U0129866772
CLIENTE 748
DOCADEA 221774

3º CUERPO

22767-11-1

FOLIO
000601
MESA DE ENTRADAS

Tabla 5: Especificaciones de las suspensiones virales purificadas concentradas (tipo 1, 2 y 3)

Pruebas	Requisitos	Métodos	Criterios de aceptación
Contenido proteico	Ph. Eur. 0214, edición actual. TRS 910	Según la Ph. Eur. 2.5.16, edición actual Colorimetría (método de Lowry).	Para calcular el índice de pureza.
Contenido de antígeno D (mediante el método sigmoideo)	Ph. Eur. 0214, edición actual TRS 910	Según la Ph. Eur. 2.7.1, edición actual Método ELISA.	Para calcular el índice de pureza.
Pureza (actividad específica)	Ph. Eur. 0214, edición actual TRS 910	Proporción entre el contenido proteico y el contenido de antígeno D.	Tipo 1 < 0,027 µg de proteína/UD* Tipo 2 < 0,0875 µg de proteína/UD. Tipo 3 < 0,030 µg de proteína/UD.
Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica.	/	Ph. Eur. 2.6.1, edición actual Filtración por membrana. Utilización de 2 medios diferentes.	No se observa crecimiento microbiano.

* UD: unidades de antigeno D.

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.

Tabla 6: Especificaciones para los monovalentes (tipos 1, 2 y 3)

Pruebas	Requisitos	Métodos	Criterios de aceptación
Contenido proteico	/	Según la Ph. Eur. 2.5.16, edición actual Colorimetría (método de Lowry).	Para calcular el índice de pureza.
Contenido de antígeno D (mediante el método sigmoideo)	Ph. Eur. 0214, edición actual	Según la Ph. Eur. 2.7.1, edición actual Método ELISA.	Para calcular el índice de pureza.
Pureza	/	Proporción entre el contenido proteico y el contenido de antígeno D	≤ 50 ng de proteína/UD**
Contenido de formaldehído residual	Ph. Eur. 0214, edición actual	Colorimetría (método de Nash).	80 ± 30 µg/mL
Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica	Ph. Eur. 0214, edición actual TRS 910	Según la Ph. Eur. 2.6.1, edición actual Filtración por membrana. Utilización de 2 medios diferentes.	No se observa crecimiento microbiano.
Cinética de inactivación: **T 0** **T 24 h** **T 48 h** **T 72 h** **T 96 h** **Cálculo de la pendiente (T0, T24h, T48h)**	Ph. Eur. 0214,edición actual. TRS 910	Inoculación de células sensibles (Hep-2) después de 0, 24, 48, 72 y 96 horas de inactivación. Medición del título infeccioso.	El título infeccioso disminuye de forma lineal. Tipo 1: entre –0,1187 y –0,1758. Tipo 2: entre –0,0955 y –0,1890. Tipo 3: entre –0,1090 y –0,1933.
Prueba de inactivación efectiva: **Día 9** **Día 12**	Ph. Eur. 0214,edición actual. TRS 910	Según la Ph. Eur. 0214, edición actual Inoculación en células sensibles (células primarias de riñón de mono).	- Sin efecto citopático. - Sin efecto citopático.

* UD: unidades de antígeno D.

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.

FOLIO
MESA DE ENTRADA

3.2 Procedimientos analíticos

Para los procedimientos analíticos descritos en la Ph. Eur., se proporciona la referencia y se mencionan detalles específicos, si corresponde. Para los procedimientos analíticos no descritos en la Ph. Eur., se presentan a continuación métodos resumidos.

En la tabla 7 se presenta un panorama de las pruebas realizadas en los productos intermedios.

Tabla 7: Panorama de las pruebas realizadas en los productos intermedios

Métodos analíticos	Células de control	Sobrenadante de las células de control	Cosecha única de virus (tipo 1, 2 o 3)	Suspensión viral purificada concentrada (tipo 1, 2 o 3)	Monovalente de tipo 1, 2 o 3
Observación	X	NR*	NR	NR	NR
Prueba de virus hemadsorbentes	X	NR	NR	NR	NR
Identificación de células de simio	X	NR	NR	NR	NR
Prueba de detección de agentes extraños mediante células	NR	X	NR	NR	NR
Prueba de detección de *Mycoplasma* por el método de cultivo	NR	X	X	NR	NR
Prueba de detección de*Mycoplasma* por epifluorescencia en cultivo celular	NR	X	NR	NR	NR
Identificación de poliovirus (tipo 1, 2 o 3)	NR	NR	X	NR	NR
Identificación de poliovirus (tipo 1, 2 o 3)	NR	NR	X	NR	NR
Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica	NR	NR	X	X	X
Contenido proteico	NR	NR	NR	X	X
Contenido de antígeno D mediante el método sigmoideo	NR	NR	NR	X	X
Pureza	NR	NR	NR	X	X
Contenido de formaldehído residual	NR	NR	NR	NR	X
Cinética de inactivación **Cálculo de la pendiente (T0, T24h, T48h)**	NR	NR	NR	NR	X
Prueba de inactivación efectiva	NR	NR	NR	NR	X

* NR: no realizada.

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.

FOLIO 000604 MESA DE ENTRADAS

3.2.1 Pruebas realizadas sobre las células de control

Se presentan a continuación los métodos analíticos para las pruebas realizadas sobre las células de control.

3.2.1.1 Observación

Esta prueba se realiza en paralelo con la prueba de virus hemadsorbentes.

3.2.1.2 Prueba de virus hemadsorbentes

- Referencia

Esta prueba está basada en Ph. Eur. 2.6.16 "**Pruebas de agentes extraños en vacunas virales para uso en seres humanos**".

- Principio
- La prueba consiste en verificar la ausencia de contaminantes virales en los cultivos celulares control de los lotes de producción y la identidad de las células usadas.
- El estudio para determinar la presencia de contaminantes virales extraños inductores de un efecto citopático (CPE) o de hemadsorción se realiza por microscopía óptica.
- Equipo

Equipo estándar utilizado en un laboratorio de cultivo celular y virología.

- Reactivo
  - Solución salina tamponada con fosfato (PBS) [1 x C] sin calcio ni magnesio, almacenada a temperatura ambiente.
  - Suspensión de eritrocitos de cobayo en PBS [1 x C] al 0,4 % almacenada a +5 °C ± 3 °C.
- Procedimiento operativo

La prueba consiste en:

Siembra de células Vero, a la concentración utilizada para el cultivo celular de producción, en matraces con medio de crecimiento, en un mínimo de 500 mL de suspensión celular en el paso de producción D (141° pasaje).

Mantenimiento del cultivo celular a +36 °C ± 1 °C.

Cambio de medio al menos en el momento de la "inoculación viral" y de la "cosecha viral" con el medio utilizado en el proceso de producción.

Cosecha, distribución del líquido sobrenadante al final del período de observación, almacenamiento a -70 °C. El final del período de observación tiene lugar al menos 14 días después de la etapa de "inoculación viral".

Enjuague de la monocapa celular con tampón PBS [1 x C].

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

Adición de una suspensión de eritrocitos de cobayo al 0,4 % al 25 % de la superficie de la capa celular, la mitad de la cual se incuba a +5 °C ± 3 °C y la otra mitad entre +20 °C y +25 °C.

Enjuague del cultivo celular dos veces después del tiempo de incubación, antes de la lectura.

- Lectura; cálculo; resultados

Las células se examinan bajo microscopía invertida (objetivos x 4 – x 10) al menos los días de inoculación y cosechas virales y al final del período de observación.

Los resultados se expresan como ausencia (0) o presencia (+) de efecto citopático (CPE) o hemadsorción.

- Criterios de validez

La prueba es válida si al menos el 80 % de las células de control analizadas se pueden observar y si el 20 % restante se rechaza por motivos no específicos (p. ej., contaminación bacteriana, matraz roto, matraz abierto…).

3.2.1.3 Identificación de células de simio

- Referencia

Esta prueba está basada en Ph. Eur. 2.7.1 "**Métodos inmunoquímicos**".

- Principio

El enfoque isoeléctrico (IEF) es una electroforesis horizontal en un gradiente de pH que permite separar proteínas en función de su punto isoeléctrico. El gradiente de pH se obtiene aplicando una corriente eléctrica a un gel de agarosa que contiene tampones anfóteros (anfólitos).

Las isoenzimas o isozimas –diversas formas enzimáticas resultantes de modificaciones de la estructura primaria– son proteínas que catalizan la misma reacción enzimática, pero tienen diferentes propiedades fisicoquímicas. Lo que se estudia es la diferente movilidad electroforética. Esta diferencia se traslada al número y posición de las bandas, que se comparan con las de las células de control después de su tinción con un sustrato específico de la enzima.

Se seleccionaron tres sistemas enzimáticos que permiten diferenciar las células utilizadas:

- Lactato deshidrogenasa (LDH): permite clasificar las células humanas y de simio en la misma categoría, pero las distingue de otras células animales.
- Glucosa fosfato isomerasa (GPI): permite distinguir células humanas de células de simio.
- Fosfogluconato deshidrogenasa (PGD): permite distinguir células MRC-5 de células WI-38 y de otras células.

- Equipo

Equipo estándar de laboratorio

- Reactivos
  - Agarosa para enfoque isoeléctrico (almacenar a temperatura ambiente).
  - Pharmalyte pH 3-10 (almacenar a +5 °C ± 3 °C).
  - Sorbitol (almacenar a temperatura ambiente).

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.

A.N.M.A.T. FOLIO 000606 MESA DE ENTRADAS

- Indubiose A37 (almacenar a temperatura ambiente).
- Tris (almacenar a temperatura ambiente).
- Cloruro de magnesio ($MgCl_2$ $6H_2O$) (almacenar a temperatura ambiente).
- Glicerol (almacenar a temperatura ambiente).
- Hidróxido de sodio en gránulos (almacenar a temperatura ambiente).
- Ácido acético (almacenar a temperatura ambiente).
- Agua purificada ultrafiltrada.
- Solución salina fisiológica (9 ‰, almacenar a temperatura ambiente).
- Lactato cálcico $5H_2O$ (almacenar a temperatura ambiente).
- β-nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) (almacenar a ≤-20 °C).
- Azul de metiltiazol tetrazolio (MTT) (almacenar a +5 °C ± 3 °C).
- Metosulfato de fenacina (PMS) (almacenar a ≤-20 °C).
- Gluconato-6-fosfato (G6P), (almacenar a +5 °C ± 3 °C).
- Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP) (almacenar a +5 °C ± 3 °C).
- Fructosa 6-fosfato (Na) (almacenar a ≤-20 °C).
- Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (almacenar a +5°C ± 3°C).
- Células estándar (MRC-5, WI-38, Hep-2, BHK-21, CHO, Vero, PERC6) (almacenar a ≤-70 °C).
- Sangre ovina (control visual del enfoque) (almacenar a ≤-70 °C).

- Procedimiento operativo

Preparación de las muestras

- Descongele las muestras a temperatura ambiente y viértalas en tubos de plástico identificados colocados en hielo picado.
- Sonique las muestras durante 30 segundos. Si el volumen de suspensión celular es inferior a 2 mL, reduzca el tiempo de sonicación.
- Centrifugue durante 10 minutos a 900 g en una centrifugadora enfriada entre +2 °C y +8 °C.
- Coseche el sobrenadante, dispense en alícuotas de 50 µL y almacene a ≤-70 °C.

Preparación del gel de electroenfoque :

Agarosa IEF

Agarosa IEF.

Sorbitol.

Agua ultrafiltrada.

- Derrita el gel en un baño de agua hirviendo.

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.

000607
MEDIOS DE ENTRADAS

- Intercale una película GelBond (o equivalente) entre 2 placas de vidrio, sujetar las placas con pinzas.
- Caliente durante 1 hora aproximadamente en una incubadora a +50 °C.
- Utilizando una jeringa precalentada en una incubadora a +50 °C, inyecte agarosa IEF complementada con 1,4 mL de Pharmalyte pH 3-10 en el GelBond entre las dos placas de vidrio.
- Deje solidificar el gel a temperatura ambiente durante 1/2 hora y después durante al menos 1 hora entre +2 °C y +8 °C en cámara húmeda.

Preparación de electrólitos

Ánodo

Ácido acético.

Agua ultrafiltrada.

Cátodo

Hidróxido de sodio en gránulos.

Agua ultrafiltrada

Enfoque

- Enchufe el electrodo dentro de la unidad de electroforesis.
- Quite el GelBond del molde.
- Seque rápidamente (sin arrugar) con una hoja de papel Whatman 1M (o equivalente).
- Ponga en marcha el sistema de refrigeración de la unidad de electroforesis.
- Vierta a gotas 2 o 3 mL de mezcla de agua purificada/glicerol (v/v) en el centro de la placa de enfriamiento.
- Ponga tiras de electrodos en una hoja de papel Whatman 3M (o equivalente).
- Dependiendo de su uso como ánodo o como cátodo, sumerjar cada tira en unos 2 mL de electrolito (ánodo: ácido acético, cátodo: hidróxido de sodio).
- Ponga las tiras empapadas a cada lado de la película (ánodo en el lado positivo y cátodo en el lado negativo).
- Recorte las tiras al tamaño del gel.
- Descongele las células estándar y de prueba. Prepare el control de enfoque visual (sangre hemolizada).
- Vierta a gotas la muestra directamente sobre el gel:
  - a unos 3 cm del ánodo para GPI y LDH,
  - a unos 3 cm del cátodo para PGD.

Del mismo modo, cargue las células de referencia. La muestra de sangre se carga en el ánodo y en

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

el cátodo. Utilice las células estándar como referencia para analizar con la muestra.

- Coloque los electrodos.
- Ponga la tapa en la unidad.
- Seleccione la potencia para suministrar 500 voltios en el arranque.
- Deje emigrar durante 1 hora aproximadamente (en función del enfoque de la hemoglobina de la muestra de sangre).

Preparación de colorantes específicos de enzimas (película de 114 x 225 mm)

- Tampón Tris HCl 0,5 M diluido en agua purificada ultrafiltrada, pH 8.

Tris.

Agua purificada ultrafiltrada.

Ajuste el pH a 8 con HCl 1N.

Almacene a temperatura ambiente.

- Tampón $MgCl_2$, $6H_2O$ 0,5 M diluido en agua purificada ultrafiltrada.

$MgCl_2$, $6H_2O$.

Almacene a a temperatura ambiente.

- Agarosa al 2 % para tinción diluida en agua purificada ultrafiltrada.

Indubiose A37

Disuelva en un baño de agua hirviendo. Almacene a +50 °C antes de la tinción.

- Solución para LDH diluida en agua purificada ultrafiltrada.

Lactato cálcico, $2H_2O$.

NAD

MTT

PMS

Tampón Tris HCl 0,5 M, pH 8.

Disolver por agitación.

- Solución para GPI diluida en agua purificada ultrafiltrada.

Fructosa 6-fosfato (Na).

Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa[a] (140 U/mL).

NADP

[a] Añadir la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa inmediatamente antes de teñir el gel.

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.

FOLIO 000609 MESA DE ENTRADAS

MTT

PMS

Tampón Tris HCl 0,5 M, pH 8.

Disolver por agitación.

- Solución para PGD diluida en agua purificada ultrafiltrada.

6-fosfogluconato Na_3

NADP (Na_2)

MTT

PMS

Tampón Tris HCl 0,5 M, pH 8.

$MgCl_2$, $6H_2O$.

Disuelva por agitación.

Tinción

- Una vez terminado el enfoque (las muestras de sangre cargadas cerca del ánodo y del cátodo han emigrado hacia sus IpH), enjuague la parte posterior del gel con alcohol. Seque.
- Mezcle cada solución colorante específica de enzimas con 20 mL de agarosa al 2 %.
- Vierta la mezcla sobre el gel enfocado.
- Deje solidificar el gel a temperatura ambiente, protegido de la luz.
- Vigile la aparición de bandas azules (la tinción se puede acelerar en una incubadora a +37 °C.
- Tan pronto como las bandas sean claramente visibles, fotografíe el gel.

- Lectura; cálculo; resultados

Se obtienen bandas azules a unas distancias de emigración precisas correspondientes a su punto isoeléctrico. Una célula se identifica con la célula de referencia si tiene el mismo perfil para las tres enzimas estudiadas.

- Criterios de validez

La prueba se considera válida si:

- El número de bandas y la posición de la célula analizada y de la célula estándar son comparables.
- Las células de referencia son diferenciables para los 3 perfiles.

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.

A.N.M.
FOLIO
000610
MESA DE PARTES

3.2.2 Pruebas realizadas en el sobrenadante de las células de control

Se presentan a continuación los métodos analíticos para las pruebas realizadas en el sobrenadante de las células de control.

3.2.2.1 Prueba de detección de agentes extraños con células

- Referencia

Esta prueba está basada en Ph. Eur. 2.6.16 "**Pruebas de agentes extraños en vacunas virales para uso en seres humanos**".

- Principio
  - La prueba se lleva a cabo para verificar la ausencia de agentes contaminantes virales en el líquido sobrenadante de las células de control por inoculación de células diploides humanas MRC-5, células Vero y cultivos de células renales primarias de mono.
  - Hay agentes contaminantes virales presentes si se detecta un efecto citopático (CPE) característico por microscopía óptica.
- Equipo

Equipo estándar de laboratorio.

- Reactivos

Monocapas confluentes de:

- Células primarias de riñón de mono (*Cercopithecus*).
- Células diploides humanas MRC-5.
- Células Vero;

Medio de mantenimiento:

- Medio esencial mínimo (MEM) con 0,224 % de bicarbonato sódico y 2 % de suero fetal de ternero, almacenado a +5 °C ± 3 °C.
- Medio 199 con 0,224 % de bicarbonato sódico y 1 % al 2 % de suero fetal de ternero, almacenado a +5 °C ± 3 °C.

- Procedimiento operativo

Todas las operaciones se deben llevar a cabo en condiciones estériles.

- Inocule la mezcla de líquidos en un cultivo confluente de células MRC-5, Vero y células primarias de riñón de mono de tal modo que la dilución de la mezcla de líquidos en un medio nutriente no supere la proporción de 1 a 4. La superficie de la monocapa celular es de un mínimo de 3 cm^2 por mL de mezcla de líquidos. Los cultivos de control se analizan en paralelo.
- Incube el cultivo celular a +36 °C ± 1 °C y manténgalo durante un mínimo de 21 días para

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.