



Liste des figures

Figura 1: Derivación de los bancos maestros de células7
Figura 2: Producción de los bancos de células Vero de trabajo10



Lista de abreviaturas: vea la sección 2.3 Resumen general de calidad, Introducción.

1 Sistema de bancos de células: línea celular Vero

El virus de la poliomielitis se cultiva en la línea celular continua Vero. Esta línea celular, mantenida bajo un sistema de bancos de células, se divide en bancos de células maestro y de trabajo. Estos bancos de células se utilizan ya en vacunas antipoliomielíticas (formas orales inactivadas) y antirrábicas con licencia, y los extensos datos de calidad que confirman la ausencia de contaminación de los bancos de células han sido revisados y aceptados por las autoridades sanitarias nacionales.

2 Historial de los bancos maestros de células

Según lo establecido en la Ph. Eur. §5.2.1 (terminología utilizada en las monografías de vacunas) lo que antes se llamaban "bancos primarios de células" se designan ahora con el término "bancos maestros de células". Los términos anteriores pueden encontrarse en cierta documentación adjunta (p. ej., certificados de análisis) ya que no se publicaron de nuevo.

Las células de la línea celular continua Vero fueron aisladas y establecidas por Yasumura Y. y Kawakita Y. (Yasumura Y. and Kawakita Y.: Studies on SV40 virus by tissue culture, Nihon Rinsho, 1963, 21, 1201-1215). Las células originales se obtuvieron de células renales del mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*). El banco de células se conserva en la Colección Estadounidense de Cultivos Tipo con la referencia ATCC-CCL81.

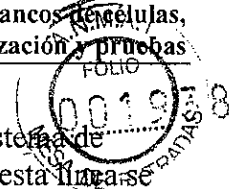
El 22 de mayo de 1979 el Instituto Mérieux recibió una ampolla de estas células en el pasaje 124. Esta ampolla recibió la referencia F1415 y formó la base de las células Vero utilizadas para el crecimiento viral.

Las células fueron amplificadas desde el pasaje 124 hasta el pasaje 129 y constituyeron así los bancos maestros de células. Se obtuvieron dos bancos maestros de células, A y B. Ambos bancos maestros de células se cultivaron en medio 199 (Earle) complementado con suero de ternero. No obstante, el banco maestro de células A se preparó con un medio que contenía antibióticos (14 UI/mL de sulfato de polimixina B, 75 UI/mL de sulfato de estreptomycin y 35 UI/mL de sulfato de neomicina) mientras que el banco maestro de células B se preparó con un medio libre de antibióticos.

En la figura 1 se presenta la descripción del pasaje desde el 124 hasta el 129.

Las dos cosechas obtenidas en el pasaje 129 son:

- Banco maestro de células A almacenado en nitrógeno líquido
⇒ 112 ampollas identificadas como A 129P-21.06.79
- Banco maestro de células B almacenado en nitrógeno líquido
⇒ 105 ampollas identificadas como A 129P-20.06.79



El uso de una línea celular continua para la preparación de vacunas se basa en un sistema de bancos celulares, lo cual significa que una duplicación temprana de la población de esta línea se subcultiva hasta un número adecuado de pasajes para la preparación del banco celular.

Estos dos bancos maestros de células A y B resultaron ser aceptables (esto es, la presencia o ausencia de antibióticos no influyó en la calidad del banco resultante). Estos bancos se pueden utilizar igualmente para la preparación de los bancos de células de trabajo.

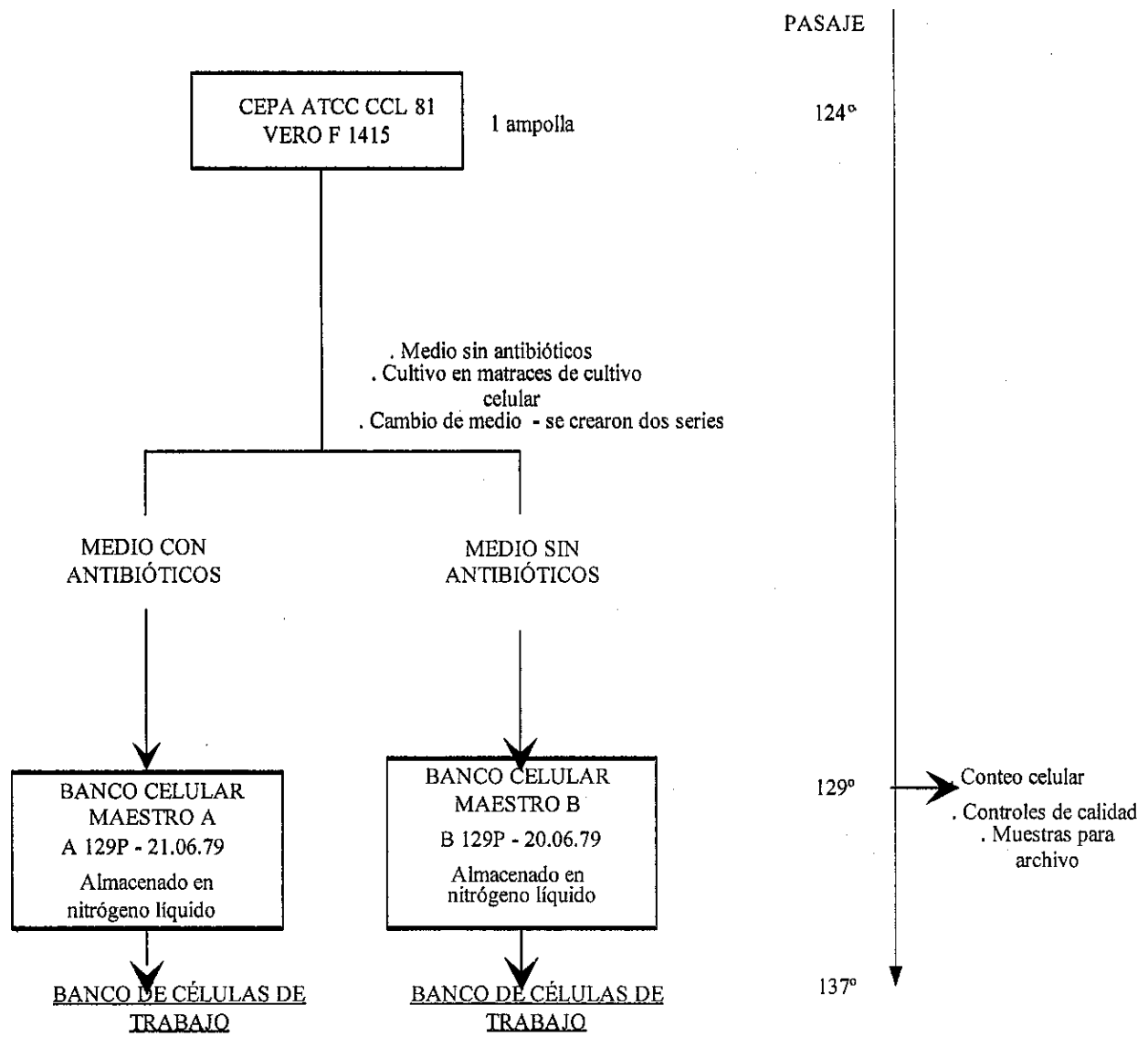

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

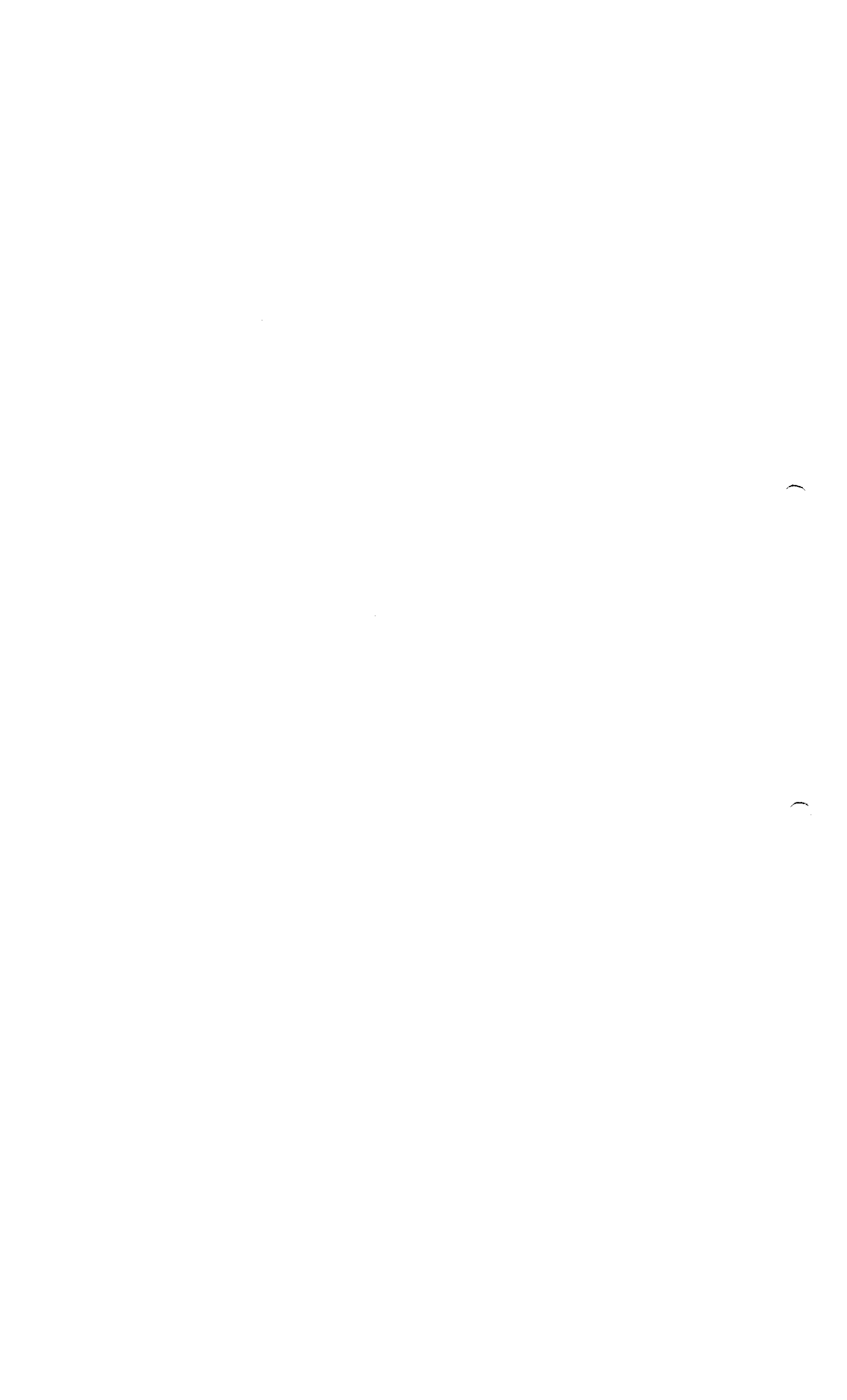

CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
GERENTE
SANOFI PASTEUR S.A.





Figura 1: Derivación de los bancos maestros de células







3 Preparación de los bancos de células de trabajo

3.1 Preparación

El material celular tomado de una o varias ampollas del banco maestro de células se somete a subcultivo en serie y se combina después en una agrupación homogénea para constituir el banco de células de trabajo, que se conserva en condiciones criogénicas (conservación en nitrógeno líquido).

No se utiliza ningún banco de células de trabajo en la preparación de la vacuna que no haya sido reconocido y aprobado por la autoridad nacional de control y que no esté libre de agentes extraños. Los bancos de células de trabajo utilizados para la producción de vacunas se hallan en el pasaje 137 y se prepararon a partir de un banco maestro de células en el pasaje 129.

En la figura 2 se muestra la producción de los bancos de células de trabajo.

Tras descongelar una ampolla del banco maestro de células Vero A o B en el pasaje 129, se lleva a cabo una amplificación de células a +37 °C en medio esencial mínimo (MEM, desde el pasaje 129 al 133) y después en medio Iscove (desde el pasaje 134 al 137), ambos complementados con suero de ternero y antibióticos.

Durante la preparación se utilizan inicialmente pequeños recipientes de plástico (matraces de cultivo de tejido entre 25 cm² y 225 cm²); después se utilizan microesferas portadoras como soporte celular en los biorreactores desde el pasaje 134 hasta el 137. Cada pasaje corresponde al tratamiento tripsínico para separar las capas celulares del soporte.

Se demostró que el suero de ternero y la tripsina empleados para preparar las suspensiones celulares están libres de agentes extraños.

Los biorreactores utilizados para el cultivo son inicialmente matraces de vidrio pequeños que pasan a ser después tanques de acero inoxidable de 28 L y 180 L. Los biorreactores se esterilizan con vapor antes de la introducción del medio, de la suspensión de microesferas y, posteriormente, de las células. Cada tanque está dotado de un sistema de agitación, y un panel de regulación permite el control automático de la temperatura, del pH y de la presión parcial de oxígeno.

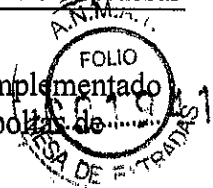
Las células Vero se asientan sobre microportadores, que son microesferas de 180 µm diámetro. Cada microesfera está compuesta por polímeros de dextrano entrecruzados con grupos dietilaminetileno (DEAE) en la superficie. Las pruebas de control de calidad llevadas a cabo sobre las microesferas portadoras se describen en la sección 3.2.S.2.3 Lista y control de materias primas. Las microesferas portadoras se esterilizan con vapor en una solución salina tamponada antes de su introducción en el biorreactor.

Las células Vero se fijan a la superficie de las microesferas, multiplicándose hasta que cubren toda su superficie. Cuando se hinchan, 1 g de microesferas equivale a una superficie de 0,45 m². La concentración de las microesferas se ajusta en cada paso en la medida necesaria para optimizar el rendimiento celular. Las células se separan de las microesferas por tripsinización.



En el pasaje 137 se cosechan las células, se suspenden de nuevo en medio M199 complementado con suero de ternero, dimetilsulfóxido (DMSO) y antibióticos, se distribuyen en ampollas de vidrio estériles selladas, se congelan y se conservan en nitrógeno líquido.

Esta cosecha constituye el banco de células de trabajo.



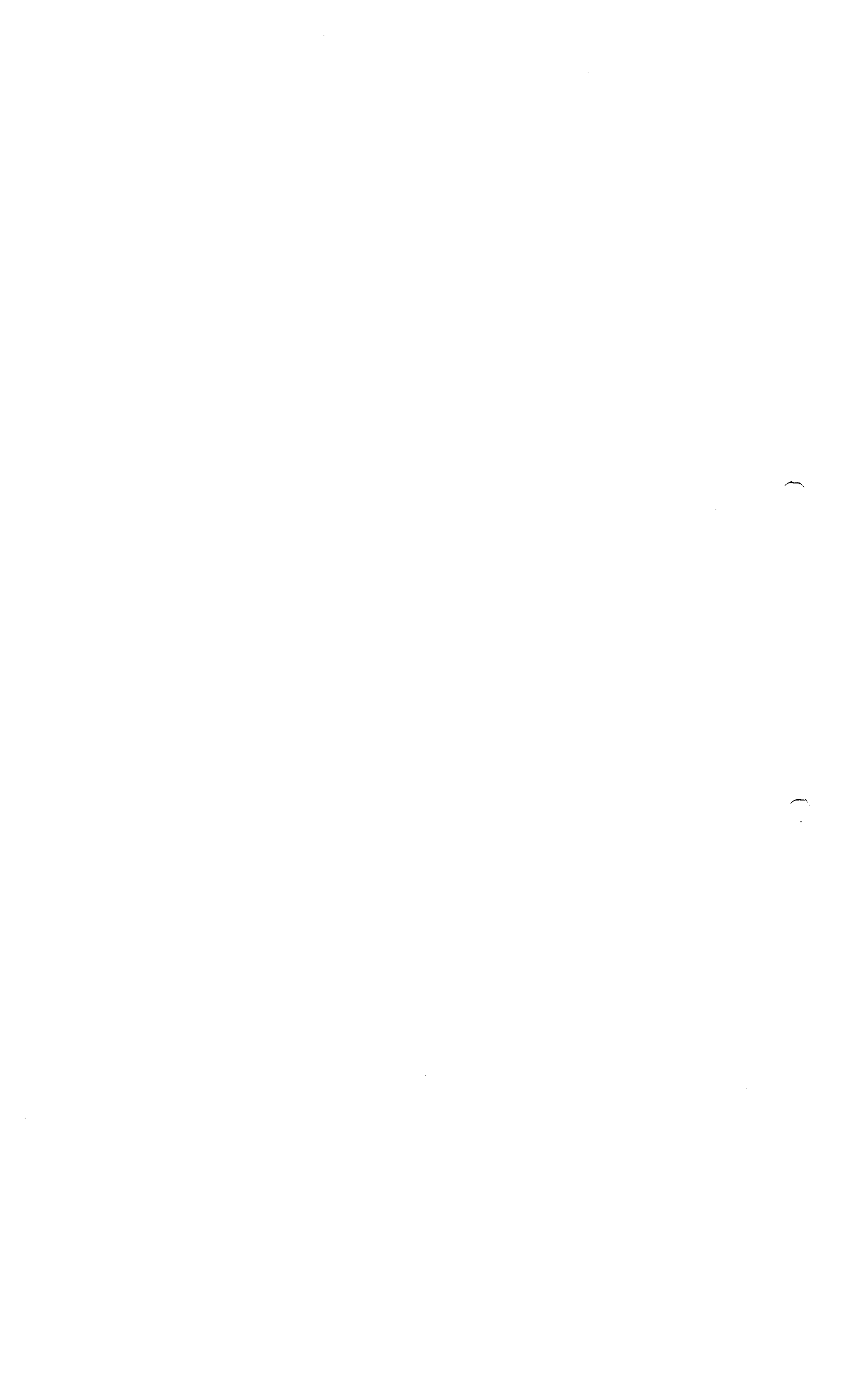
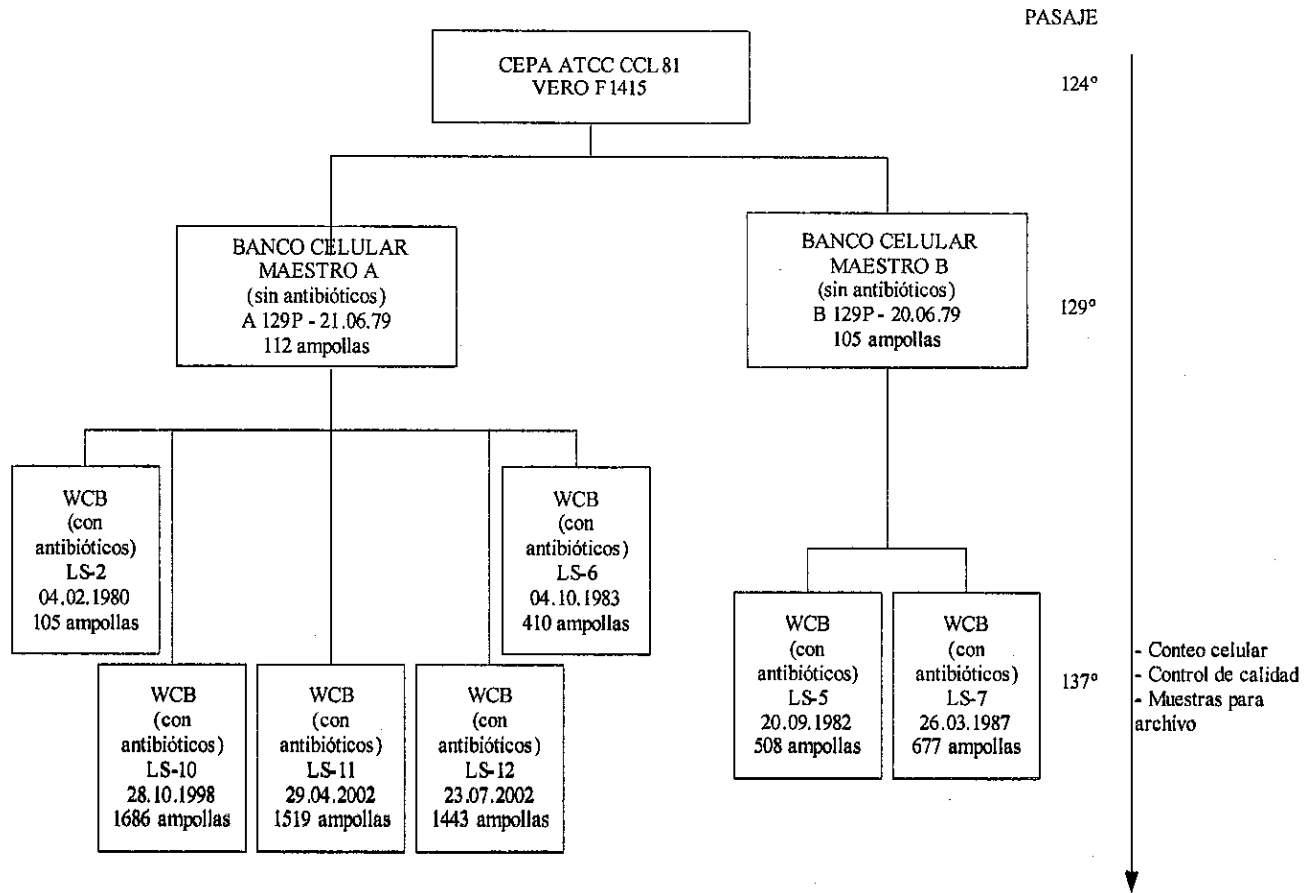




Figura 2: Producción de los bancos de células Vero de trabajo

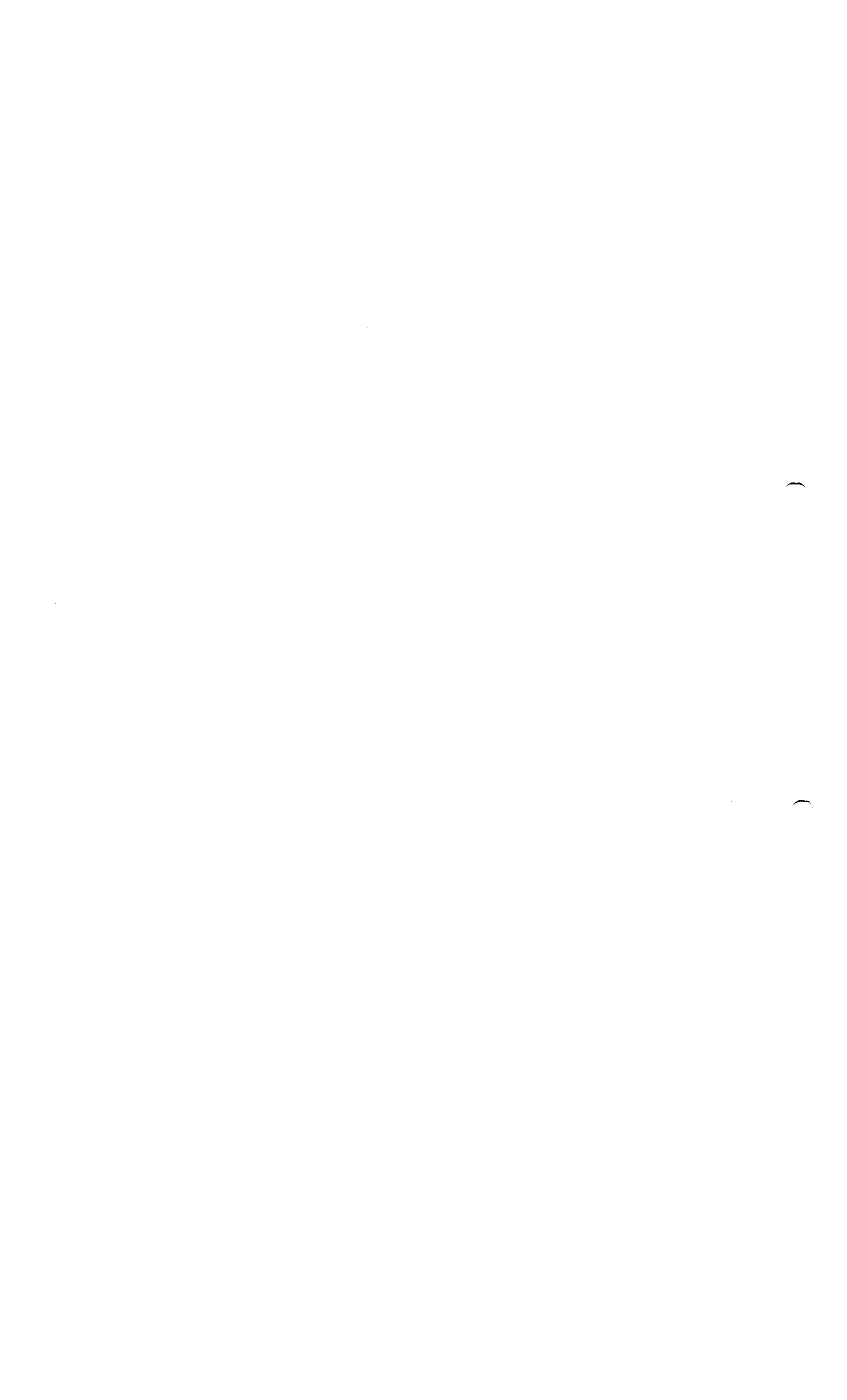


LS-12 y posteriores: propuestos para ser utilizados en la producción cuando las reservas de LS-11 se agoten.

LS-11: utilizado actualmente para la producción.

LS-2, LS-5, LS-6, LS-7, LS-10: ya no se utilizan para la producción.

LS-1, LS-2bis, LS-3, LS-4, LS-8, LS-9: no utilizados para la producción.





3.2 Panorama de los medios empleados durante la producción

En la tabla 1 se presentan los medios empleados en los diversos pasos del proceso de producción del banco de células Vero de trabajo. Estos preparados de medios están basados en los medios patentados estándar en polvo: Iscove, MEM y M199 Earle.

Tabla 1: Panorama de los medios de cultivo empleados durante la producción

Pasaje de amplificación de las células Vero	Base del medio en polvo
130° a 133°	MEM complementado con suero fetal de ternero al 8 % + antibióticos (sulfato de neomicina y sulfato de polimixina B).
134° a 135°	Iscove complementado con suero de ternero donante al 5 % + antibióticos (sulfato de neomicina y sulfato de polimixina B).
136° a 137°	Iscove complementado con suero de ternero donante al 4% + antibióticos (sulfato de neomicina y sulfato de polimixina B).
137: Preparación de la suspensión celular, medio de congelación.	M199 Earle complementado con suero de ternero donante al 15 % + antibióticos (sulfato de neomicina y sulfato de polimixina B).

Una vez preparadas, las soluciones de medio se filtran a 0,2 µm. Además, antes de su adición al biorreactor, cada medio se somete a una filtración adicional a 0,2 µm.



4 Especificaciones de los bancos de células Vero

4.1 Bancos maestros de células

Para los bancos maestros de células se llevaron a cabo dos controles internos:

- Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica.
- Prueba de detección de *Mycoplasma* por el método de cultivo.

Estas dos pruebas se llevaron a cabo utilizando los métodos analíticos de la Farmacopea Europea.

4.2 Bancos de células de trabajo

Los bancos de células de trabajo utilizados anteriormente para la producción de la vacuna antipoliomielítica inactivada (LS-5, LS-6, LS-7 y LS-10) fueron controlados y aprobados por las autoridades sanitarias nacionales de conformidad con los requisitos en vigor en el momento de su producción, esto es, Serie de informes técnicos (TRS) de la OMS n.º 745 (1987), Anexo 3.

El banco de células Vero de trabajo LS-11 (lote FA106611 elaborado el 4 de abril de 2002) se utiliza actualmente para la producción de vacuna antipoliomielítica inactivada.

4.2.1 Especificaciones del banco de células de trabajo utilizado en la producción (LS-10)

El banco de células de trabajo LS-10 (28 de octubre de 1998) se controló de conformidad con el TRS de la OMS n.º 745 (1987), Anexo 3. A continuación se recuerdan las especificaciones en la tabla 2, tabla 3 y en la tabla 4.

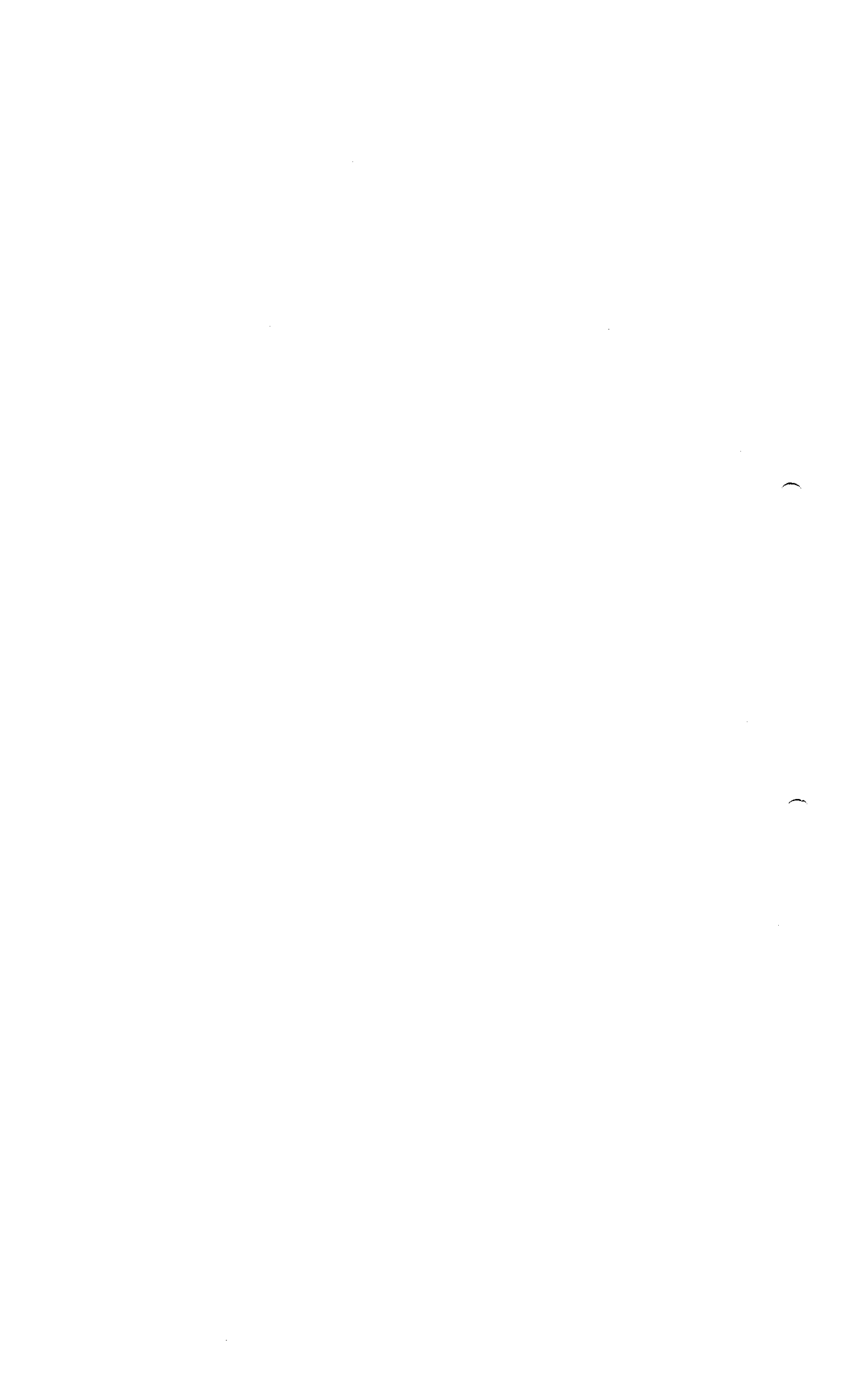




Tabla 2: Perfil de control de calidad del banco de células Vero de trabajo LS-10, pruebas realizadas sobre células en el pasaje 137^o

Pruebas	Requisitos	Métodos	Criterios de aceptación
Observación al microscopio electrónico	Ph. Eur. 5.2.3, edición actual	Microscopía electrónica de transmisión	No se observan virus, partículas parecidas a virus, <i>Mycoplasma</i> , hongos, levaduras ni bacterias.
Observaciones en el día 14	/	Según la Ph. Eur. 2.6.16, edición actual Microscopía óptica	Ausencia de efecto citopático
Hemadsorción en el día 14	/	Según la Ph. Eur. 2.6.16, edición actual Contacto con eritrocitos procedentes de diferentes especies (cobayo, gallina, mono y ser humano).	Ausencia de hemadsorción
Identificación de células de simio	Ph. Eur. 5.2.3, edición actual TRS 745	Según la Ph. Eur. 2.7.1, edición actual Análisis de isoenzimas (lactato deshidrogenasa, fosfogluconato deshidrogenasa, glucosa fosfato isomerasa) mediante enfoque isoeléctrico (IEF).	Identificación positiva

