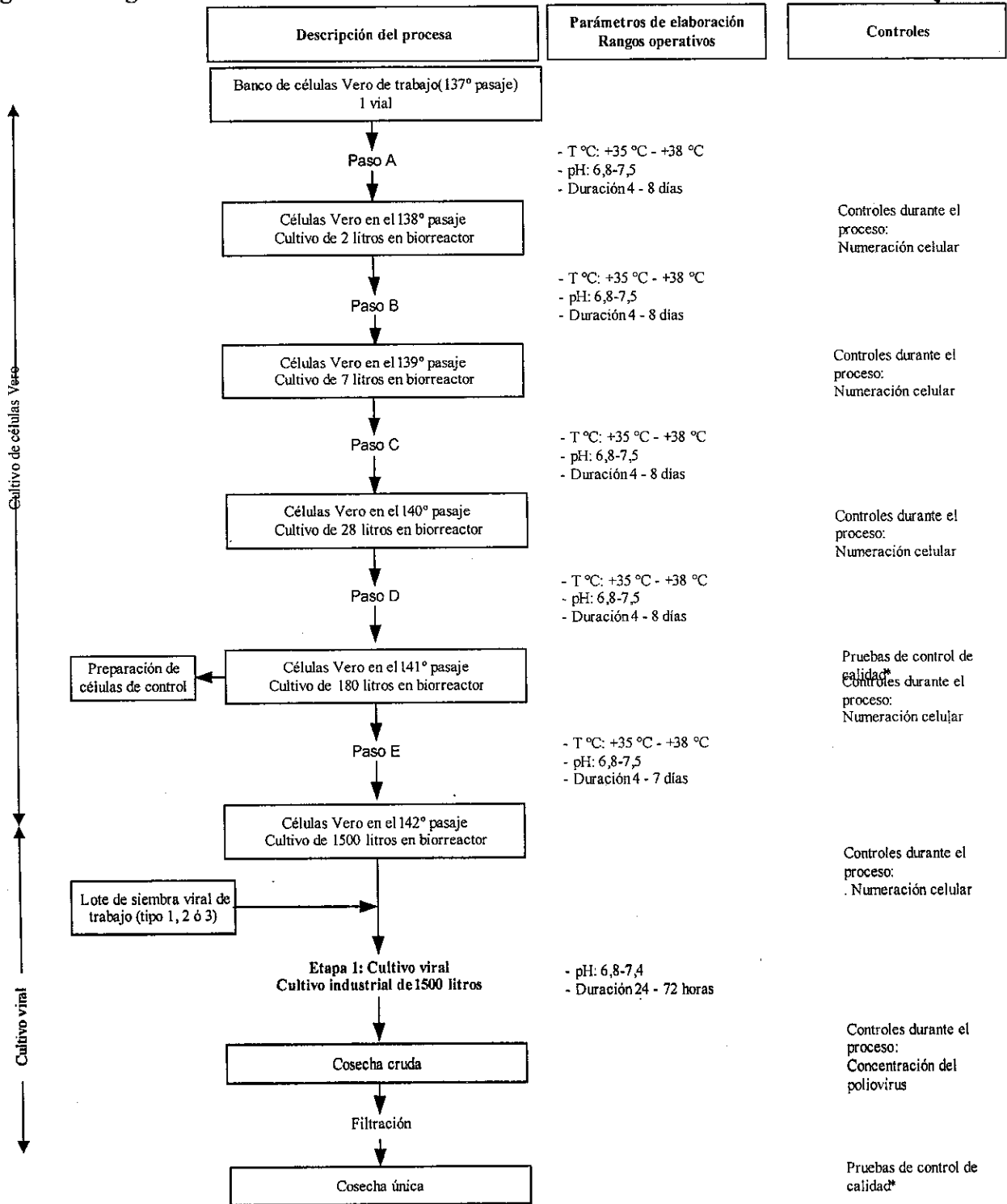
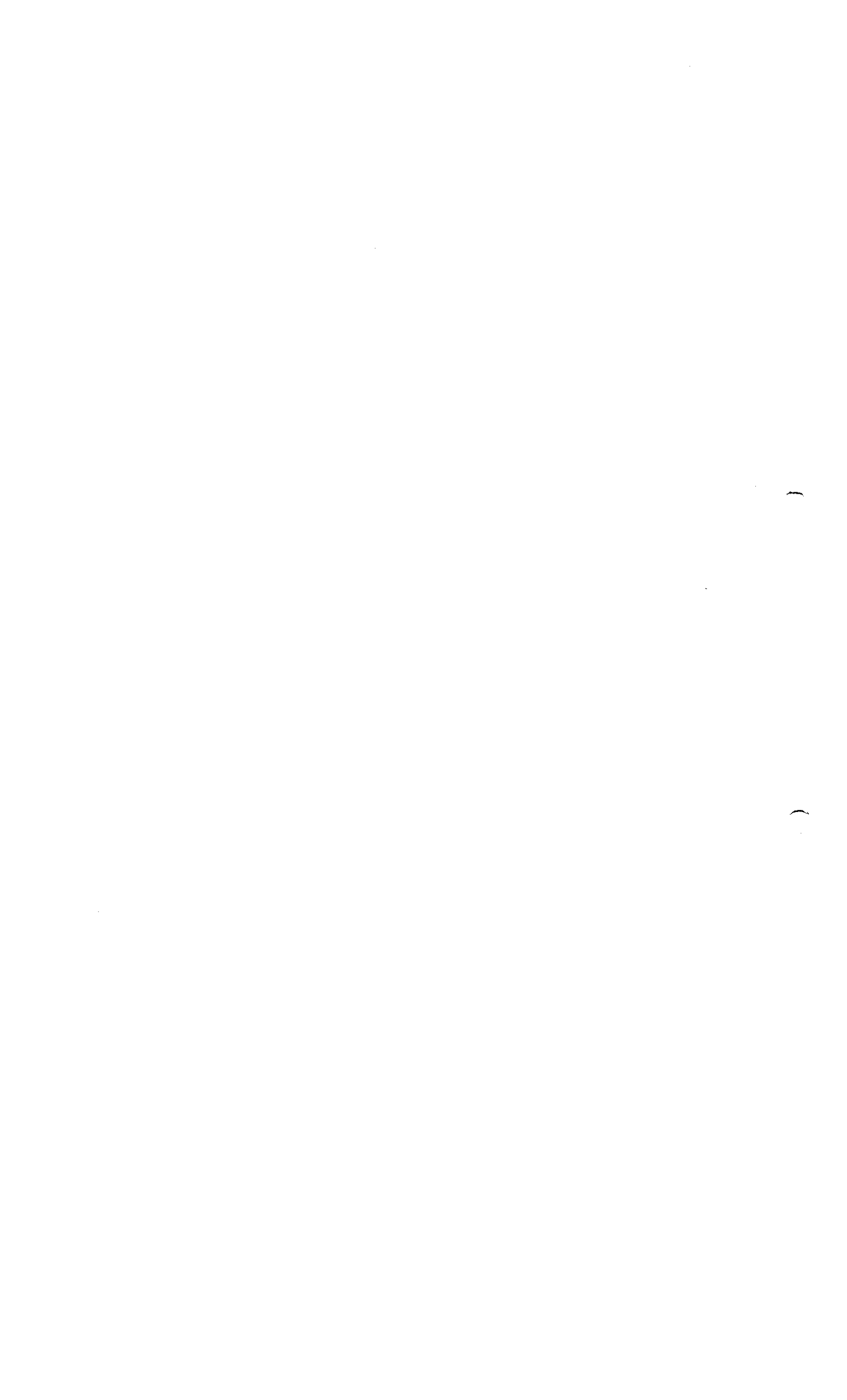


Figura 1: Diagrama de elaboración de la cosecha única



* Las pruebas de liberación de control de calidad se detallan en la sección 3.2.S.2.4 Controles de los pasos críticos e intermedios

ROXANA MONTEMILONE DIRECTORA TÉCNICA SANOFI PASTEUR S.A.
CHRISTIAN DOMINGUEZ APODERADO SANOFI PASTEUR S.A.





1.1 Cultivo de células Vero: pasos A a E

Se descongela un vial del banco de células de trabajo Vero (es decir, en el pasaje 137°) y se cultiva en microesferas portadoras en biorreactores de tamaño creciente hasta el pasaje 142°. La multiplicación a partir del banco de células de trabajo hasta el pasaje 142° incluye cinco pasajes y aproximadamente de 13 a 17 duplicaciones celulares y da como resultado el sustrato celular para la multiplicación viral.

La amplificación celular se lleva a cabo en biorreactores de acero inoxidable. Cada biorreactor y los tubos correspondientes se esterilizan con vapor antes de ser utilizados. Los biorreactores están equipados con un sistema de agitación y un control automático de pH, temperatura y presión parcial de oxígeno.

En la tabla 1 se enumeran los medios de cultivo adecuados así como las características de amplificación.

Tabla 1: Parámetros del cultivo de células Vero

Paso	Características de amplificación (volumen del medio de cultivo)	Medios de cultivo
A	1 vial de 5 mL → 2 litros	Medio A: Iscove + 5% de suero de ternero
B	2 litros → 7 litros	Medio A: Iscove + 5% de suero de ternero
C	7 litros → 28 litros	Medio B: Iscove + 4% de suero de ternero
D	28 litros → 180 litros	Medio B: Iscove + 4% de suero de ternero
E	180 litros → 1500 litros	Medio C: Iscove + 3 % de suero de ternero

Las células Vero necesitan una superficie a la que se puedan adherir para poder crecer. Por lo tanto, se utiliza un cultivo que contiene microesferas portadoras para sostener las células en la etapa de amplificación y en la etapa de multiplicación viral.

Las células se incuban a entre +35 °C y +38 °C bajo agitación, presión y flujo de oxígeno en los medios apropiados durante 4 a 8 días para cada paso desde el A hasta el D y durante 4 a 7 días en el paso E con el pH conservado entre 6,8 y 7,5.

El medio se puede cambiar total o parcialmente durante el cultivo celular si los patrones de crecimiento lo exigen. Al final de cada paso de cultivo desde el A hasta el D, las células se separan de las microesferas portadoras por tripsinización (vea la solución de tripsina en el capítulo 3.2). Los parámetros controlados durante el cultivo incluyen la temperatura, el pH y el crecimiento celular (recuentos de células en alícuotas).

Para planificar la producción, se almacena a veces una suspensión celular obtenida a partir de un cultivo completo del paso C en estado de congelación (nitrógeno líquido) durante un máximo de 24 meses y después se utiliza para inocular directamente un biorreactor en el paso D.

1

1



1.2 Preparación de las células de control

Según las recomendaciones de la OMS, justo antes del final de la amplificación y antes de la inoculación viral, se toma una muestra celular (de unos 500 mL) para los cultivos celulares de control que se ejecutan en paralelo con las células de producción en medio de mantenimiento (vea el medio en el capítulo 3.1.2). Estas células de control se encuentran en el mismo nivel de pasaje que las células de producción (142º).

Se inoculan 32 matraces; se conserva una muestra de células en nitrógeno líquido (en "criotubos") como muestras de archivo. Estos matraces se incuban a entre +36 °C y +38 °C hasta el día de la inoculación viral (4-7 días). Las pruebas realizadas en los cultivos celulares de control se describen en 3.2.S.2.4 Control de los pasos críticos e intermedios.

1.3 Producción de la cosecha única

- Cultivo viral

Del día 4 al 7 del crecimiento celular, la agitación del biorreactor se detiene y se dejan asentar las microesferas y las células adheridas. Se retira el sobrenadante.

Se dejan asentar nuevamente las microesferas y las células y se retira el sobrenadante. Después, se ajusta el volumen con el medio de multiplicación viral (ver el capítulo 3.1.3).

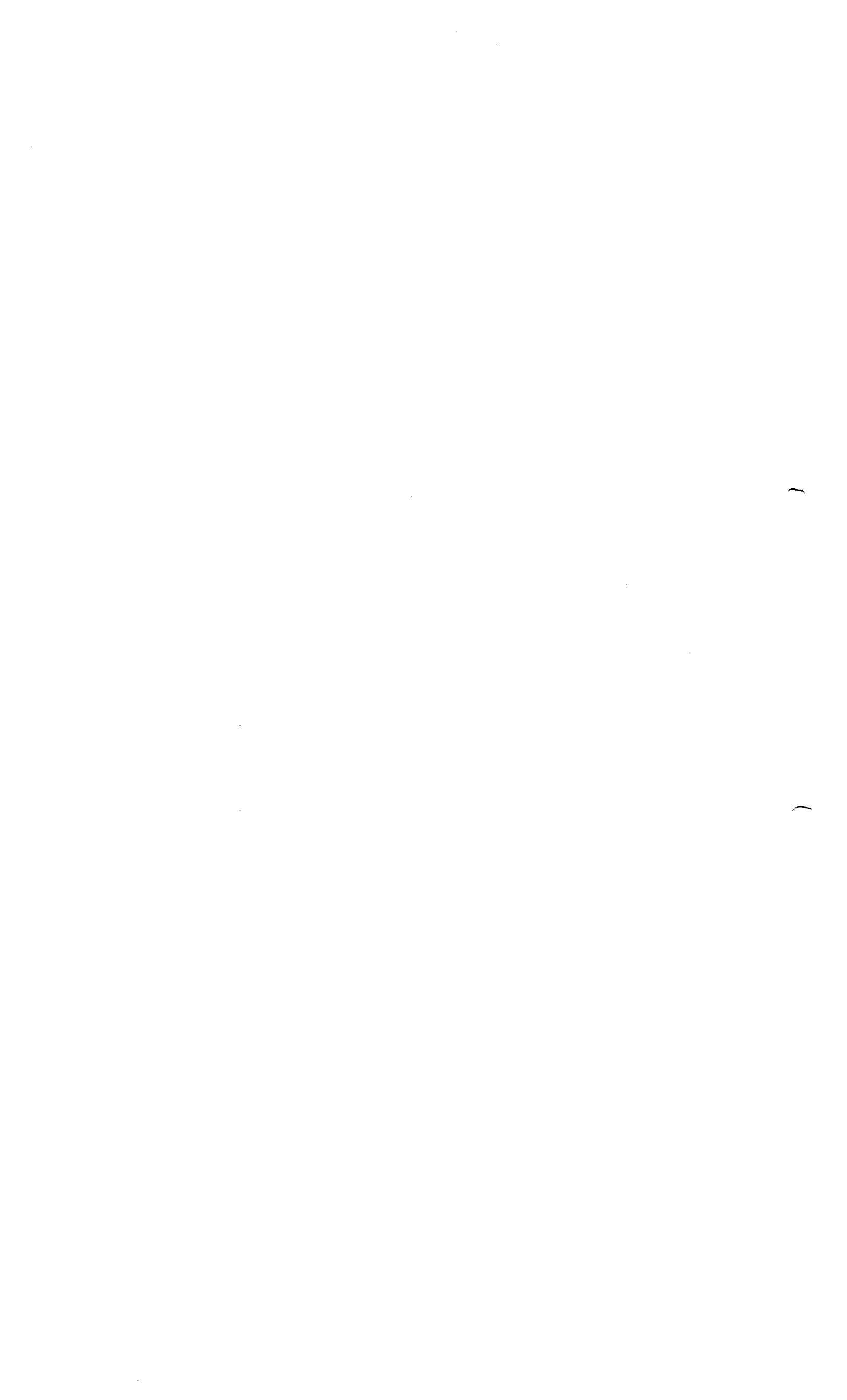
Se añade el medio de multiplicación viral y el volumen adecuado del lote de siembra de trabajo (tipo 1, 2 ó 3) al biorreactor y se incuba el cultivo a entre +35,5 °C y +36,5 °C.

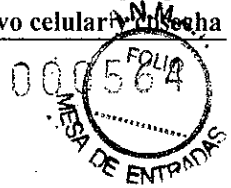
- Cosecha cruda

Al final del cultivo viral, las células Vero son lisadas por el virus de la poliomielitis y por tanto no hay pasos de tripsinización. La replicación viral finaliza entre 24 y 72 días después de la inoculación viral, dependiendo del tipo de virus.

Se detiene la agitación y se recoge el sobrenadante que contiene el virus en un tanque, el cual constituye la cosecha cruda.

La cosecha cruda obtenida se homogeneiza con tierra de diatomeas para desechar las microesferas portadoras residuales y eliminar los residuos celulares y otros componentes de alto peso molecular. Después se filtra el material por varias membranas con tamaños de poro entre 2 µm y 0,2 µm para obtener la cosecha única. Se toman muestras como controles (vea la sección 3.2.S.2.4 Control de los pasos críticos e intermedios).





2 Controles durante el proceso

2.1 Controles durante el proceso aplicados para el cultivo de células Vero

En la tabla 2 se presentan los controles durante el proceso aplicados para el cultivo de células Vero.

Tabla 2: Controles durante el proceso aplicados para el cultivo de células Vero

Paso de elaboración	Controles durante el proceso		
	Prueba	Criterios de aceptación	Justificación
Células Vero en el pasaje 138° (después del paso A)	Recuento de células (método interno).	$\geq 0,59 \times 10^6$ células/mL	Garantizar un cultivo celular óptimo en cada paso.
Células Vero en el pasaje 139 (después del paso B)	Recuento de células (método interno).	$\geq 1,4 \times 10^6$ células/mL	
Células Vero en el pasaje 140° (después del paso C)	Recuento de células (método interno).	$\geq 1,8 \times 10^6$ células/mL	
Células Vero en el pasaje 141° (después del paso D)	Recuento de células (método interno).	$\geq 1,8 \times 10^6$ células/mL	
Células Vero en el pasaje 142° (después del paso E)	Recuento de células (método interno).	$\geq 1,5 \times 10^6$ células/mL	

2.2 Control durante el proceso aplicado para la inoculación y la cosecha viral

En la tabla 3 se presenta el control durante el proceso aplicado para la inoculación y la cosecha viral.

Tabla 3: Control durante el proceso aplicado para la inoculación y la cosecha viral

Paso de elaboración	Control durante el proceso		
	Prueba	Criterios de aceptación	Justificación
Paso de cultivo viral: cosecha bruta	Concentración de poliovirus (método interno)	$\geq 10^7$ CCID ₅₀ /mL	Controlar la producción viral.





3 Medios de cultivo, tampones y otros aditivos utilizados durante el cultivo de células Vero y durante la producción de la cosecha única.

3.1 Medios de cultivo utilizados durante el cultivo de células Vero y durante la producción de la cosecha única

Los medios utilizados para los pasos de cultivo de células Vero y para la producción de la cosecha única están basados en los medios patentados en polvo estándar: Iscove y M199 Earle.

Los polvos patentados se mezclan con otros aditivos y se filtran (a través de una membrana de 0,2 µm) para obtener medios personalizados para pasos de producción concretos, p. ej., crecimiento celular o mantenimiento celular.

Todas las soluciones se filtran a través de una membrana de 0,2 µm antes de su uso.

3.1.1 Medios de cultivo celular

Composición del medio A, medio B y medio C diluidos en agua purificada (Iscove-suero de ternero-antibióticos):

Medio Iscove

NaCl

KCl

NaHCO₃

HEPES

Solución de antibióticos

Suero de ternero

3.1.2 Medio de cultivo celular: mantenimiento

Composición de M199-suero de ternero-antibióticos diluidos en agua purificada (utilizado para la preparación de células de control):

M199 Earle

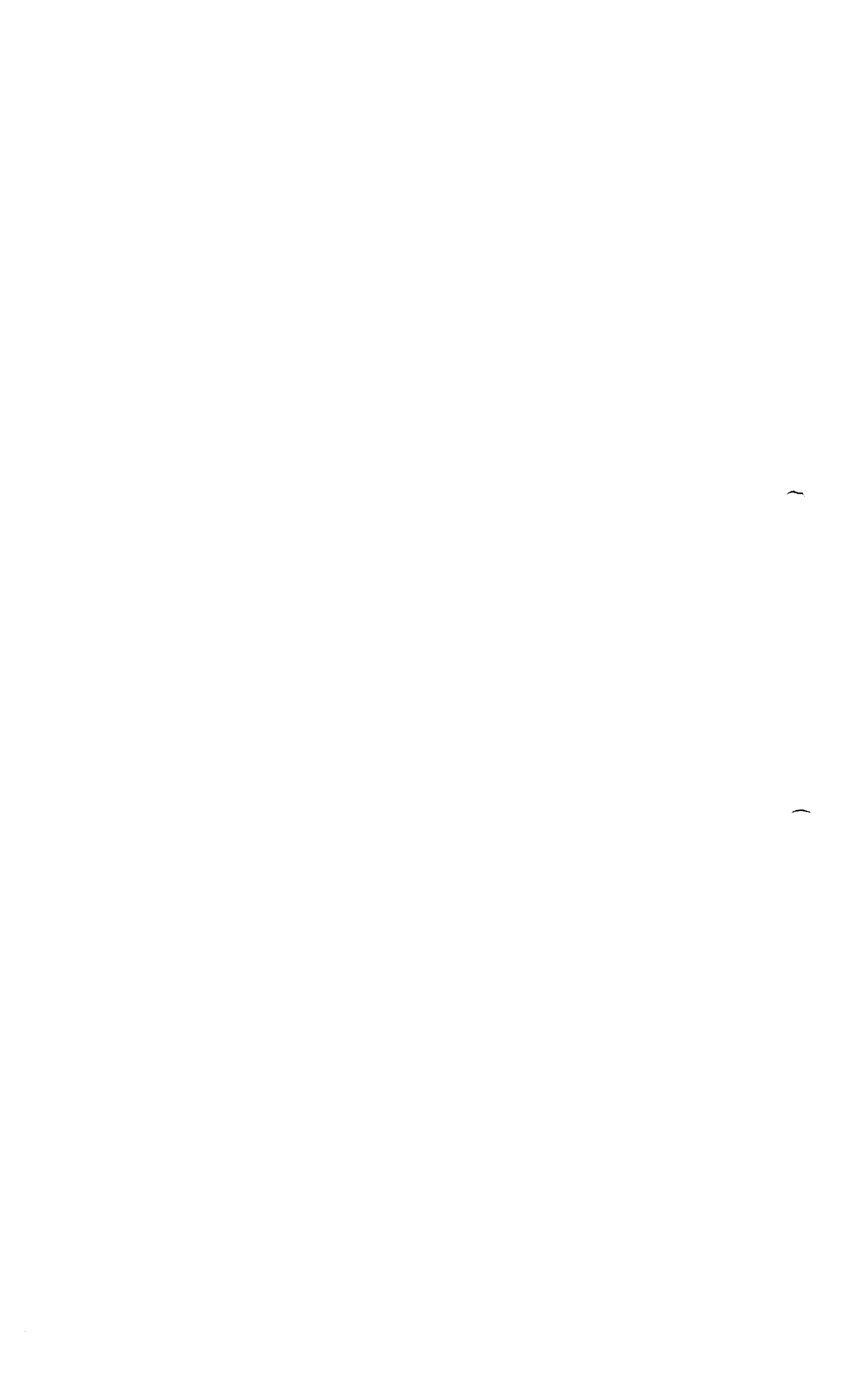
Glucosa monohidrato

NaHCO₃

L-Glutamina

Solución de antibióticos

Suero de ternero





3.1.3 Medio de multiplicación viral

Composición de M199-antibióticos diluidos en agua purificada (utilizado para cultivo viral):

M199 Earle

Glucosa monohidrato

NaHCO₃

L-Glutamina

Solución de antibióticos

3.2 Tampones y otros aditivos utilizados durante el cultivo de células Vero y durante la producción de la cosecha única

- Composición de solución de antibióticos diluida en agua purificada (utilizada en el cultivo celular)

Estreptomicina (sulfato de dihidroestreptomicina)

Neomicina (sulfato de neomicina)

Polimixina B (sulfato de polimixina B)

- Composición de solución de citrato sódico diluida en agua purificada (utilizada en el cultivo celular)

NaCl

KCl

Na₂HPO₄; 2H₂O

KH₂PO₄

Citrato sódico; 2 H₂O

- Composición de solución de tripsina diluida en agua purificada (utilizada en el cultivo celular)

NaCl

Tripsina

Agua purificada

Hidróxido de sodio

- Composición de solución salina tamponada con fosfato (PBS) diluida en agua purificada (utilizada en el cultivo celular y en la cosecha)

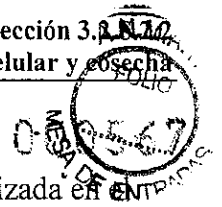
NaCl

KCl

Na₂HPO₄; 2H₂O

KH₂PO₄





- Composición de la solución de tampón de fosfato diluida en agua purificada (utilizada en el cultivo viral)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

KH_2PO_4

- Composición de las microesferas portadoras (utilizadas para el cultivo celular)

Microesferas

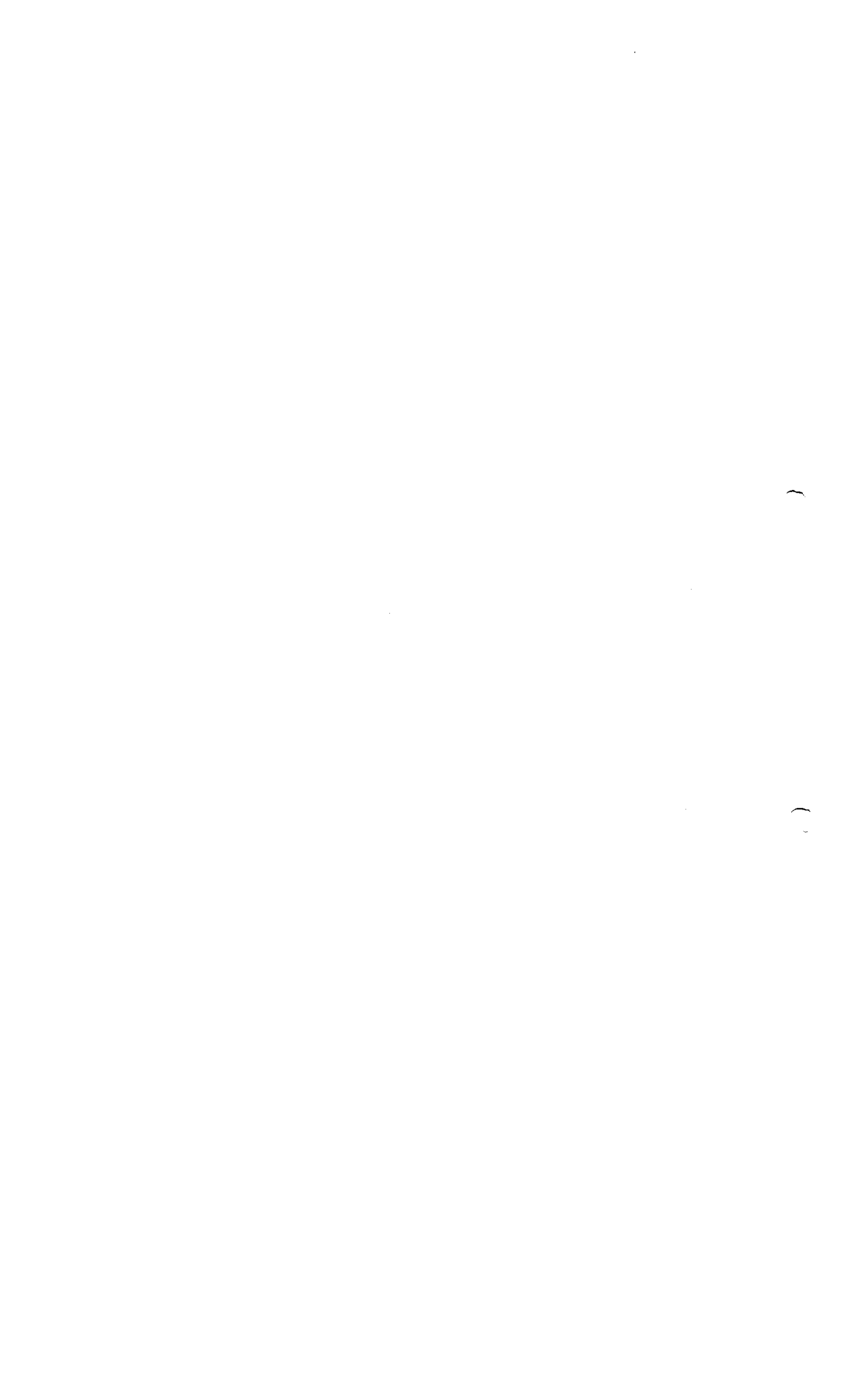
Hidratadas y esterilizadas en solución salina tamponada con fosfato.

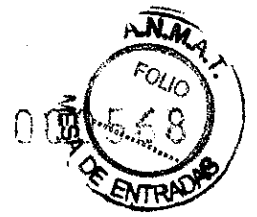
- Suspensión de tierra de diatomeas preparada en solución de PBS (utilizada para la producción de la cosecha única)

3.3 Otras soluciones

Las soluciones que se presentan a continuación se utilizan para preparar medios, otras soluciones o para ajustar el pH.


- Solución de clorhidrato
- Solución de hidróxido de sodio



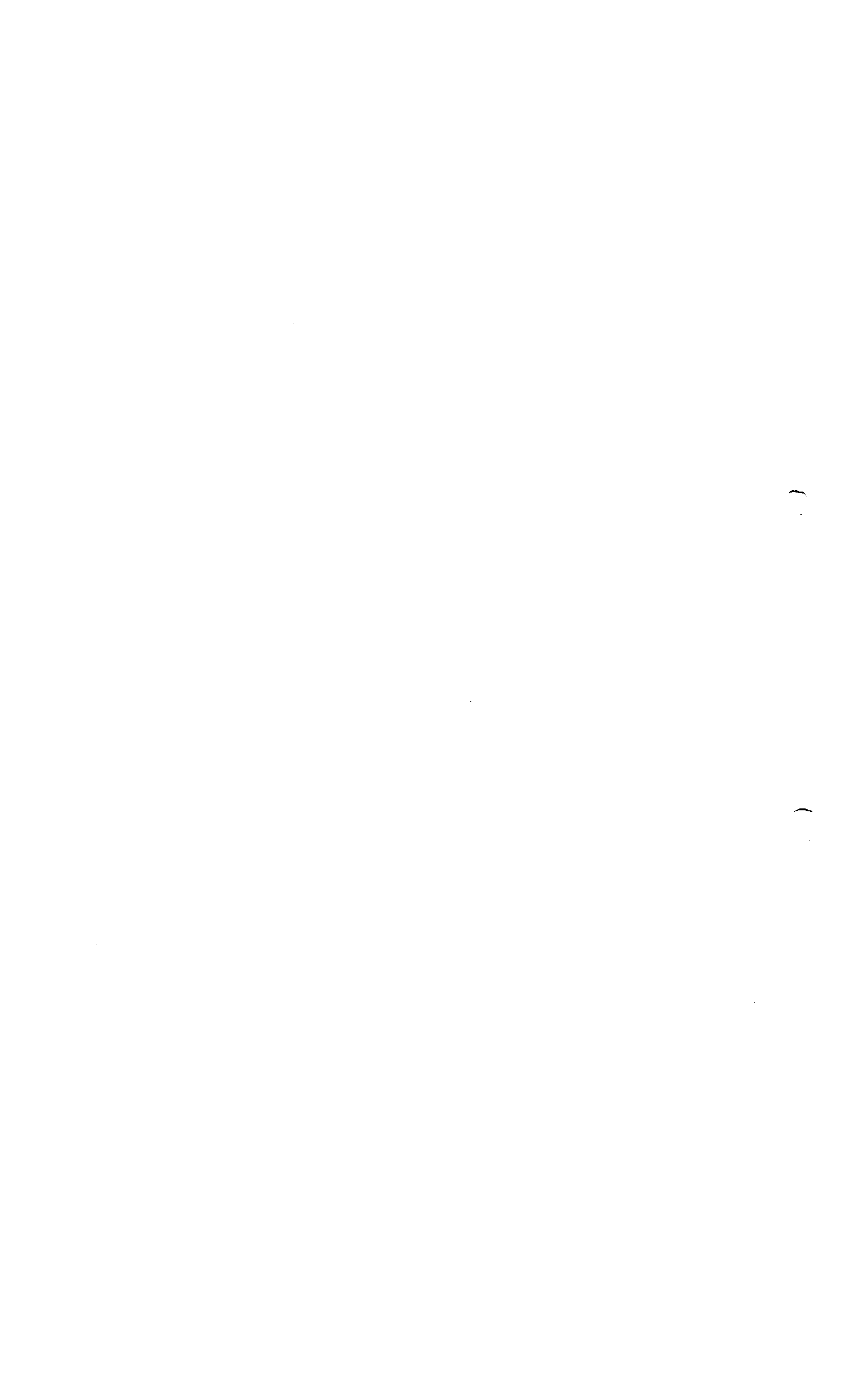


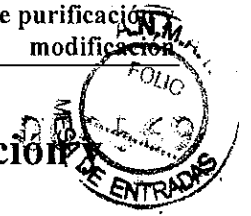
3.2.S.2.2

Reacciones de Purificación y Modificación - IPV


ROXANA MONTEMILONE DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DOMINGUEZ APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.



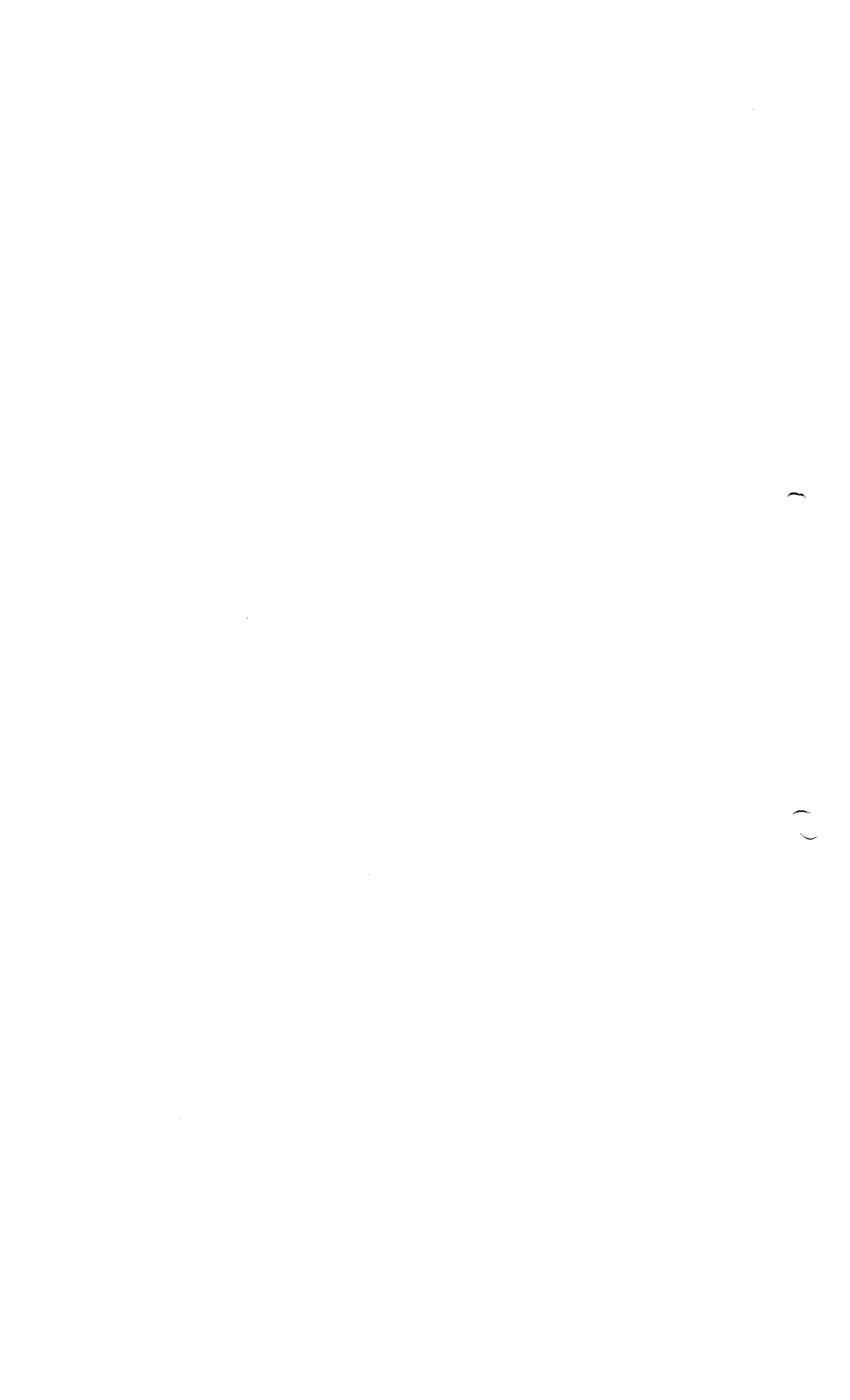


Sección 3.2.S.2.2 Descripción del proceso de elaboración y controles del proceso

Reacciones de purificación y modificación, llenado, almacenamiento y transporte

Índice

Lista de tablas	2
Lista de figuras	3
1 Preparación de los monovalentes	4
1.1 Concentración de la cosecha única	7
1.2 Purificación del concentrado 1.....	7
1.2.1 Cromatografía GM en cerámica HyperD con DEAE.....	7
1.2.2 Concentración por ultrafiltración.....	7
1.2.3 Cromatografía en CL6B Sepharose.....	7
1.2.4 Cromatografía cerámica HyperD con DEAE (PM).....	8
1.2.5 Estabilización y filtración.....	8
1.2.6 Controles durante el proceso aplicados para la purificación	9
1.3 Inactivación de la suspensión viral purificada y concentrada.....	10
1.3.1 Controles durante el proceso aplicados durante la inactivación de la suspensión viral.....	10
2 Preparación del trivalente concentrado	12
2.1 Controles durante el proceso aplicados para la producción del trivalente concentrado	14
3 Medios de cultivo, tampones y otros aditivos utilizados durante la preparación del trivalente concentrado	15
4 Llenado, almacenamiento y transporte.....	16





Lista de tablas

Tabla 1: Controles durante el proceso aplicados para la purificación.....9
Tabla 2: Controles durante el proceso aplicados durante la inactivación de la suspensión viral11
Tabla 3: Controles durante el proceso aplicados para la producción del trivalente concentrado....14


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.





Lista de figuras

Figura 1: Diagrama de preparación del monovalente (tipo 1, 2 ó 3).....5
Figura 2: Diagrama de preparación del monovalente (tipo 1, 2 ó 3), continuación.....6
Figura 3: Preparación del trivalente concentrado..... 12


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.



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

Lista y descripción de los materiales y del equipo utilizado durante este proceso de elaboración vea la sección 3.2.A.1 Instalaciones y equipo.

El proceso de elaboración que se describe a continuación se completa mediante los programas de validación presentados en la sección 3.2.S.2.5 Validación y/o evaluación del proceso con estudios sobre los parámetros de producción y sobre los controles durante el proceso.

1 Preparación de los monovalentes

Para la etapa de monovalente, la cosecha única se debe someter a:

- concentración,
- purificación,
- inactivación.

Para el mismo serotipo se pueden agrupar de una a tres suspensiones virales purificadas y concentradas con el fin de producir un lote del monovalente correspondiente.

Nota: los lotes de suspensión viral purificada y concentrada se agrupan para obtener un volumen mínimo necesario por condicionantes industriales en el paso de inactivación.

En la Figura 1 y en la figura 2 se presenta el diagrama de flujo del proceso para la preparación de monovalentes de tipo 1, 2 y 3 a partir de la cosecha única.

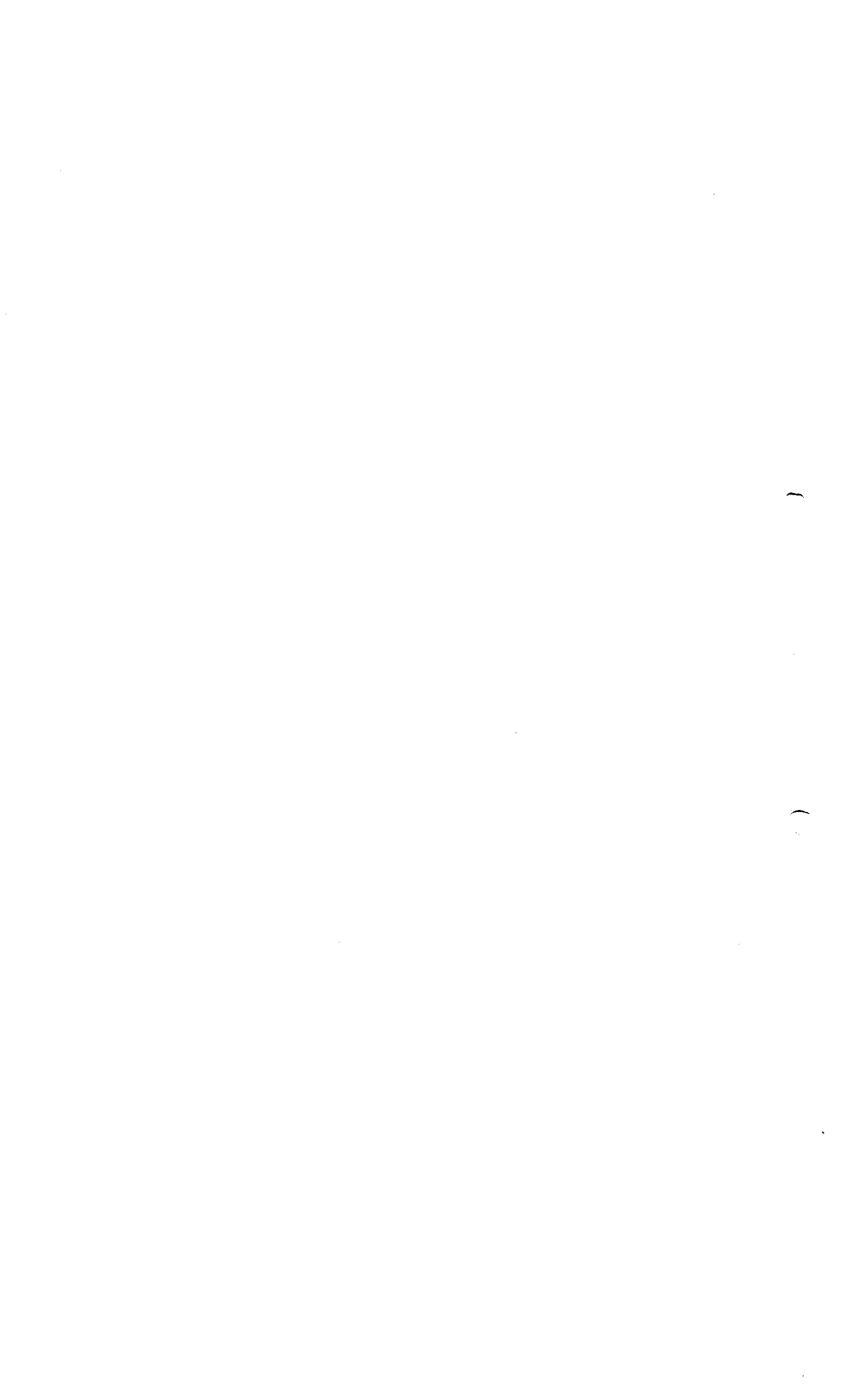
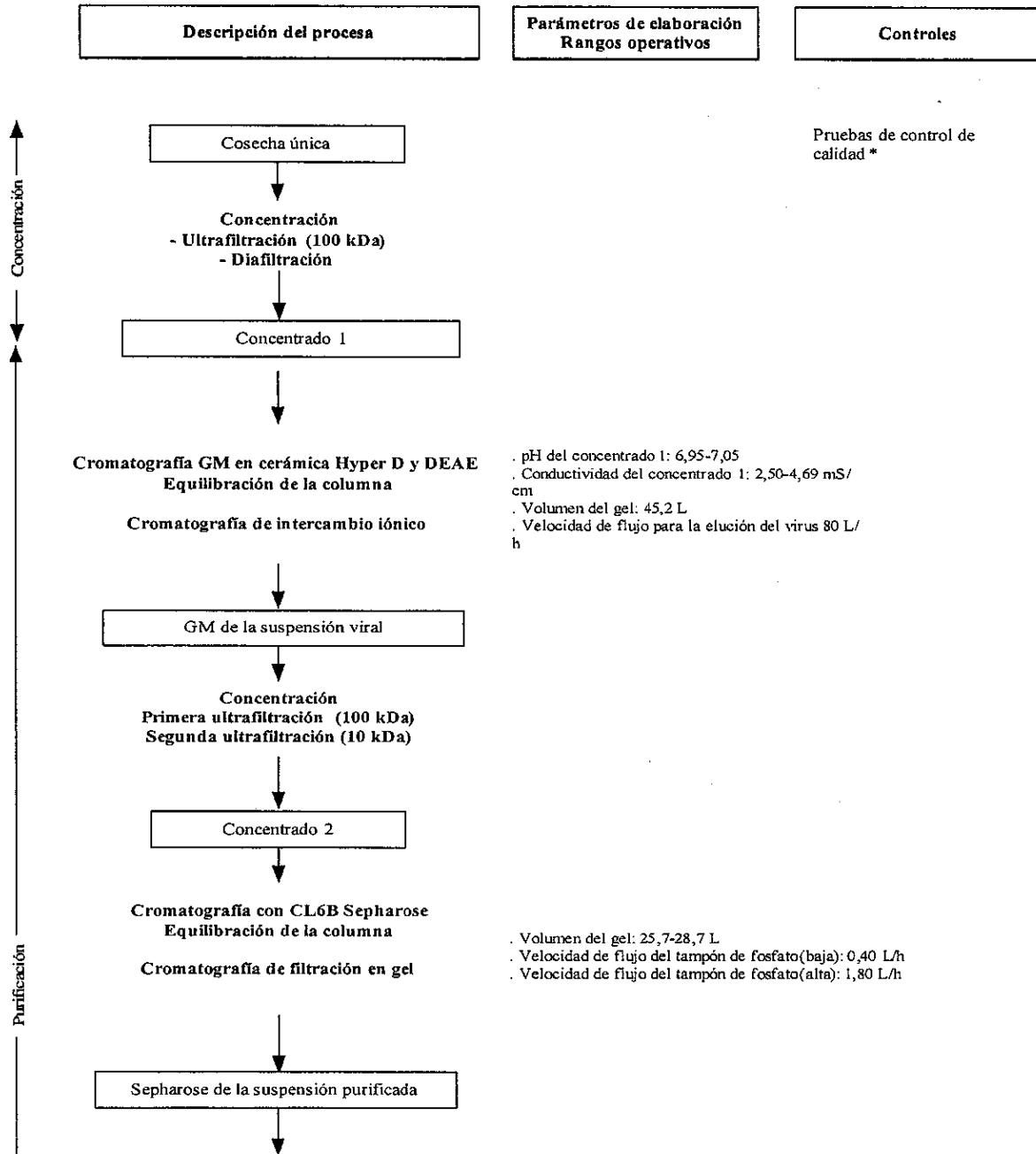
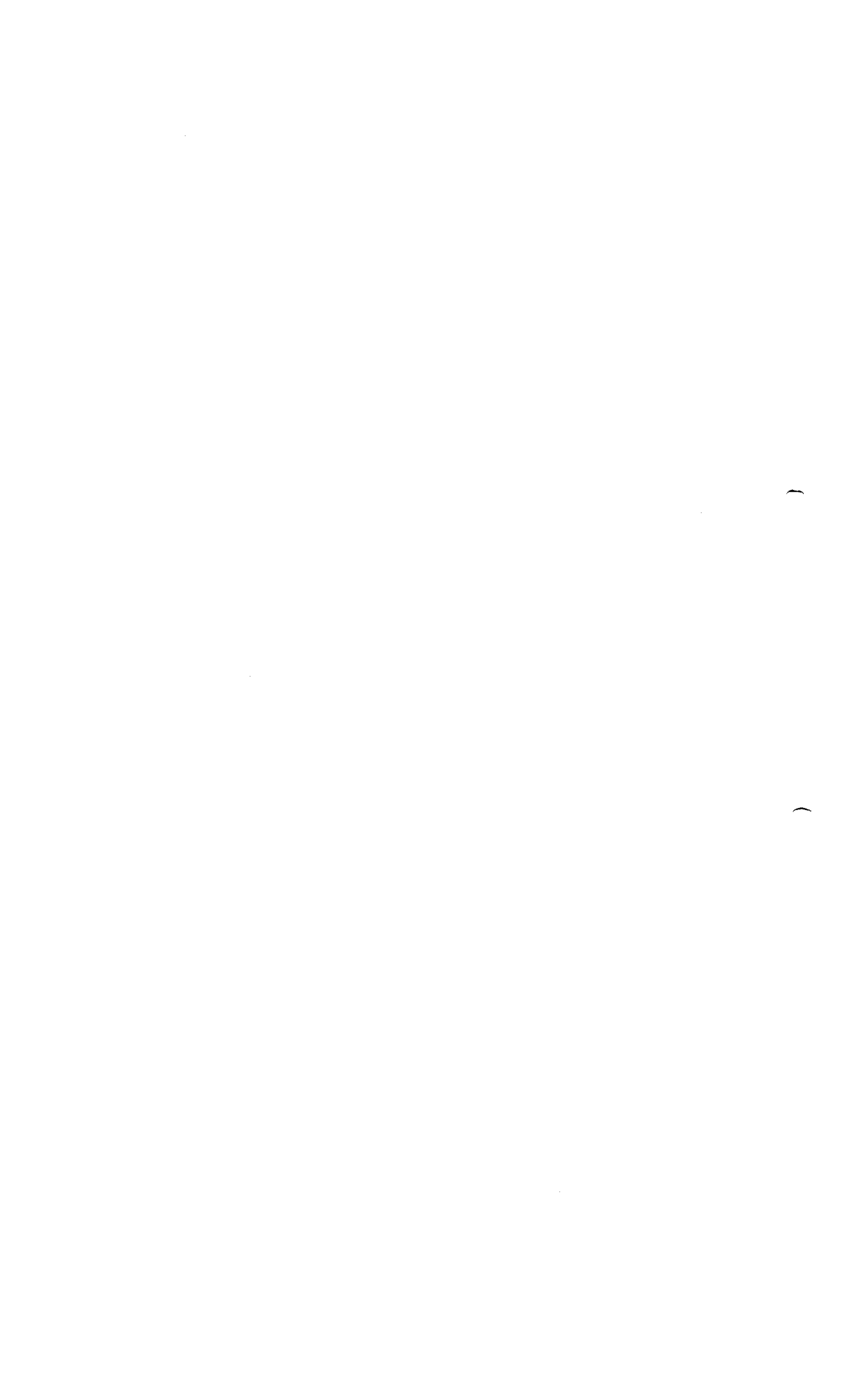




Figura 1: Diagrama de preparación del monovalente (tipo 1, 2 ó 3)



* Las pruebas de liberación de control de calidad se detallan en la sección 3.2.S.2.4 Controles de los pasos críticos e intermedios



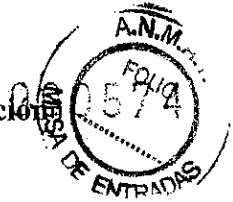
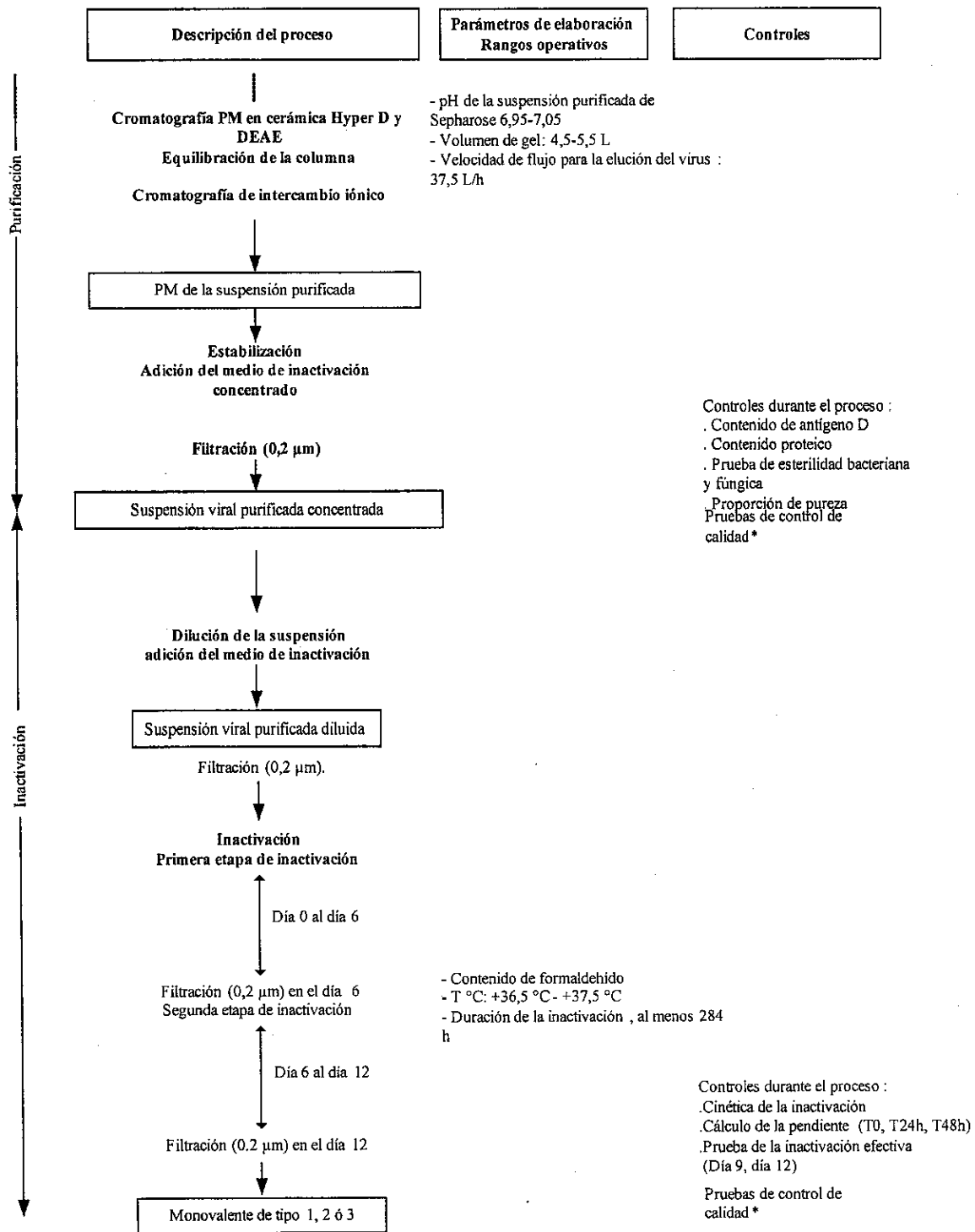


Figura 2: Diagrama de preparación del monovalente (tipo 1, 2 ó 3), continuación

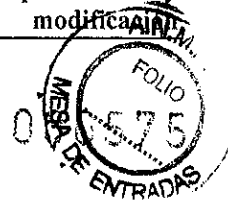


* Las pruebas de control de calidad se detallan en la sección 3.2.S.2.4 Controles de los pasos críticos e intermedios

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.





1.1 Concentración de la cosecha única

La cosecha única se concentra para facilitar la purificación por cromatografía.

- Ultrafiltración

La concentración se logra al pasar la suspensión viral a través de membranas de ultrafiltración (corte de 100 kDa). Se desecha el ultrafiltrado y se conserva el líquido que contiene partículas con un peso molecular superior a 100 kDa; es decir, la suspensión viral concentrada.

- Diafiltración

La suspensión viral concentrada se diafiltra frente a un tampón de fosfato para obtener el "concentrado 1".

1.2 Purificación del concentrado 1

El concentrado 1 se somete a purificación para eliminar residuos de proteínas bovinas, proteínas celulares y ácido desoxirribonucleico (ADN). Se utilizan tres columnas para lograr la purificación y se lleva a cabo la purificación intermedia entre la primera y la segunda columna. Para las tres columnas, el tampón de elución se define como tampón de fosfato de 25 mM a 35 mM.

Los pasos de purificación se realizan a temperatura ambiente. Para purificar un volumen determinado de concentrado 1, se llevan a cabo los siguientes pasos:

1.2.1 Cromatografía GM en cerámica HyperD con DEAE

A continuación se ofrecen datos de la columna utilizada:

- Columna cromatográfica de intercambio iónico, gran capacidad (GM = Grand Modèle).
- Columna que contiene un volumen de gel: 45,2 L. Rellena con soporte cerámico HyperD con DEAE.

Tras la equilibración, el volumen se introduce en la columna de intercambio iónico de gran capacidad utilizando el tampón de elución. La fracción que contiene las partículas virales se detecta y se llama suspensión purificada GM.

Después de su uso, la columna cromatográfica GM con soporte cerámico HyperD con DEAE se regenera.

1.2.2 Concentración por ultrafiltración

La suspensión purificada GM se somete a concentración mediante dos ultrafiltraciones sucesivas: la primera con un punto de corte de 100 kDa y la segunda con un punto de corte de 10 kDa.

1.2.3 Cromatografía en CL6B Sepharose

A continuación se ofrecen datos de la columna utilizada:

- Columna de filtración en gel para el tamizado molecular.



- Columna que contiene un volumen de gel: 25,7 - 28,7 L. Rellena con un gel de agarosa (por ejemplo, Sepharose CL 6B).

El material eluido concentrado; es decir, el concentrado 2, se introduce en la columna en gel con un caudal de entre 0,40 L/hora (caudal bajo) y 1,80 L/hora (caudal alto). Las fracciones que contienen las partículas virales se recogen para obtener la suspensión purificada Sepharose.

Después de su uso, la columna cromatográfica Sepharose CL6B se regenera.

1.2.4 Cromatografía cerámica HyperD con DEAE (PM)

A continuación se ofrecen datos de la columna utilizada:

- Columna cromatográfica de intercambio iónico, pequeña capacidad (PM = Petit Modèle).
- Columna de vidrio que contiene un volumen de gel: 4,5 - 5,5 L. Rellena con soporte cerámico HyperD con DEAE.

La suspensión purificada Sepharose se pasa a través de la columna de intercambio iónico de pequeña capacidad utilizando el mismo tampón de elución. La fracción que contiene las partículas virales se recoge para obtener la suspensión purificada PM.

Después de su uso, la columna cromatográfica PM con soporte cerámico HyperD con DEAE se regenera.

1.2.5 Estabilización y filtración

La suspensión purificada PM se mezcla con un medio de inactivación concentrado (medio M199 Hanks). Esta suspensión se filtra (a través de una membrana de 0,2 µm) y se almacena a entre +2 °C y +8 °C durante un máximo de 3 meses en espera de la etapa de inactivación. La suspensión obtenida representa la suspensión viral purificada y concentrada.

Se recogen muestras para los controles durante el proceso y para las prueba de control de calidad para liberación.

Se calcula la proporción de proteína frente al antígeno D para obtener una indicación de la pureza de la suspensión viral purificada y concentrada. Para cada tipo de virus, los siguientes límites son aceptables:

- Tipo 1: <0,027 µg de proteínas/unidad de antígeno D (µg/UD).
- Tipo 2: <0,0875 µg de proteínas/unidad de antígeno D (µg/UD).
- Tipo 3: <0,030 µg de proteínas/unidad de antígeno D (µg/UD).

