



3.2.5 Procedimiento de control 9110.339: Procedimiento de tinción H (Hoechst) para detección de micoplasma

El Procedimiento de Control (CP) 9110.339, Procedimiento de tinción H (Hoechst) para detección de micoplasma, describe una Ensayo de pureza in vitro para la detección de agentes extraños. Usando un sistema basado en cultivo celular, la Ensayo se lleva a cabo para confirmar la ausencia de micoplasma en la vacuna a granel o productos intermedios de la vacuna.

Muestras para la Ensayo:

- Banco de células de trabajo del fabricante (MRC-5)
- Granel preclarificado y sonicado
- Fluidos de control recolectados
- Semilla de almacenamiento sonificada
- Medio gastado de semilla de almacenamiento P30
- Semilla de almacenamiento P30 recolectada-perla
- Semilla madre preclarificada y sonificada
- Fluidos de control recolectados de semilla madre
- Células de control recolectadas-perla de semilla madre

Referencias y controles:

- Control positivo: *Mycoplasma hyorhinis*
- Control negativo: Cultivos celulares sin inocular

Líneas celulares y animales de Ensayo:

- Células RK-13 de epitelio de riñón de conejo (*Oryctolagus cuniculus*)
- Células MRC-5 de fibroblastos de pulmón diploides, humanos (*Homo sapiens*)

Procedimiento para las células RK-13:

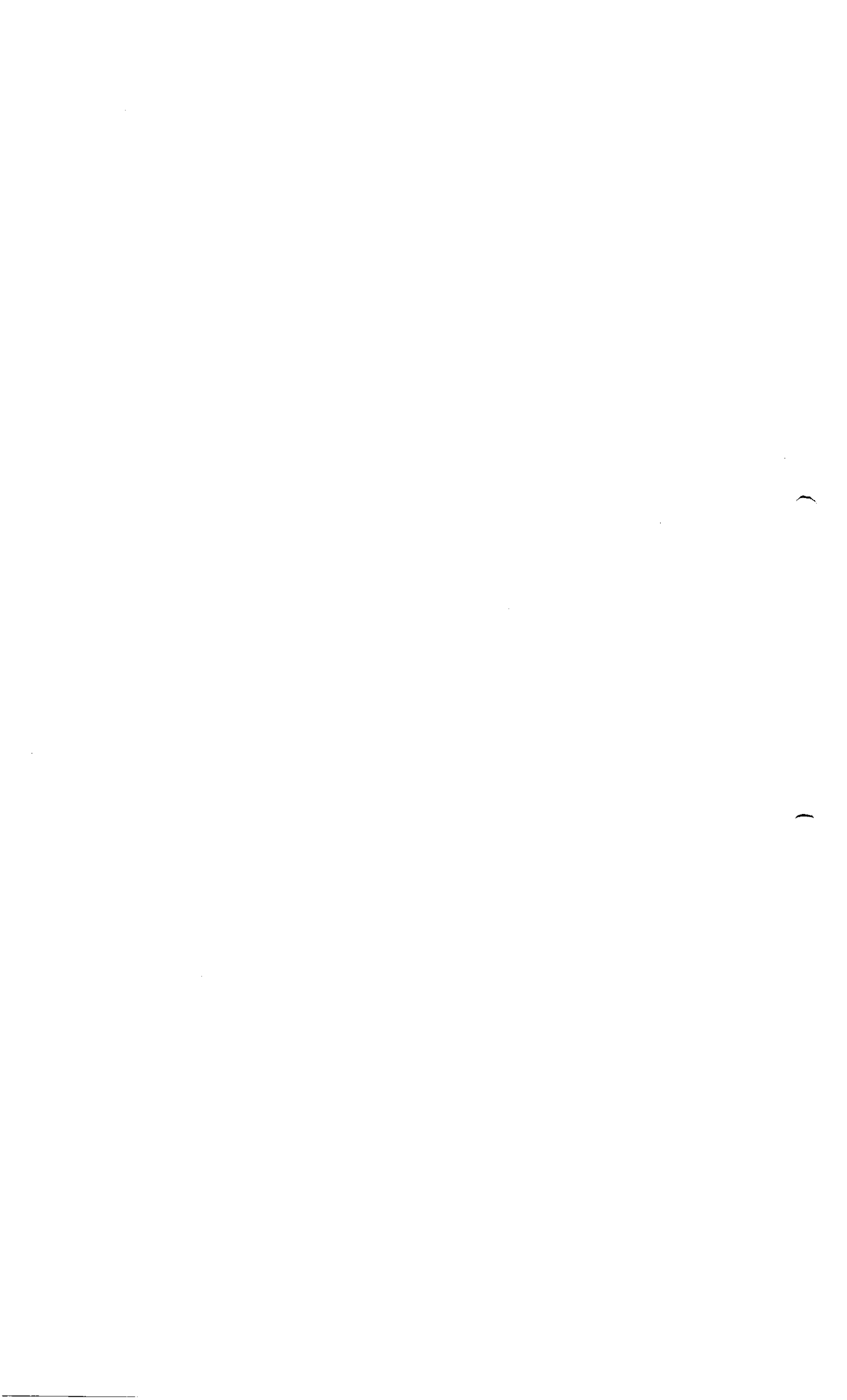
Matraces con substrato celular RK-13 exento de micoplasma se inoculan con muestra de la Ensayo, se colocan en incubadora humidificada y se incuban por 4-6 días a 35-37°C y 3-7% de CO₂ en atmósfera de aire. Los cultivos celulares se subcultivan en cubrevasos e incuban por 3-4 días. Las células se fijan y tiñen para la presencia de micoplasma usando un compuesto de bisbenzimidazol fluorescente (tinte de Hoechst) y se evalúan por microscopia. Se considera que la Ensayo es satisfactoria si se observa

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





fluorescencia extranuclear, típica del micoplasma, en el control positivo, pero no en las muestras de Ensayo o en el control negativo.

Procedimiento para banco de células MRC-5:

Matraces que contienen 1.0×10^5 células MRC-5/ml se colocan en una incubadora humidificada y se incuban por 4-6 días a 35-37°C y 3-7% de CO₂ en atmósfera de aire. Los cultivos celulares se subcultivan en cubrevasos e incuban por 3-5 días. Las células se fijan y tiñen para la presencia de micoplasma usando un compuesto de bisbenzimidazol fluorescente (tinte de Hoechst) y se evalúan por microscopia. Se considera que la Ensayo es satisfactoria si se observa fluorescencia extranuclear, típica del micoplasma, en el control positivo, pero no en las muestras de Ensayo o el control negativo.

Cumplimiento con Regulaciones:

El CP 9110.339 ha sido revisado contra requerimientos y lineamientos regulatorios de todo el mundo y es consistente con lo siguiente:

CBER PTC *Puntos a considerar en la caracterización de líneas celulares empleadas para fabricar productos biológicos, (1993), Centro para la evaluación e investigación de productos biológicos FDA, IV.B, Cultivos de producción y Ensayos de producto, Manejo de cultivos celulares; V.B., Ensayo de control de calidad, Ensayos para la presencia de micoplasma; y Anexo 2, Procedimientos recomendados para la detección de contaminación con micoplasma en productos biológicos hechos en substratos celulares.*

Ph. Eur. *Farmacopea Europea*, 2.6.7. Micoplasmas

Farmacopea Europea, 2.6.16. Ensayos para agentes extraños en vacunas virales para uso humano

3.2.6 Procedimiento de control 9110.527: Ensayo de hemadsorción en células de control de producción - Vacunas de virus vivo y hepatitis A

El Procedimiento de Control (CP) 9110.527, Ensayo de hemadsorción en células de control de producción - vacunas de virus vivo y hepatitis A, describe una Ensayo de pureza in vitro para la detección de agentes extraños. Esta Ensayo se usa para verificar la ausencia de agentes extraños virales hemadsorbentes en los cultivos celulares para control de producción.

MERCK SHARP & DOHME ARG INC

Farm. MARTA CECILIA CAMPOS
DIRECTORA TÉCNICA
MATRICULA NACIONAL 1237#

MERCK SHARP & DOHME ARGENTINA INC.

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





Muestras para la Ensayo:

- Células de control de semilla de almacenamiento
- Células de control
- Células de control de semilla madre

Líneas celulares y animales de Ensayo:

Glóbulos rojos de cobayo, provenientes de cobayos de 2 a 4 meses de edad, en solución de Alsever.

Procedimiento:

La presencia de agentes virales extraños y hemadsorbentes es indicada por la adsorción de glóbulos rojos a monocapas de células infectadas. El procedimiento de hemadsorción (HAD) se aplica por lo menos al 33.3% de las células de control para producción de varicela, por cada lote de vacuna probada. Cada monocapa de células (confluencia $\geq 60\%$) se lava con solución salina amortiguada y se incuba por 30 minutos a 2-8°C con una suspensión al 0.2% de glóbulos rojos de cobayo, mientras se gira a 0.25 rpm. Después de un segundo lavado con solución salina amortiguada, los cultivos celulares se examinan bajo el microscopio en busca de agregados de glóbulos rojos. Los mismos cultivos celulares se incuban posteriormente por 30 minutos a temperatura ambiente con una suspensión al 0.2% recientemente preparada de glóbulos rojos de cobayo, se lavan con solución salina amortiguada y nuevamente se examinan bajo el microscopio en busca de agregados de glóbulos rojos. La presencia de ciertos agentes virales es indicada por la adsorción de glóbulos rojos a monocapas de células infectadas (esto es, hemadsorción). Se considera que los cultivos de muestra son satisfactorios si no se encuentra evidencia de hemadsorción.

Cumplimiento con Regulaciones:

El CP 9110.527 ha sido revisado contra requerimientos y lineamientos regulatorios de todo el mundo y es consistente con lo siguiente:

CBER PTC *Puntos a considerar en la caracterización de líneas celulares empleadas para fabricar productos biológicos, (1993), Centro para la evaluación e investigación de productos biológicos FDA, V.C.1, Ensayo de control de calidad, Ensayos para la presencia de virus, Ensayos de rutina para virus extraños.*

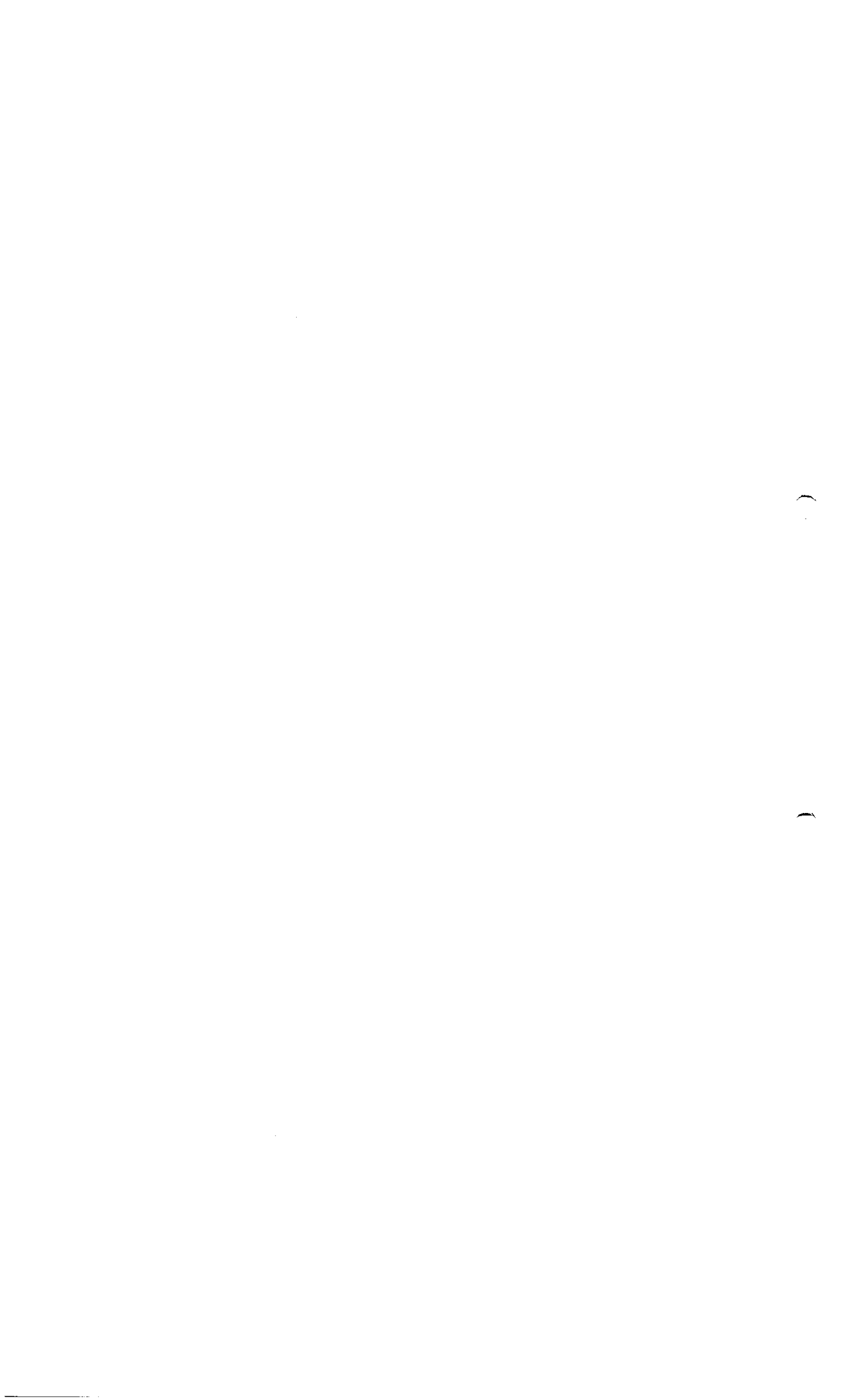
Ph. Eur. Farmacopea Europea, 2.6.16. Ensayos para agentes extraños en vacunas virales para uso humano

MERCK SHARP & DOHME ARG INC

Fam. MARIA CECILIA CAMPOS
DIRECTORA TÉCNICA
MATRICULA NACIONAL 12274

MERCK SHARP & DOHME ARGENTINA INC.

DR. SANTIAGO RODRIGUE
DIRECTOR APODERADO PARA
ASUNTOS MEDICOS Y REGULATORIOS
MAT. NAC. 61.525





3.2.7 Procedimiento de Control 9110.551: Ensayo de placa para vacuna de varicela en cultivos celulares MRC-5, para potencia, identidad y análisis del fluido de control

El Procedimiento de Control (CP) 9110.551, Ensayo en placa para vacuna de varicela en cultivos celulares MRC-5, para potencia, identidad y análisis de fluido de control, describe una Ensayo para la identificación y determinación cuantitativa del ingrediente activo. Esta Ensayo se usa para determinar la potencia del virus vivo de varicela en la vacuna a granel y los productos intermedios del granel. Esta Ensayo también describe una Ensayo de identidad para confirmar la presencia de virus de varicela vivo en la vacuna a granel y los productos intermedios de la vacuna y para confirmar la ausencia de varicela en los fluidos de control.

Muestras para la Ensayo:

Semilla madre asociada a célula

Células de semilla madre recolectadas-perla clarificadas, sonicadas

Células de control recolectadas perla de semilla madre clarificadas y sonicadas (placebo)

Semilla de almacenamiento asociada a célula

Granel final

Referencias y controles:

Referencia: Estándar de referencia de varicela
Control de semilla de almacenamiento

Control positivo: Dos frascos de estándar de referencia, titulados por duplicado,
preparados para cada ensayo (únicamente muestras para Ensayo de productos intermedios de varicela)
Un frasco de control de semilla de almacenamiento titulada, preparada para cada ensayo (únicamente muestras de Ensayo para semilla)

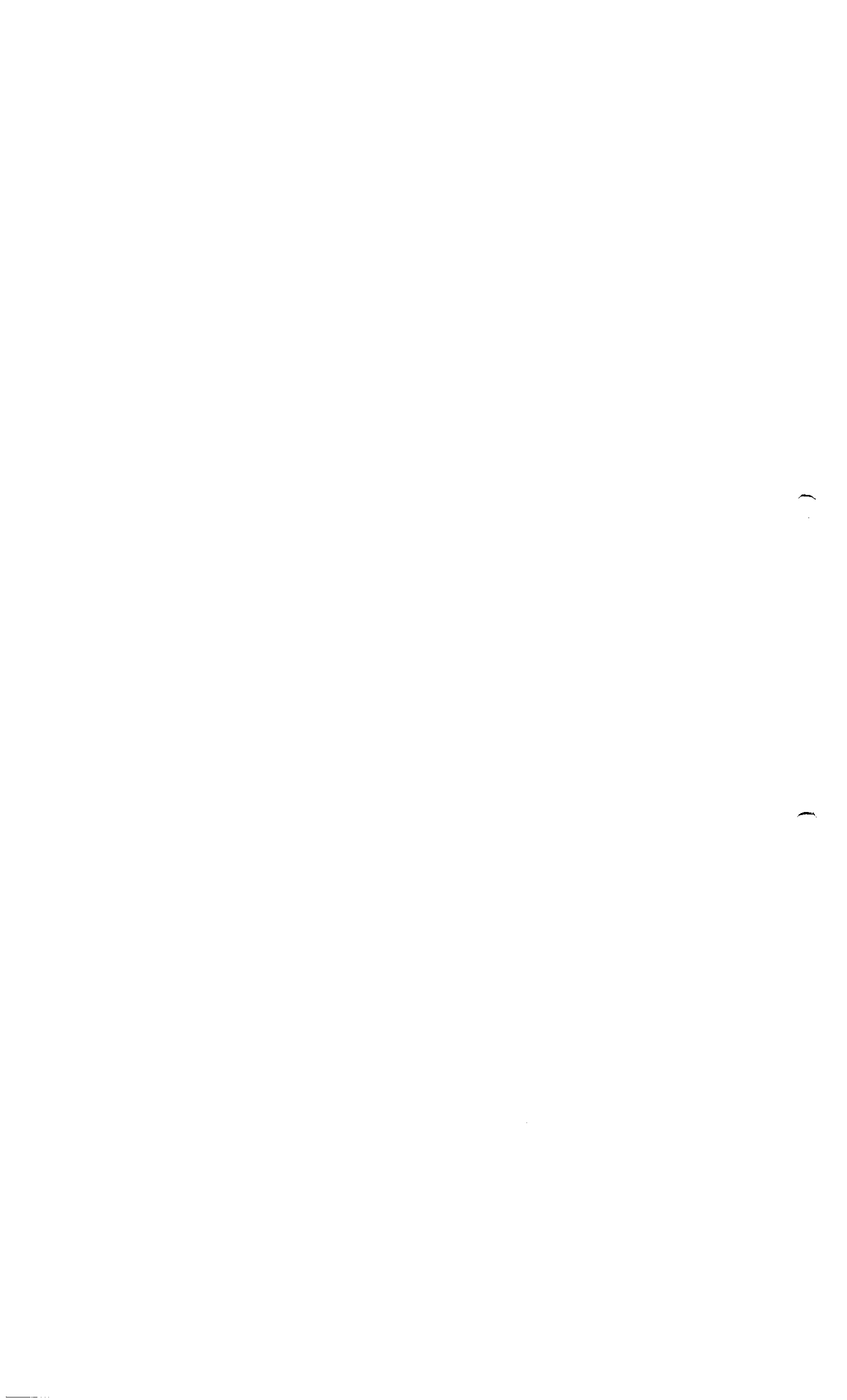
Control negativo: Cultivo celular que no se haya inoculado ni realimentado
Cultivo celular que no se haya inoculado ni realimentado con medio de mantenimiento
Cultivo celular que no se haya inoculado con diluyente de la muestra

MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.

Farm. MARIA GECILIA CAMPOS
DIRECTORA TÉCNICA
MATRICULA NACIONAL 12374

MERCK SHARP & DOHME ARGENTINA INC.

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



Lotes de envases llenos (FC) de VARIMAX™¹ en los cuales se hayan completado los Ensayos se usan como estándar de referencia interna o control (estándar interno) en cada Ensayo de la potencia de la varicela. Una preparación de semilla de almacenaje de vacuna de varicela, de potencia definida, se usa como control en cada Ensayo llevada a cabo con muestras de semilla madre y semilla de almacenamiento. El estándar de referencia debe ubicarse dentro de los límites de control predeterminados (esto es, 2 sigma) para asegurar una sensibilidad aceptable a la infección con virus de la varicela en cada Ensayo de potencia. La potencia relativa se calcula para cada Ensayo. La potencia relativa se expresa como la proporción del valor observado para el lote de Ensayo respecto al valor observado del estándar. La potencia calibrada del lote de Ensayo se determina como la potencia relativa por la potencia asignada del estándar. Cada lote de estándar de referencia de varicela se califica, de acuerdo con un procedimiento aprobado, vía Ensayos paralelos con un ajuste al lote previo.

105

Líneas celulares y animales de Ensayo:

Células humanas MRC-5 de fibroblastos de pulmón, diploides, macho (*Homo sapiens*)

Procedimiento para la potencia:

En la Ensayo de potencia, las muestras se diluyen e inoculan en monocapas de MRC-5 establecidas y subconfluentes en platos de cultivo. Los cultivos infectados se incuban por 7 días, se fijan y tiñen con azul de Coomassie, y se examinan bajo el microscopio para cuantificar el número de placas por plato. Sólo las preparaciones de muestra que generan un promedio de placas por dilución dentro del rango establecido de 20-50 para fluidos de virus recolectados (HVF) y de 20-80 para el granel final se toman en cuenta para el cálculo de la potencia. Los resultados de la Ensayo se corrigen para el factor de dilución y volumen inoculado, se calibran respecto al estándar de referencia actualmente analizado, y se reportan como unidades formadoras de placa por mililitro (UFP/ml).

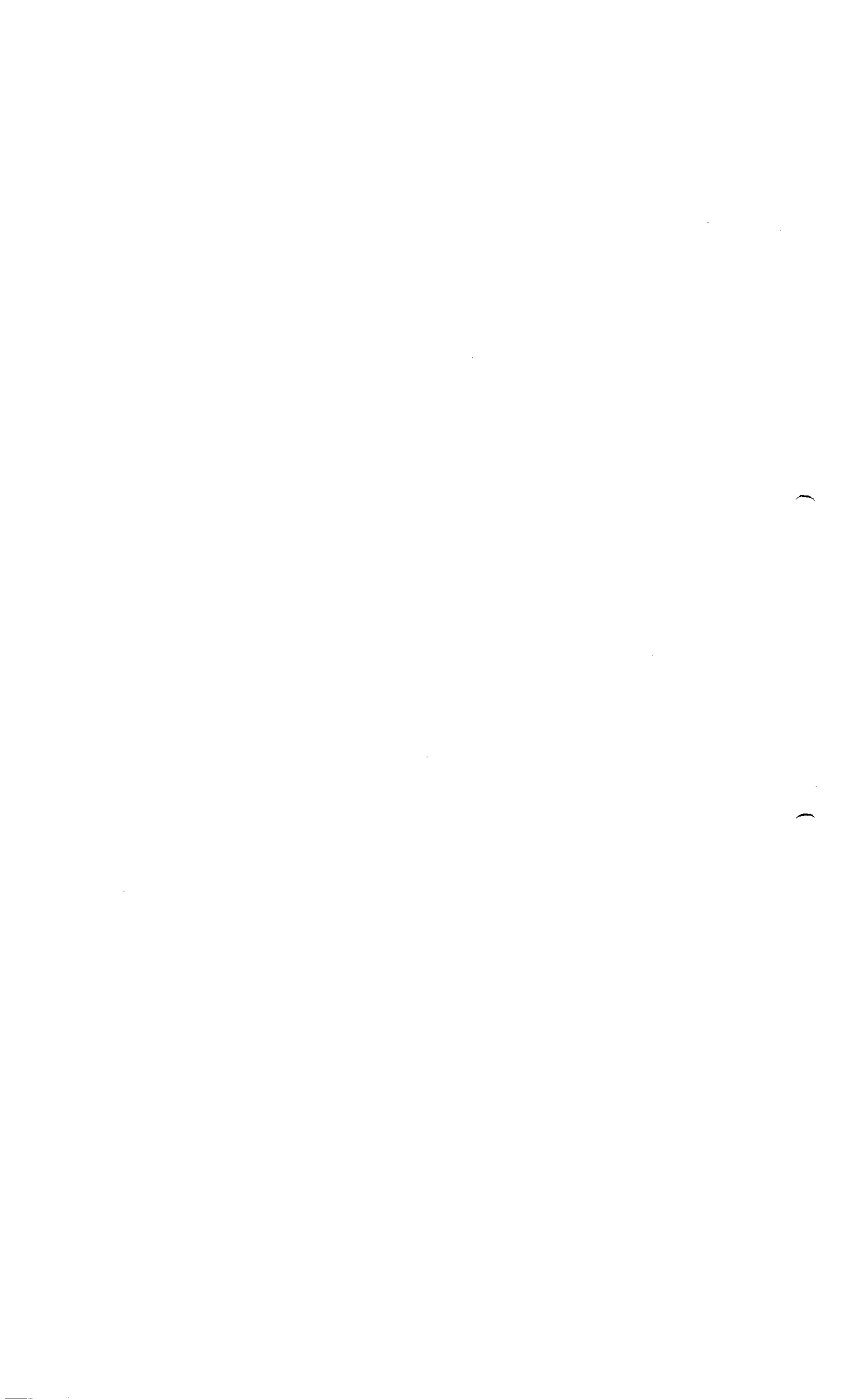
Un lote de envases llenos (FC) de VARIVAX™ (estándar de referencia) se usa como control para los cambios en la sensibilidad del sistema de cultivo celular MRC-5 y para la eficiencia de la infección. En cada ensayo se titulan dos frascos de estándar de referencia. El título promedio determinado para ambos frascos debe estar dentro de los límites de control predeterminados para el lote en uso. No debe observarse evidencia de efecto citopático (CPE) o toxicidad en ninguno de los cultivos de control negativo no infectados.

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



Procedimiento para la identidad:

La identidad del virus de la varicela dentro de las muestras celulares infectadas y rotas se establece por incubación a 20-25°C durante 55-65 minutos con un anticuerpo monoclonal neutralizante, específico para varicela. Las muestras neutralizadas se Ensayon para potencia como se describe en el CP 9210.551 para muestras de granel final. Las muestras de Ensayo se consideran satisfactorias si exhiben una reducción $\geq 90\%$ en el efecto citopático en cualquiera de las diluciones antiséricas inmunes al virus, en comparación con el control de virus no neutralizado. Para la muestra de control no neutralizada que no contiene anticuerpo específico para la varicela, se debe observar un número promedio mínimo de 15 placas por plato en por lo menos la dilución más diluida.

Cumplimiento con las Regulaciones:

El CP 9910.551 ha sido revisado contra requerimientos y lineamientos regulatorios de todo el mundo y es consistente con lo siguiente:

CFR *Código de Regulaciones Federales 21, Cap. I, 600.3(s) Definiciones*
 Código de Regulaciones Federales 21, Cap. I, 610.10 Potencia
 Código de Regulaciones Federales 21, Cap. I, 610.14 Identidad

3.2.8 Procedimiento de Control 9110.582: Observación microscópica de muestras de vacuna de virus a granel para verificar la ausencia de células intactas

El Procedimiento de Control (CP) 9110.582, Observación microscópica de muestras de vacuna de virus a granel para verificar la ausencia de células intactas, describe una Ensayo para la detección e impurezas derivadas del proceso. Esta Ensayo usa el análisis con microscopio para confirmar la ausencia de células intactas en la vacuna a granel.

Muestras para la Ensayo:

Granel final

Referencias y controles:

Control positivo: Vacuna a granel en fuente, antes de la filtración (granel preclarificado)

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. NAC. 51.575





Procedimiento para la potencia:

Este método de Ensayo requiere la observación microscópica de muestras de Ensayo usando exclusión con azul de trypan y una cámara de conteo hemacitométrica. Las muestras de graneles preclarificados se diluyen con azul de trypan y se añaden a una cámara del hemacitómetro. Una muestra adecuada del granel final se diluye de manera similar y coloca en la cámara restante del hemacitómetro como la muestra de la Ensayo. Ambas cámaras se evalúan microscópicamente con un objetivo 10X. Si se observan células intactas, ambas cámaras también se evalúan con un objetivo 43X. Un color azul claro o apariencia refractiva y una membrana continua lisa distinguen a las células intactas. Todo residuo que parezca una célula intacta se investiga mediante un paso de concentración de muestra, seguido de un procedimiento de coloración de Giemsa. La muestra de la Ensayo se considera satisfactoria si no se observan células intactas.

3.2.9 Procedimiento de Control 9110.654: Ensayo de antígeno de varicela (ELISA de competencia a glicoproteína)

El Procedimiento de Control (CP) 9110.654, Ensayo de Antígeno de Varicela (ELISA de Competencia a Glicoproteína) describe una Ensayo para la identificación y determinación cuantitativa del ingrediente activo. Esta Ensayo se usa para cuantificar el contenido de antígeno de glicoproteína del virus de varicela-zóster (VVZ) en la vacuna a granel.

Muestras para la Ensayo:

Granel final

Referencias y controles:

Referencia: Estándar de referencia de varicella

Control positivo: contenedor lleno con varicella

Control negativo: medio

Procedimiento:

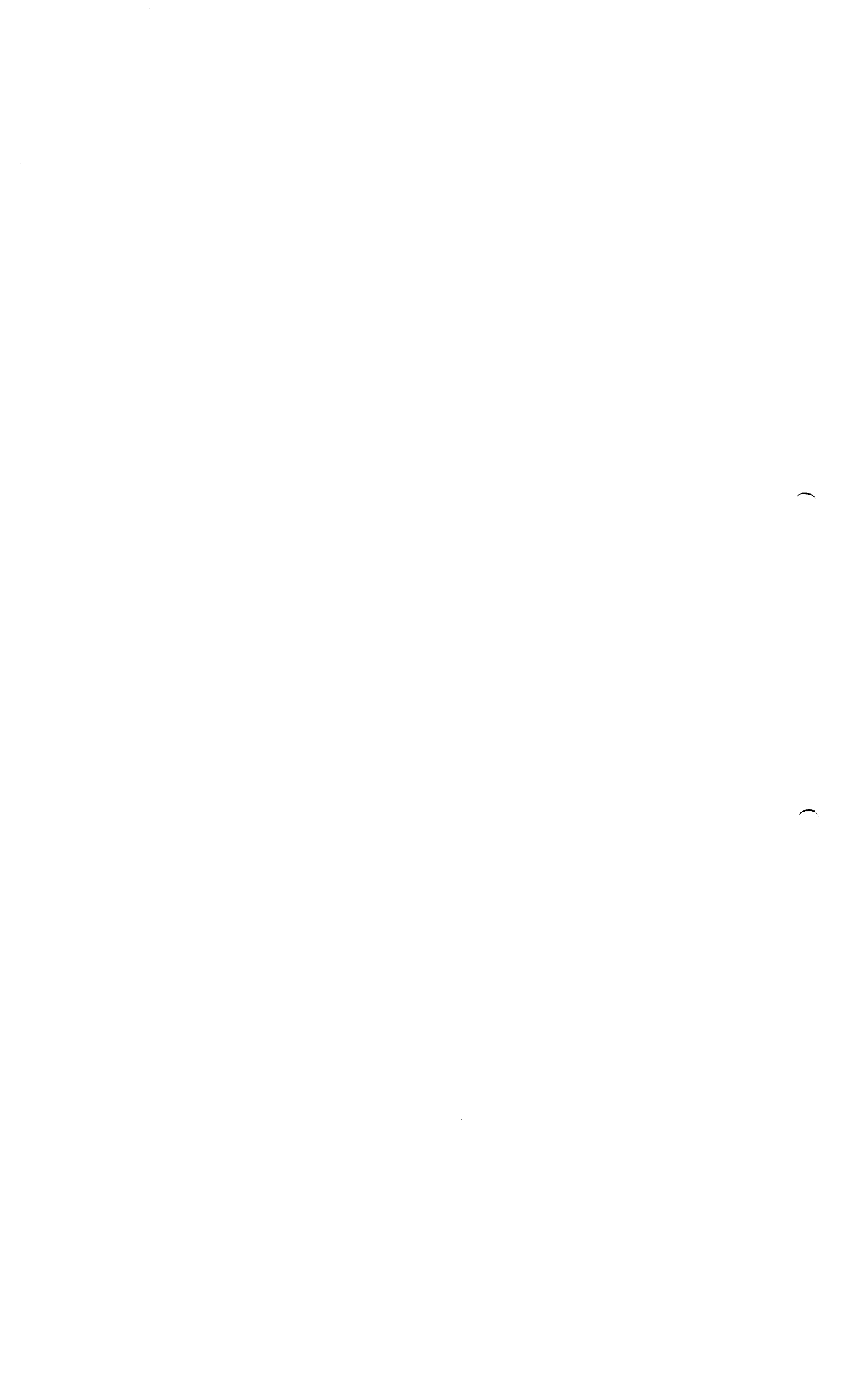
El ensayo de antígeno de varicela es un ensayo inmunoabsorbente competitivo ligado a la enzima de glicoproteína (gp) (ELISA). Este ensayo cuantifica la reacción competitiva entre una cantidad fija de anticuerpos del VVZ policlonales humanos (anti-VVZ), que reacciona a una Ensayo soluble de antígeno

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



de proteína en la muestra de vacuna, y el antígeno gp de VVZ conocido en la placa de Ensayo de ELISA. Se usa una curva estándar en cada placa para determinar la concentración de antígeno.

El suero humano anti VVZ se incuba previamente con el granel final. Esta reacción reduce la cantidad de anticuerpo disponible para unirse a la gp inmovilizada. La mezcla de antígeno-anticuerpo posteriormente se añade a pozos de placa de ELISA, que están recubiertos con antígeno de gp de VVZ. También se añade un anticuerpo secundario, alcalino fosfatasa-conjugado, específico para la IgG humana. Después de la incubación y adición de substrato p-nitrofenil fosfato disódico hexahidratado (PNPP), la reacción enzimática entre la fosfatasa alcalina y el PNPP se extingue mediante la adición de hidróxido de sodio. El producto de la hidrólisis se cuantifica con una medición de la absorbancia a 405 nm. La cantidad de antígeno presente es inversamente proporcional a la absorbancia. El contenido de antígeno de la muestra se interpola entonces a partir de la curva estándar del ensayo, usando un ajuste logístico de cuatro parámetros. Se considera que una muestra es satisfactoria si el contenido de antígeno está entre 21.6 y 64.2 unidades/ml.

Cumplimiento con Regulaciones:

El CP9110.654 ha sido revisado contra requerimientos y lineamientos regulatorios de todo el mundo, y es consistente con:

Ph. Eur. *Farmacopea Europea*, 2.7.1. Métodos inmunoquímicos.

3.2.10 Procedimiento de Control 9110.668: Ensayo de seguridad en cultivo tisular de vacunas de virus vivos, vacuna contra hepatitis A y bancos celulares

El Procedimiento de Control (CP) 9110.668, Ensayo de seguridad en cultivo tisular de vacunas de virus vivos, vacuna contra hepatitis A y bancos celulares, describe una Ensayo de pureza in vitro para la detección de agentes extraños. Esta Ensayo es un método de Ensayo cualitativa para la detección de cualquier agente transmisible, capaz de alterar la morfología o crecimiento de las células en cultivo.

Muestras para la Ensayo:

Banco de células de trabajo del fabricante (MRC-5)

Medio ya utilizado de banco de células madres

Fluidos de control recolectados

Granel preclarificado y sonicado

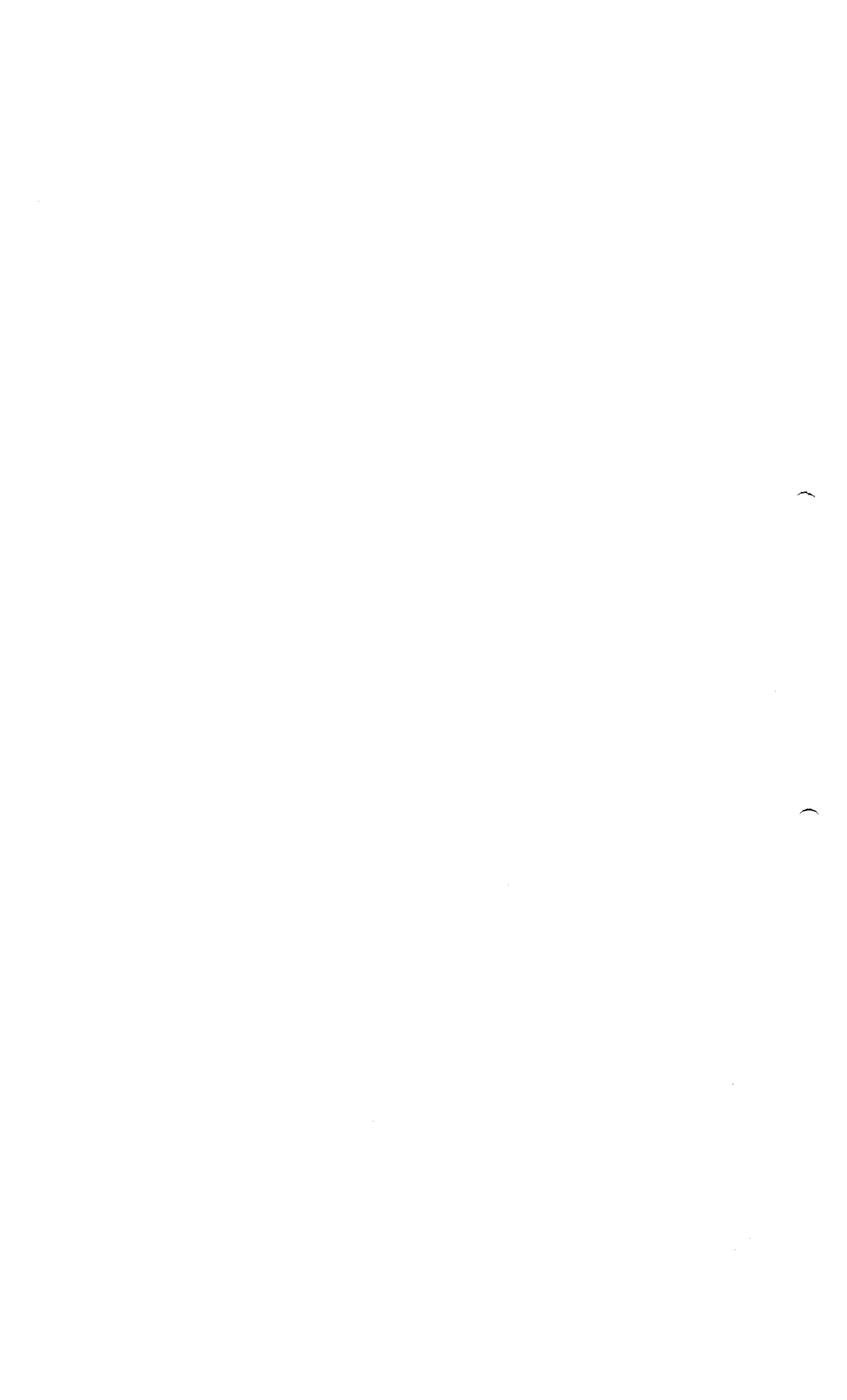
Semilla de almacenamiento sonicada

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. NAC. 51.925





Medio ya utilizado de semilla de almacenamiento P30

Fuente de control de semilla de almacenamiento

Semilla madre preclarificada y sonicada

Fuente de control de semilla madre

Fluidos de control recolectados de semilla madre

Referencias y controles:

Control positivo: vacuna no neutralizada

Control negativo: células no inoculadas

Control de suero: control de anticuerpo o antisuero

Líneas celulares y animales de Ensayo:

Células Vero de epitelio de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*)

Células MRC-5 de fibroblastos de pulmón, diploides, de ser humano, masculino (*Homo sapiens*)

Células HeLa de epitelio de adenocarcinoma de ser humano (*Homo sapiens*)

Células LLC-MK₂ de epitelio de riñón de mono Rhesus (*Macaca mulatta*)

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

Procedimiento:

Las fuentes de control no neutralizadas, el producto intermedio de granel neutralizado con anticuerpo y los controles adecuados se absorben en varios cultivos celulares por 1 a 1.5 horas, a una temperatura de 36 a 38°C. Se extrae el inóculo, los cultivos se lavan dos veces, se realimentan con medio suplementado, y se colocan en una incubadora a 36-38°C por 14 días. Cada 7 días (el Día 7 y 14 después de la incubación), todos los cultivos se examinan en busca de presencia de agentes extraños, situación evidenciada por la degeneración y el efecto citopático (CPE) de la capa celular, y después se realimentan. En el Día 14, un porcentaje de fluidos de control de cada matraz se subtransfiere hacia un nuevo cultivo celular y se incuba por 14 días, con examen microscópico, y se realimenta cada 7 días. Al final de cada período de 14 días, los cultivos que han sido inoculados con muestras de fuente de control se vuelven a probar en busca de virus hemadsorbentes y agentes extraños.

Las muestras se consideran satisfactorias si no se detecta ningún efecto citopático atribuible a un agente transmisible y no se detecta hemadsorción (HAd) en ningún cultivo primario o subcultivo de las muestras de la fuente de control. Si hay presente efecto citopático, o si hay presente degeneración no específica en cualquier matraz comparado con los controles, los fluidos de dichos matraces se subtransferen para determinar si el virus varicela-zóster (VVZ) es el agente causante. Si el VVZ es el agente causante, los fluidos de cultivo de la primera infección se neutralizan nuevamente, antes de subtransferirse. Si se

MERCK SHARP & DOHME ARG. INC

FAMILIA 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. 51.625



observa contaminación nuevamente con VVZ en la subtransferencia, se repite la subtransferencia con neutralización adicional. Se considera que la causa de la degeneración está asociada con la Ensayo si no se encuentra ningún agente transmisible en la subtransferencia que pueda explicar el efecto citopático o la degeneración. Si menos del 50% de la monocapa del cultivo celular original está afectado, se pueden continuar las Ensayos con el matraz afectado.

Un volumen de 50 ml de granel preclarificado, sonicado y neutralizado y de semilla de almacenamiento de varicela deben completar las Ensayos en tipos de células Vero y MRC-5. Un mínimo de 10 ml de fluidos de control para las muestras correspondientes de control de semilla de almacenamiento o de producción en fuente deben completar las Ensayos en los tipos de células apropiados.

Cumplimiento con Regulaciones:

El CP9110.668 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), Centro para la evaluación e investigación de productos biológicos 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. *Farmacopea Europea*, 0153 Vacunas para uso humano

3.2.11 Procedimiento de Control 9110.736: Cuantificación de albúmina sérica bovina residual en vacunas de virus vivos a granel por inmunoensayo enzimático

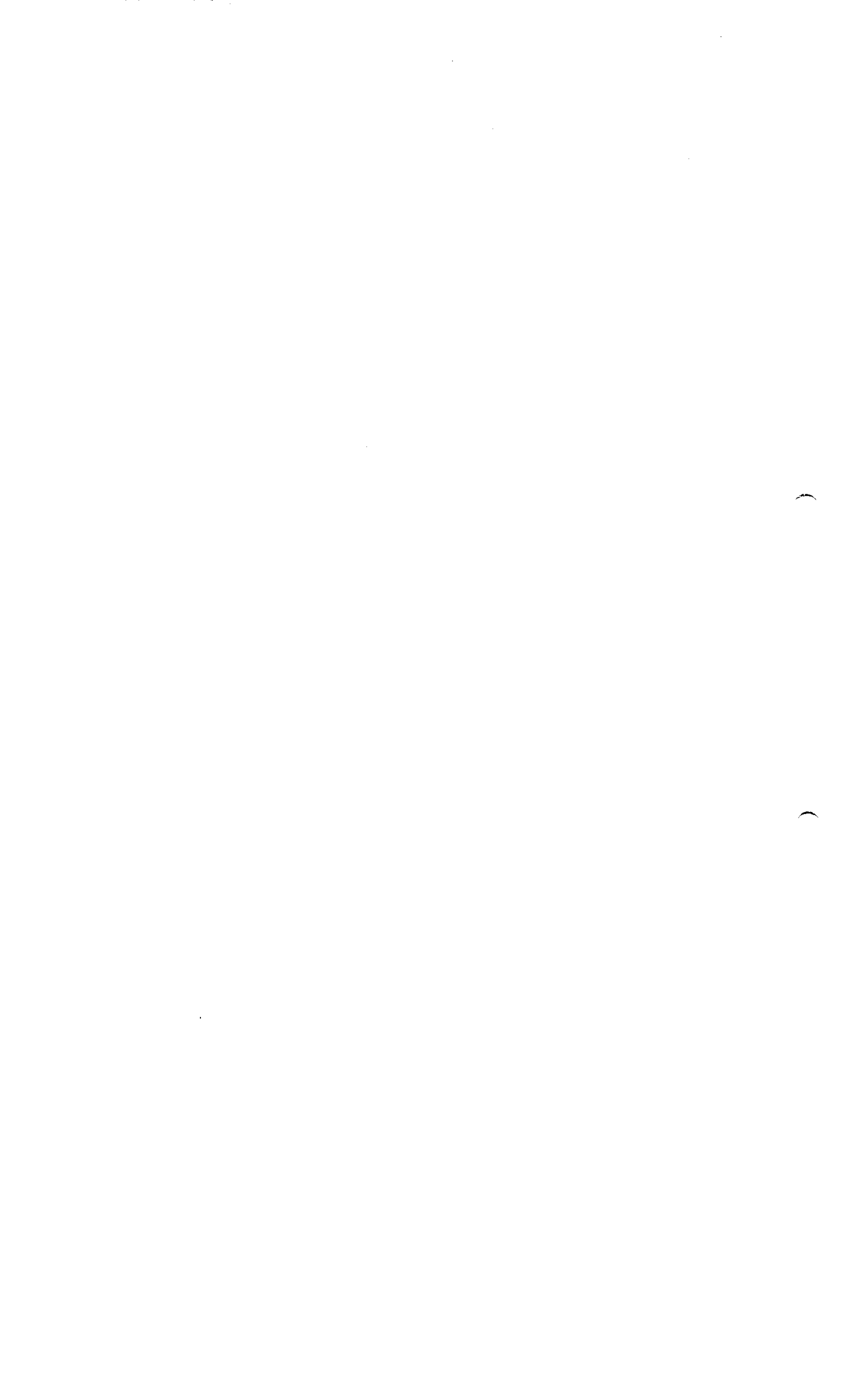
El Procedimiento de Control (CP) 9110.736, Cuantificación de albúmina sérica bovina residual en vacunas de virus vivos a granel por inmunoensayo enzimático describe una Ensayo para impurezas derivadas del proceso. Esta Ensayo sirve para cuantificar la cantidad de albúmina sérica bovina residual (BSA) en la vacuna a granel.

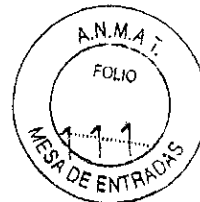
MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.

Faith. MARIA CECILIA CAMPOS
DIRECTORA TÉCNICA
MATRICULA NACIONAL 12373

MERCK SHARP & DOHME ARGENTINA INC.

Dr. SANTIAGO RODRIGUE
DIRECTOR APODERADO PARA
ASUNTOS MEDICOS Y REGULATORIOS
MAT. NAC. 51.825





Muestras para la Ensayo:

Granel final

Referencias y controles:

Referencia: Estándar de albúmina sérica bovina (BSA) del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST),

Material de Referencia de Estándar de BSA al 70%

Control positivo: Una matriz de muestra calificada que contenga BSA

Control negativo: Búfer de diluyente

Procedimiento:

La albúmina sérica bovina (BSA) se cuantifica por referencia a una curva estándar preparada a partir de estándar de proteína de albúmina sérica bovina del NIST. El ensayo es un inmunoensayo enzimático (EIA) de tipo "sandwich", en el cual pozos de una placa de microtitulación se recubren con anticuerpo para captura de inmunoglobulina (anti-BSA) de albúmina sérica bovina. La muestra de vacuna y las soluciones estándar se añaden a pozos específicos en los cuales la BSA en la muestra y el estándar se une al anticuerpo de captura. Después de la incubación, se añade anticuerpo conjugado de peroxidasa de rábano picante específico para BSA a cada pozo, y la placa se incuba adicionalmente. El exceso de anticuerpos se elimina y se añade una solución de substrato de tetra metil benzidina (TMB). La enzima restante unida de peroxidasa de rábano picante cataliza una reacción con TMB. Esta reacción produce un color azul que se desarrolla en proporción respecto a la cantidad de BSA presente en el pozo. Esta reacción se reprime mediante la adición de una solución de ácido fosfórico al 0.65%, y la densidad óptica (DO) se lee a una longitud de onda de 450 nm. Cada Ensayo incluye un control positivo para verificar el desempeño del ensayo, así como una curva estándar. La concentración de BSA en la muestra y el control positivo se extrapola por comparación de la densidad óptica de la muestra con la densidad óptica de diluciones seriales del estándar. La muestra del contenedor lleno se calcula a partir de la concentración y dilución del granel final y se considera satisfactoria si el contenido de BSA es $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ después de la reconstitución.

Cumplimiento con Regulaciones:

El CP9110.736 ha sido revisado contra requerimientos y lineamientos regulatorios de todo el mundo, y es consistente con:

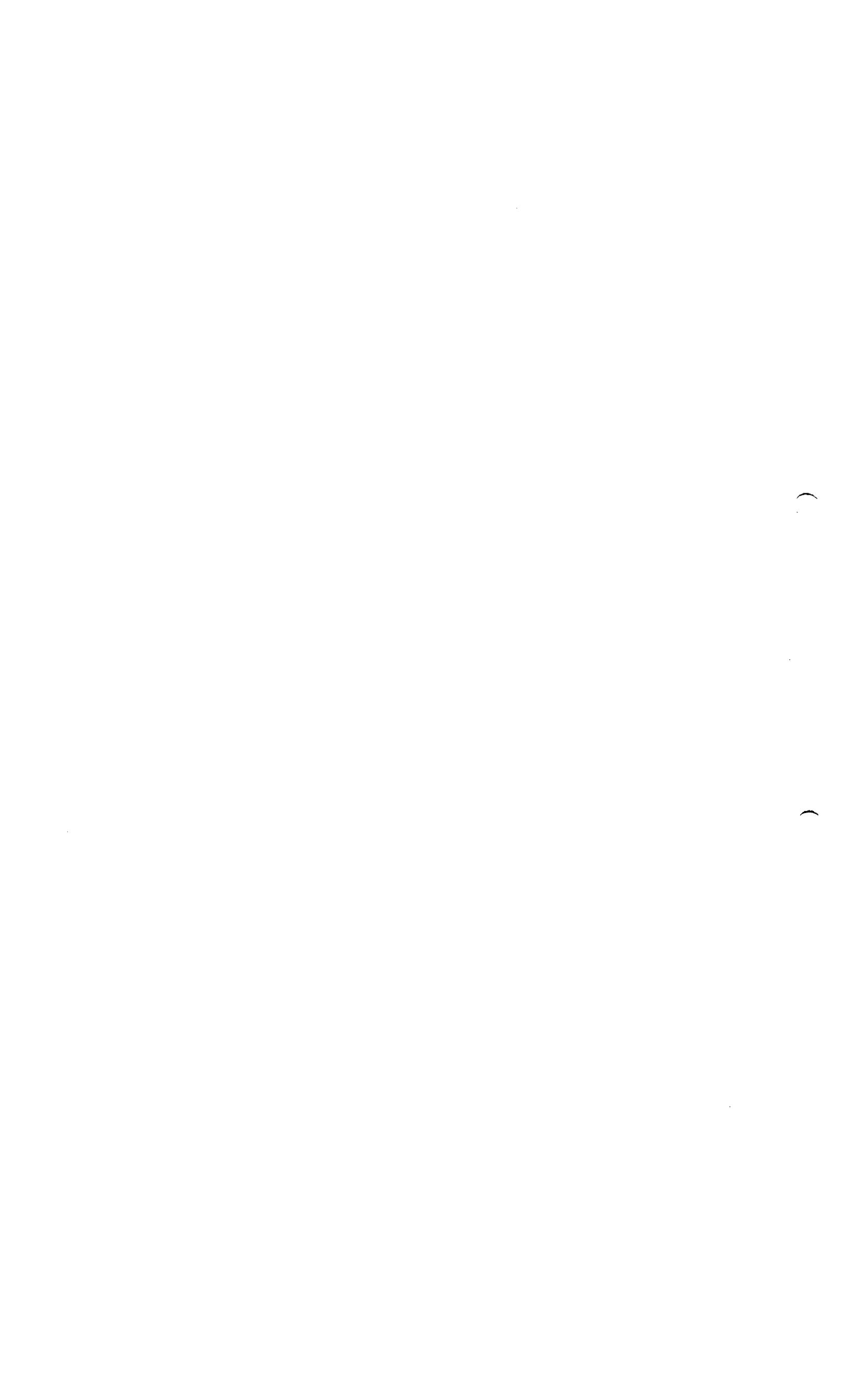
Ph. Eur. Farmacopea Europea, 2.7.1. Métodos inmunoquímicos.

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. NAC. 51.525



3.2.12 Procedimiento de Control 9110.744: Identidad cariológica y certificación cariológica del banco de células

El Procedimiento de Control (CP) 9110.744, Identidad cariológica y certificación cariológica del banco de células, describe dos Ensayos de liberación cariológica: (1) certificación cariológica del banco de células y (2) Ensayo de identidad cariológica. La certificación cariológica del banco de células se usa para monitoreo cromosómico y certificación del banco de células de trabajo del fabricante (MWCB) empleado en la producción de virus de varicela zóster (VVZ). Históricamente el monitoreo y la certificación cromosómica se han llevado a cabo en el banco de células de trabajo del fabricante. Sin embargo, de acuerdo con los nuevos requerimientos de la *Farmacopea Europea (Ph. Eur.)* para bancos celulares, el monitoreo cromosómico no se realizará en los futuros bancos de células de trabajo del fabricante. En su lugar se empleará la Ensayo de identidad consistente con la *Farmacopea Europea*; es decir, la Ensayo de huella digital del ácido nucleico. La Ensayo de identidad cariológica se lleva a cabo para verificar la identidad de las células empleadas en la producción de vacuna de varicela y también para la liberación y certificación del banco de células de trabajo del fabricante.

Muestras para la Ensayo:

- Células de control de semilla de almacenaje
- Células de control
- Células de control de semilla madre
- Banco de células de trabajo del fabricante (MRC-5)

Referencias y controles:

Todos los cariotipos se comparan con el cariotipo humano estándar [Ref. 3.3:10]. Los datos de las certificaciones de banco celular se evalúan contra los estándares establecidos [Ref. 3.3:11].

Líneas celulares y animales de Ensayo:

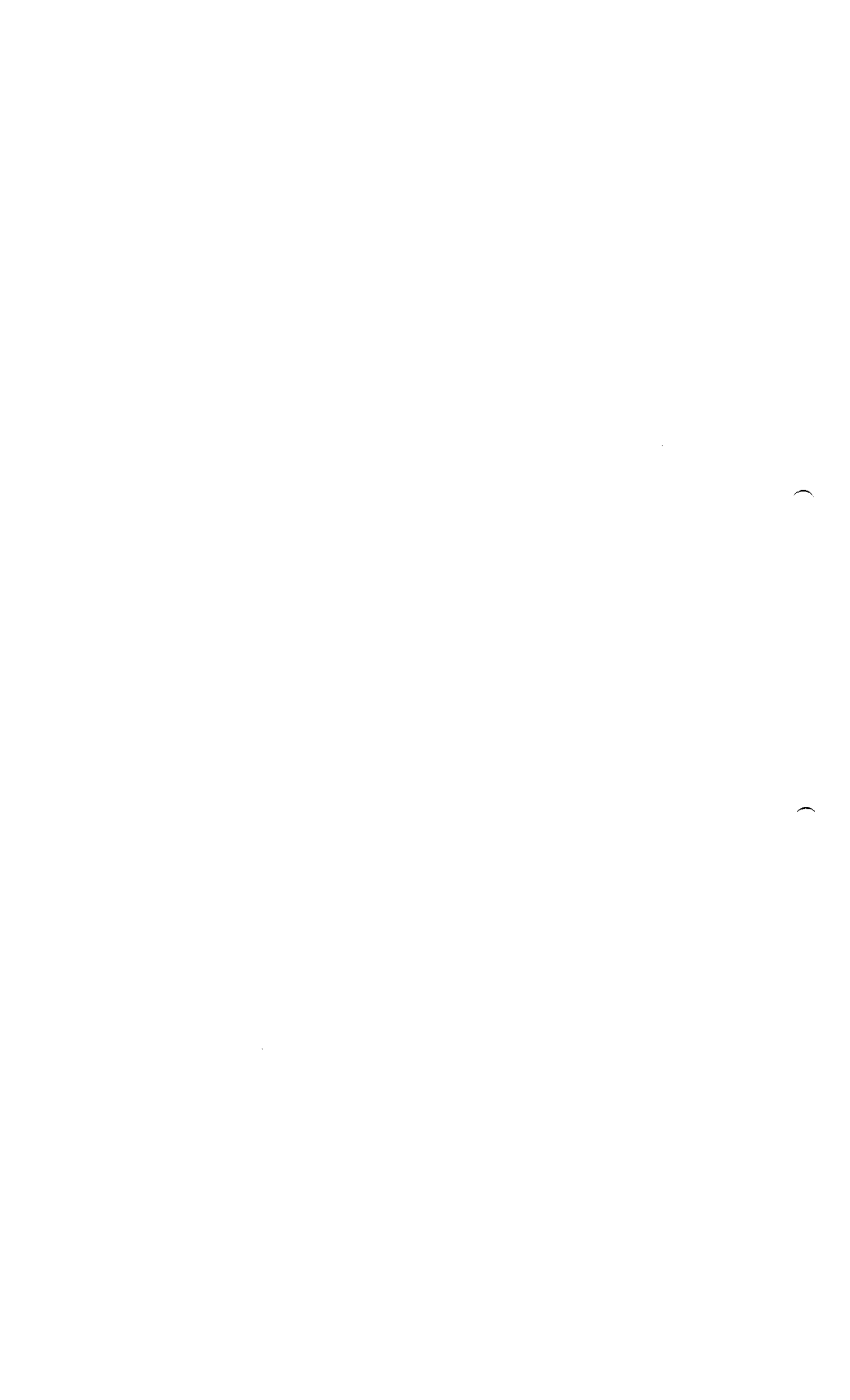
Células MRC-5 de fibroblastos de pulmón, diploides, humanos, macho (*Homo sapiens*).

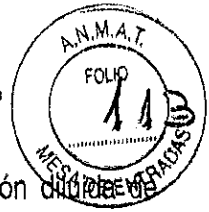
Procedimiento:

Las Ensayos cariológicas en las células MRC-5 se llevan a cabo usando células control (esto es, no inoculadas con virus) procesadas de la misma manera que la vacuna a granel. Se preparan portaobjetos

MERCK SHARP & DOHME ARG INC
 FAMILIA MARIA CECILIA CAMPOS
 DIRECTORA TÉCNICA
 MATRÍCULA NACIONAL 12374

MERCK SHARP & DOHME ARGENTINA INC.
 DR. SANTIAGO RODRIGUEZ
 DIRECTOR APODERADO PARA
 ASUNTOS MEDICOS Y REGULATORIOS
 MAT. NAC. 51.525





con diseminaciones de cromosoma en metafase a partir de cultivos celulares.

Las células en metafase posteriormente se bandean por tratamiento con una preparación de tripsina, seguida de tinción de Giemsa. Esta técnica produce patrones de bandeo característicos en cada uno de los cromosomas. Las imágenes fotografiadas o digitalizadas de los cromosomas se pueden entonces hacer concordar con sus homólogas por patrón de bandeo y morfología de cromosoma. Estos cromosomas posteriormente se colocan de manera ordenada, de acuerdo con una convención establecida, produciendo un cariotipo de dicha célula en metafase. El lote es satisfactorio si se determina que el cariotipo de la célula en metafase es macho (XY), humano (46 cromosomas) y las características son típicas del banco de células de trabajo del fabricante.

Para la certificación del banco celular, el índice de poliploidias y de anomalías cromosómicas en una muestra de 500 células en metafase no debe exceder del número establecido [Ref. 3.3:11]. La Ensayo de identidad cromosómica de lotes de producción hechos a partir de un banco celular certificado se limita al análisis de una célula en metafase normal. El lote es satisfactorio si se determina que el cariotipo de la célula en metafase es macho (XY) y humano (46 cromosomas).

Cumplimiento con Regulaciones:

El CP9110.744 ha sido revisado contra requerimientos y lineamientos regulatorios de todo el mundo, y es consistente con:

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, finalizado (Paso 4) 16 de julio de 1997, 2.3.4, Ensayos para cariología y tumorigenicidad.*

Ph. Eur. Farmacopea Europea, 2.5.3. Substratos celulares 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 substratos in vitro para la elaboración de productos biológicos* (Requerimientos para sustancias biológicas núm. 50), C.2.4.3

MERCK SHARP & DOHME ARGENTINA INC.

MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.

Farm. MARIA CECILIA CAMPOS
DIRECTORA TÉCNICA
MATRICULA NACIONAL 12322

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



4) VALIDACIÓN DEL PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

4.1 Procedimiento de control 9110.001: Métodos de Ensayo para esterilidad

El Procedimiento de Control (CP) 9110.001 describe una Ensayo para esterilidad en productos intermedios del granel y vacuna a granel. La Ensayo de esterilidad es una Ensayo in vitro para la detección de agentes extraños. La validación formal de este procedimiento no fue requerida debido a que el método de Ensayo usado en el CP 9110.001 se validó en el *Título 21 del Código de Regulaciones Federales (CFR) Capítulo I, 610.12 Esterilidad*.

Antes de probarse en el Procedimiento de Control, todas las muestras deben certificarse para uso en el CP 9110.001. La certificación de las muestras consistió en efectuar Ensayos para bacteriostasis y fungistasis en el sistema de Ensayo.

El procedimiento de certificación asegura que un amplio rango de organismos, con diferentes requerimientos de crecimiento, se pueda recuperar en 7 días para dos especies bacterianas y para una sola levadura. Los organismos de Ensayo representan un bacilo grampositivo, formador de esporas, aerobio (*Bacillus subtilis*); un bacilo grampositivo, formador de esporas, anaerobio (*Clostridium sporogenes*); y una levadura (*Candida albicans*).

Las Ensayos de bacteriostasis y fungistasis midieron la capacidad del ensayo para detectar microorganismos conocidos a niveles de <100 unidades formadoras de colonia (ufc) a tiempos de incubación máximos de 7 días. Este tiempo de incubación es 7 días más corto que la Ensayo de liberación normal de 14 días.

Todos los medios de cultivo usados para llevar a cabo la Ensayo de bacteriostasis y fungistasis y la Ensayo de esterilidad para liberación son medios que antes de usarse se Ensayon para promoción de crecimiento con números bajos de organismos (<100 ufc). La Ensayo de promoción de crecimiento asegura que se empleen medios con la sensibilidad necesaria para detectar números bajos de organismos en todas las Ensayos de liberación.

MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.

Fam. MARIA ORCILA CAMPOS
DIRECCIÓN TÉCNICA
MATRICULA NACIONAL 12374

MERCK SHARP & DOHME ARGENTINA INC.

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



Conclusión:

La certificación de la muestra para esterilidad fue satisfactoria para todas las muestras que se certificaron directamente. La Ensayo satisfizo los criterios para ausencia de propiedades de ausencia de bacteriostasis y fungistasis en el sistema de Ensayo, tal como se describió en la USP. En consecuencia, las muestras de virus de varicela zóster (VVZ) están certificadas para la Ensayo en CP 9110.001.

4.2 Procedimiento de control 9110.113: Métodos de Ensayo para micoplasma

El Procedimiento de Control (CP) 9110.113 describe una Ensayo para la presencia de micoplasma en productos intermedios del granel y vacuna a granel, usando medios de caldo y agar. Es una Ensayo de pureza in-vitro para agentes extraños y un método compendial consistente con la *Farmacopea Europea (Ph. Eur.)*, la *Farmacopea de Estados Unidos (USP)* y el *Título 21 del Código de Regulaciones Federales (CFR)*.

Las muestras se califican antes de la Ensayo, de acuerdo con un procedimiento de calificación descrito en CP 9110.113.

El procedimiento de calificación requiere la inoculación de ≤ 100 unidades formadoras de colonia (ufc) de dos diferentes especies de micoplasma, *Mycoplasma arginini* (un hidrolizador de arginina) y *Mycoplasma pneumoniae* (un fermentador de dextrosa), en medios agar separados, junto con 200 μ l de material de muestra, por duplicado. Así mismo, se añaden 10 ml de material de muestra a cada una de tres botellas que contienen 90 ml de medio de caldo. Una botella se inocula con ≤ 100 ufc de *Mycoplasma arginini*, y la segunda botella se inocula con ≤ 100 ufc de *Mycoplasma pneumoniae*. La tercera botella sirve como control de la muestra. Las placas y botellas de caldo inoculadas con *Mycoplasma pneumoniae* se incuban aeróbicamente (CO₂ 5% en N₂) a 35-37°C. Las placas y botellas de caldo que contienen *Mycoplasma arginini* se incuban anaeróbicamente (CO₂ 5% en N₂) a 35-37°C. Las placas se leen microscópicamente, y se obtiene una cuenta de colonias en 7-14 días. Las botellas de caldo se colocan en placas de agar por duplicado a 3, 7, 14 y 21 días y se incuban como antes se indicó. Los resultados se reportan en la (Tabla 17).

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

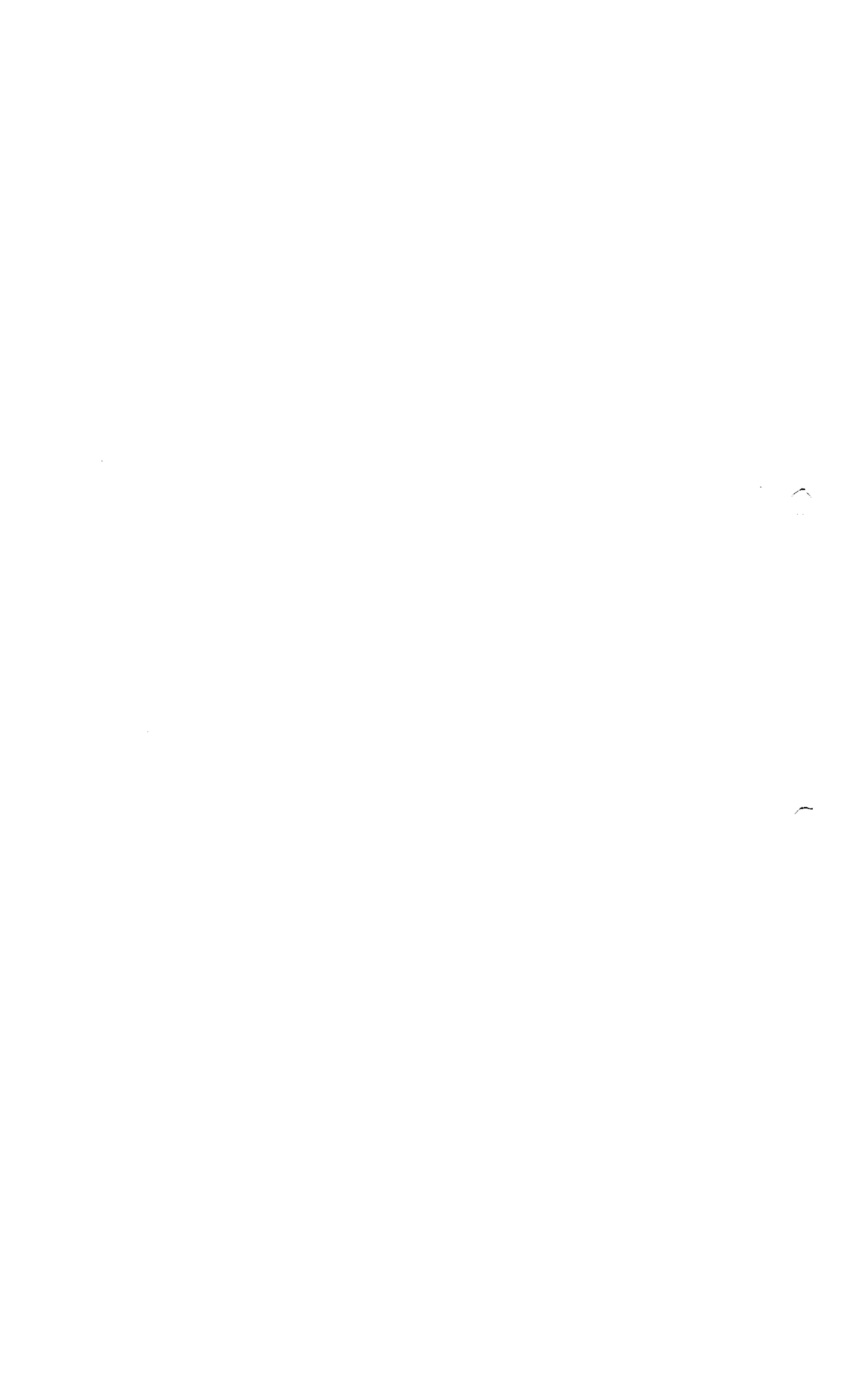




Tabla 17: Resumen de los resultados de la calificación de muestra para el Procedimiento de Control 9110.113: Métodos de Ensayo para micoplasma

Muestra	Recuperación siembra directa (diferencia log ^a)		Siembra subcultivo (incremento log ^b)		Nivel de inóculo (≤100 ufc ^c)		Control negativo
	MP ^d	MA ^e	MP	MA	MP	MA	
Granel preclarificado y presonicado	-0.05	0.08	>3.9	>3.7	≤100	≤100	Negativo
Granel preclarificado y sonicado	-0.05	-0.01	3.1	2.8	≤100	≤100	Negativo
Banco de células MRC-5	-0.11	0.009	3.1	2.0	≤100	≤100	Negativo
Semilla de almacenamiento sonicada y preclarificada	-0.29	0.17	>3.9	3.7	≤100	≤100	Negativo

^aRespecto al control positivo
^bRespecto al inóculo inicial
^cufc: Unidades formadoras de colonia
^dMP: *Mycoplasma pneumoniae*
^eMA: *Mycoplasma arginini*

Conclusión:

La semilla de almacenamiento preclarificada y sonicada, el granel preclarificado y sonicado, el banco de células madres (MRC-5) y el granel presonicado y preclarificado han sido calificados para la Ensayo en CP 9110.113. La fuente de control de semilla de almacenamiento, el medio ya empleado de semilla de almacenamiento P30, la semilla de almacenamiento P30 recolectada en perla, los fluidos de control recolectados, el medio ya empleado de banco de células madres, el banco de células madres, la semilla madre sonicada y preclarificada, la fuente de control de semilla madre, los fluidos de control recolectados de semilla madre, y las células de control recolectadas en perla de semilla madre se calificaron por equivalencia.

MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.

FAMILIA MARTA CECILIA CAMPOS
 DIRECTORA TÉCNICA
 MATRICULA NACIONAL 12374

MERCK SHARP & DOHME ARGENTINA INC.

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

