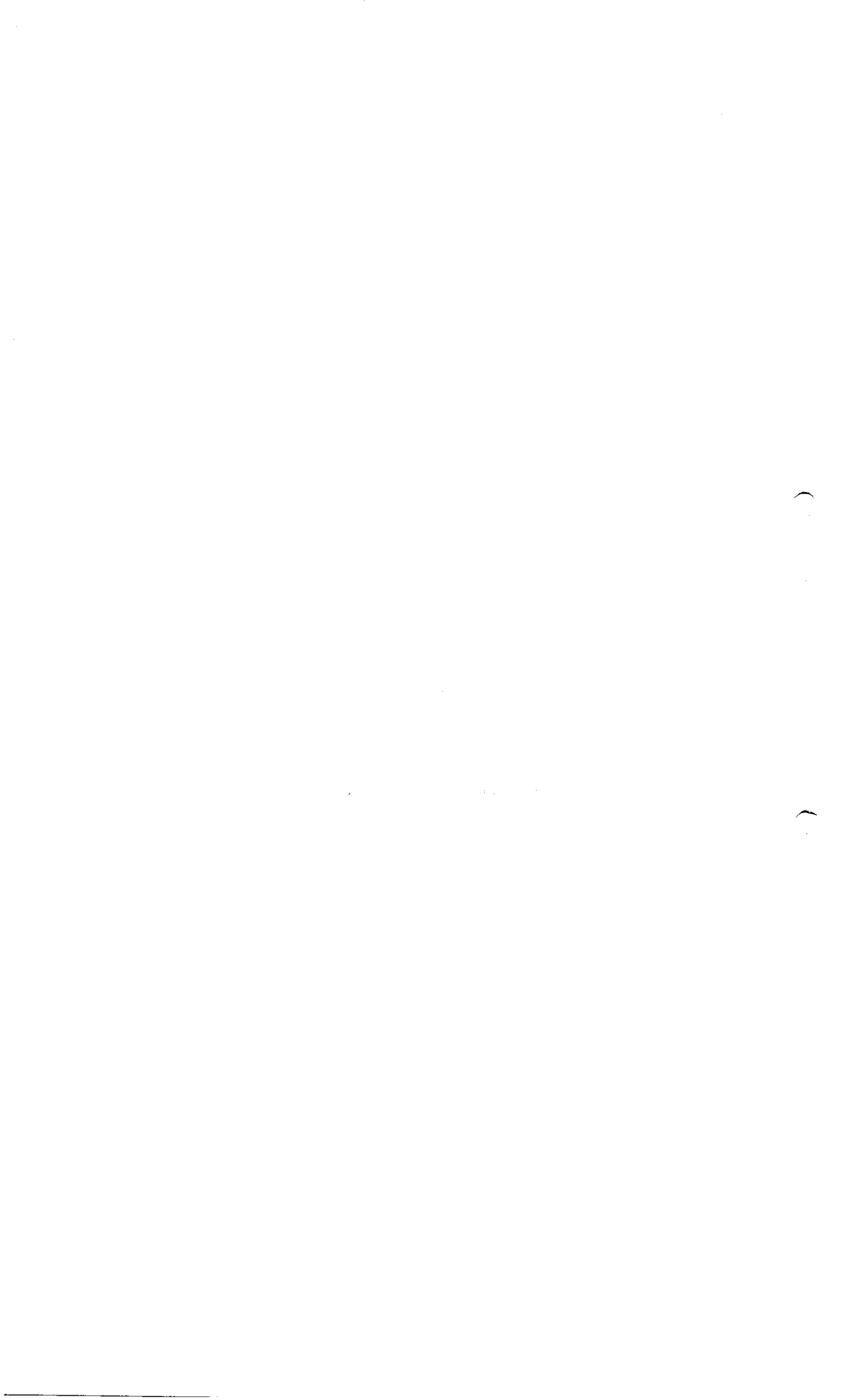
Las descripciones de los procedimientos de control analítico efectuados en el banco de células de trabajo del fabricante MRC-5 se describen en otra sección de la presente monografía; excepto por la seguridad con cobayos y conejos, embrión de huevo (ruta alantoica), embrión de huevo (ruta de saco de yema), Ensayo para bacteriófagos que se describió en el ítem 2.3.2.1.3 y huella digital del ácido nucleico descripta a continuación.

MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.

*Maria Cecilia Campos*  
 Farm. MARIA CECILIA CAMPOS  
 DIRECTORA TÉCNICA  
 MATRICULA NACIONAL 12374

MERCK SHARP & DOHME ARGENTINA INC.

*Dr. Santiago Rodríguez*  
 Dr. SANTIAGO RODRIGUEZ  
 DIRECTOR APODERADO PARA  
 ASUNTOS MEDICOS Y REGULATORIOS  
 MAT. NAC. 51.525



### 2.3.2.3.2.1 Huella digital del ácido nucleico

La huella digital del ácido nucleico es una Ensayo de liberación para los bancos de células MRC-5.

#### Muestras para la Ensayo:

Banco de células diploides MRC-5-Banco de células madres del fabricante

Banco de células diploides MRC-5 derivadas del banco de células madres-Banco de células de trabajo del fabricante

Banco de células diploides MRC-5-Banco de células de trabajo del fabricante

#### Referencias y controles:

Perfil de la fuente MRC-5

#### Procedimiento:

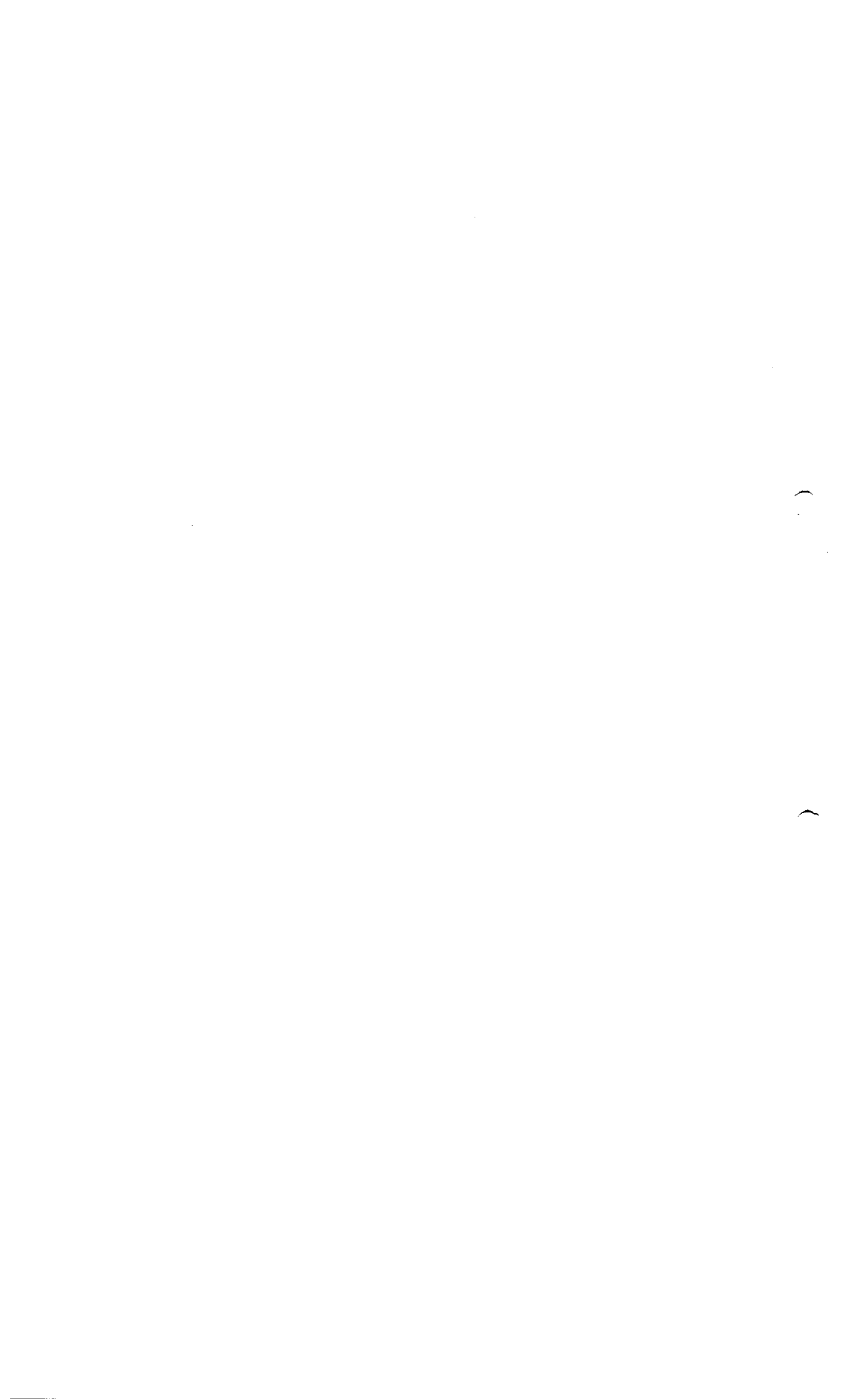
Se busca que la Ensayo se realice de manera externa en la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC) en Salisbury, Wiltshire, Reino Unido. ECACC usa la reacción en cadena de la polimerasa múltiple (PCR) como método de la huella digital de ADN para líneas celulares humanas, a fin de demostrar la continuidad entre los bancos de células madres y de trabajo, y para identificar la contaminación cruzada. La reacción en cadena de la polimerasa múltiple, también conocida como genotipo microsatelital, es un sistema semi-automático para elaborar perfil de ADN, que emplea hasta 10 conjuntos de primero en donde cada conjunto de primero produce 2 puntajes numéricos (esto es, un total de 20 puntajes). Se ha identificado una escala numérica predeterminada dependiente del tamaño de producto de ADN para cada conjunto de primero. El conjunto de primero específico para la línea celular MRC-5 se seleccionó porque representa áreas del genoma que previamente han demostrado una probabilidad más alta de inestabilidad. A los productos de la PCR para las muestras de Ensayo de cada primero se les asignan valores numéricos, correspondientes al sitio donde caen en la escala predeterminada. Los dos picos más largos de cada primero se registran, dando un algoritmo de 20 números. Se evalúa una muestra de control al comienzo y al final de cada conjunto de análisis para cada primero. Para que la Ensayo sea válida, el primero de control debe dar el algoritmo correcto. Una muestra de Ensayo debe tener como mínimo una homología del 70% con un perfil fuente de línea celular de MRC-5 caracterizada y conocida, a fin de generar un resultado aprobatorio.

MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.

Fam. 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. 51.528



**Cumplimiento de Regulaciones Internacionales:**

Esta Ensayo ha sido revisada contra requerimientos y lineamientos regulatorios de todo el mundo y es consistente con:

Ph. Eur. *Farmacopea Europea, Sección 5.2.3 Substratos celulares para la producción de vacuñas para uso humano*

**Validación del ensayo:**

La aceptabilidad de usar análisis de huella digital de ácido nucleico fue realizado por ECACC, empleando sus propios métodos. ECACC calificó las muestras de Ensayo de MRC-5 al demostrar la especificidad adecuada en el ensayo [Tabla 7].

**Calificación de la muestra:**

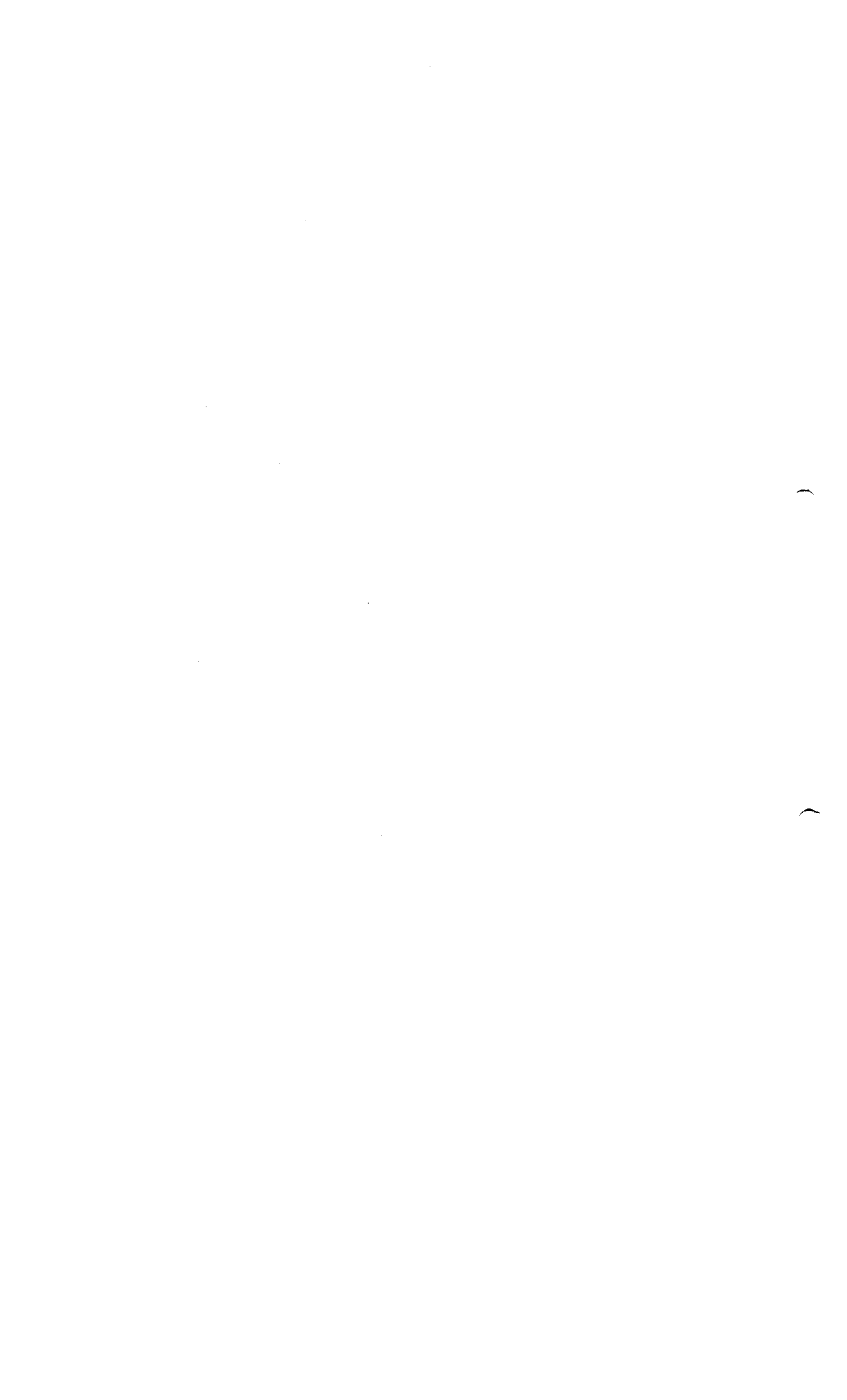
Un resumen de cada parámetro evaluado durante la calificación de la muestra se lista en la [Tabla 7].

MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.

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. 61.526



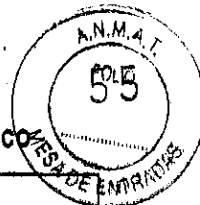


Tabla 7: Resumen de los resultados de la calificación para huella digital de ácido nucleico

Parámetro de validación	Criterio de aceptación	Resultado exacto
<b>Especificidad</b>	<i>Una muestra para Ensayo de MRC-5 debe tener como mínimo una homología del 70% con un perfil de fuente de MRC-5 caracterizado y conocido para generar un resultado aprobatorio, usando la reacción en cadena de la polimerasa múltiple.</i>	<i>Con base en los puntajes de genotipo microsatelital, el tipo de muestra MRC-5 demostró tener una homología al 100% respecto al perfil fuente de MRC-5.</i>

**Conclusión:**

La huella digital de ácido nucleico, una Ensayo de liberación para bancos de células MRC-5, cumple con todos los requerimientos regulatorios para demostrar la identidad de los substratos celulares para producción de vacunas destinadas a uso humano. Se considera que las muestras de Ensayo son adecuadas para usarse en este ensayo.

**2.3.2.3.3 Ensayo de liberación en el Banco de células de trabajo del fabricante MRC-5**

El banco de células de trabajo del fabricante MRC-5 se somete a una batería de Ensayos para asegurar que esté exento de agentes extraños y para asegurar que las células se comporten normalmente durante el nivel de duplicación de población (PDL) para producción-uso. Una comparación de los requerimientos de Merck para la liberación de banco de células con el documento *Puntos a considerar en la caracterización de líneas celulares empleadas para elaborar productos biológicos* (1993) del CBER, la Sección 5.2.3 de la *Ph. Eur.*, *Substratos celulares para la producción de vacunas para uso humano y la Derivación y caracterización de substratos celulares empleados para la fabricación de productos biotecnológicos/biológicos* (1997) de la ICH asegura la compatibilidad con los documentos de la ICH y la OMS sobre substratos celulares.

Los Ensayos de liberación practicadas a los Bancos de células de trabajo del fabricante MRC-5 se listan en la [Tabla 8]. Muchos de las Ensayos también se llevan a cabo en el Banco de células madres MRC-5, la vacuna a granel, y los productos intermedios a granel. Históricamente se ha llevado a cabo el monitoreo cromosomal de los Bancos de células de trabajo del fabricante MRC-5. Sin embargo, de acuerdo con los nuevos requerimientos de la *Ph. Eur.* para bancos celulares y los 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, esta Ensayo no habrá de

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. NAO: 51.525

