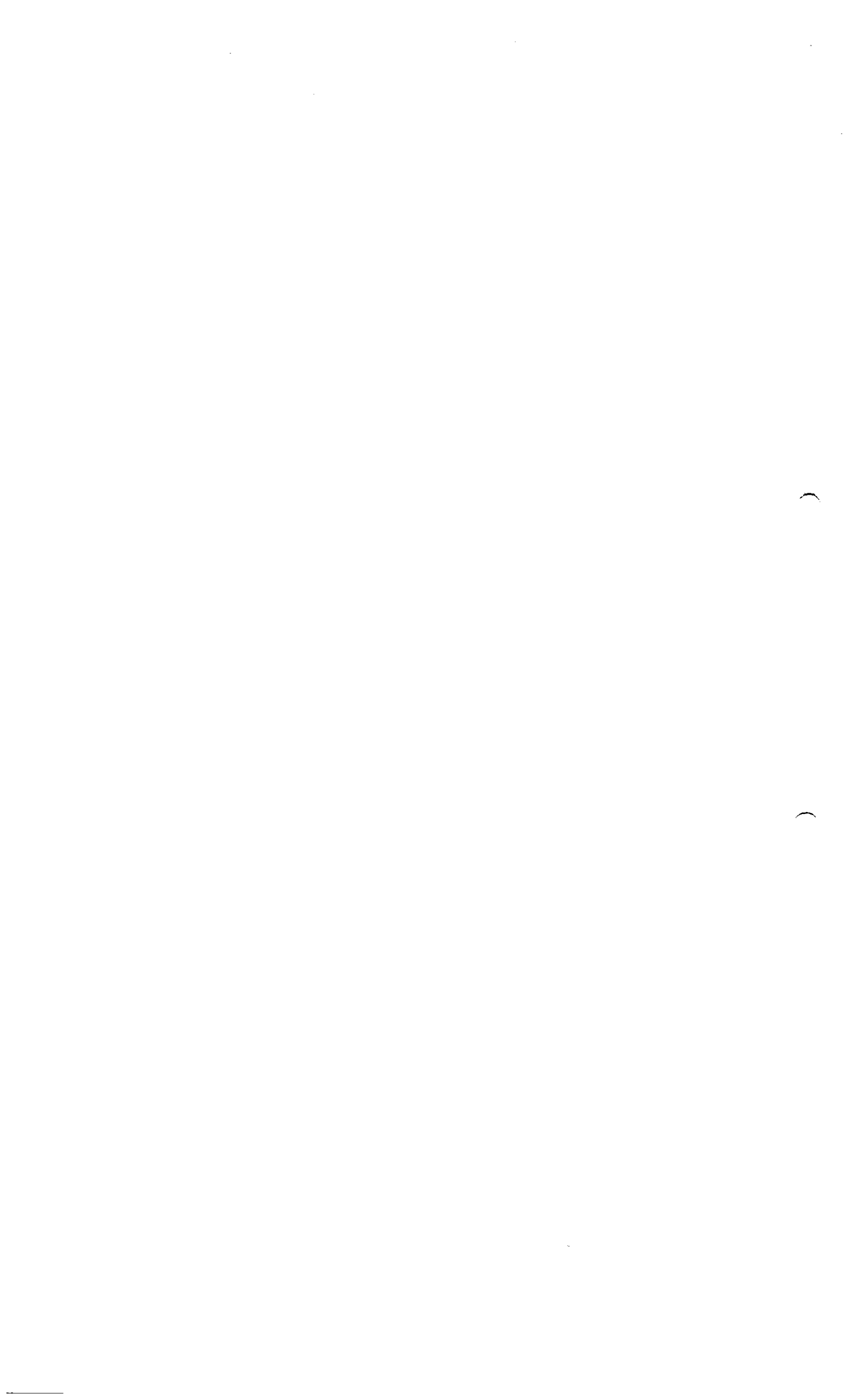


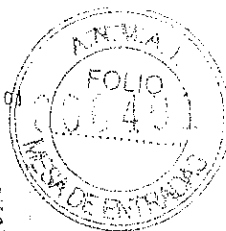
3^o CUERPO

6823-13-1



U0129886472
CLIENTE 748
DOCADEA 241474





3507

BLO-VG/JAH

Dr R. Doyle, Curator
ICCAC
Public Health Laboratory Service
Centre for Applied Microbiology
and Research
Vaccine Research and Production
Laboratory
Fardon Down
Salisbury
Wiltshire SP4 0JG
Grande Bretagne

7 August 1990

Dear Dr Doyle,

I would be most grateful if you could send samples of the Yero Cell Bank together with information required to Dr C. van Steenis at the following address:

Rijksinstituut voor de Volksgezondheid en Milieuhygiëne,
Antonius van Leeuwenhoeklaan 9,
Postbus 1,
Bilthoven,
Netherlands.

Thanking you in anticipation.

Yours sincerely

Dr V. Gracov
Scientist
Biologicals

cc: Dr G. van Steenis - RIVM

CAIF SA
Dra. Bernarda Belay
Co-Directora Técnica
M.N. 15.148

CAIF
Compañía Argentina de
Investigaciones Farmacéuticas S.A.
Dra. María Bernarda Belay
Apoderada
DNI 29378925





ATCC

Manassas, VA 20110-2209
703-365-2700

Collection of Cell Lines

ATCC No.: WHO-VERO

Name: WHO VERO (Kidney, African Green Monkey, Cercopithecus aethiops)

Culture Medium: Minimum essential medium (Eagle) with non-essential amino acids and Earle's BSS, 95%; fetal bovine serum, 5%

Fluid Renewal: Every 2 - 3 days Subculture Procedure: Remove medium, add fresh trypsin (0.25%) solution for 1 - 2 minutes and remove. Place culture at room temperature until cells detach (5 - 10 minutes). Add fresh medium, aspirate and dispense into new flasks. Subcultivation ratio: 1:2 to 1:6.

Part A. FROZEN CELLS

Freeze: n/a Vol./Ampule: 1.0 ml Passage No.: 134 Date Frozen: 10/87 Cells/ml.: 1.2×10^7

Expected Viability(%): 70 - 80 Population Doublings: n/a

Recommended Handling Upon Receipt: Initiate culture as soon as possible upon receipt. Thaw by rapid agitation in 37°C water bath. See instructions on back.

Recommended Inoculum Upon Thawing: 1:50 dilution of ampule contents with culture medium.

Dispense into a 150 cm² culture flask. Renew the culture medium after 48 hours.

Part B. FLASK CULTURES

No. Cells Seeded Per Culture: 3.8×10^6 Passage No.: 135

Recommended Handling Upon Receipt:

Monolayer Cultures: The bottle is completely filled with medium to prevent loss of cells in transit. Remove all of the medium (which can be saved and used as fresh medium) except for a sufficient volume to cover the floor of the flask. Incubate at 37°C. Sometimes in transit the cultures are handled roughly and most of the cells become detached and float in the culture medium. If this has occurred remove the entire contents of the flask and centrifuge at 300 x g for 15 minutes. Draw off the excess supernatant medium, resuspend the cells in 10 ml of the culture medium and plant the entire cell suspension in a single flask of suitable size (ca 25 sq. cm.).

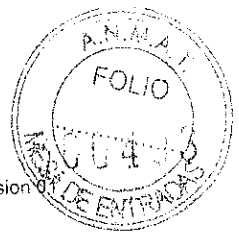
Suspension Cultures: The culture flasks have been completely filled with medium for shipment. Remove the entire contents of the flask and centrifuge at 300 x g for 15 minutes. Resuspend the cells pellet as suggested under subculture procedure described above.

Part C. REMARKS

CAIF SA
Dra. Bernarda Belay
Co-Directora Técnica
M.N. 15.148

CAIF
Compañía Argentina de
Investigaciones Farmacéuticas S.A.
Dra. María Bernarda Belay
Apoderada
DNI 29378925





VERO CELLS
W.H.O. SEED LOT
Instructions for use

I - PRODUCT DESCRIPTION

The Vero cell seed bank of the W.H.O. comes in the form of sealed, collar-break ampoules, of a 2 ml capacity, containing 1 ml of a frozen suspension of cells of the Vero line, to a total number of ca. 12 million cells per ampoule.

Cell freezing medium is supplemented with newborn calf serum (30 % v/v) and dimethylsulfoxide (10 % v/v).

Ampoule labels read the following:

VERO CELLS
W.H.O. SEED
134th
PASSAGE
OCT 1987
N°: X X X X

ATX X 3 9

The number given is sequential, so that each ampoule bears a unique number; this allows traceability and management of the central stock.

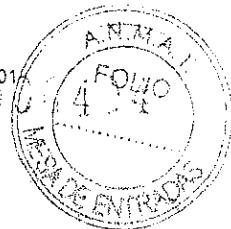
Suspension colour is light yellow when frozen, turning reddish on thawing.

II - CARE IN HANDLING

- It is known that frozen ampoules, if badly sealed or damaged, may explode on warming up. While handling these ampoules in the frozen state, use protective garment such as thick gloves, a protective coat, safety glasses or a helmet sheltering the eyes.

CAIF SA
Dra. Bernarda Belay
Co-Directora Técnica
M.N. 15.148

CAIF
Compañía Argentina de
Investigaciones Farmacéuticas S.A.
Dra. María Belay
Apoderada
DNI 29378925



- Exposing frozen ampoules to room temperature soon results in a slow thawing of the cell suspension, which is detrimental to cell viability. When transferring frozen ampoules, minimize time at positive temperature.
- If not used on receipt, the ampoule must be immersed at once into liquid air or liquid nitrogen and stored under such conditions until used.
- The ampoule content is not regarded as pathogenic; no special biosafety procedure must be enforced during handling, other than good asepsis to prevent microbial ingress.

III - RECEIPT OF SHIPMENT

On receiving the seed ampoule, carefully examine the packaging, for possible alterations during transportation such as shocks or breaks of the cold chain: among indicators of a defective cold storage are the following:

- absence of remaining cooling agent in the packaging,
- oblique level of the frozen suspension (the ampoules were frozen while standing upright)
- failure to turn reddish on thawing (due to the high cell concentration, thawed ampoules, stored at room temperature, turn yellow within hours).

IV - PREPARATION OF CULTURE MATERIAL

Choose a sterile culture flask with 100 to 200 cm² of surface available for cell attachment.

Pour aseptically into the flask, 100 ml of prewarmed Eagle's Minimum Essential Medium (Earle's salts) supplemented with 5 % fetal calf serum.

CAIF SA
 Dra. Bernarda Belay
 Co-Directora Técnica
 M.N. 15.148

CAIF
 Compañía Argentina de
 Investigaciones Farmacológicas S.A.
 Dra. María Bernarda Belay
 Apoderada
 DNI 29378925





instituto
Mérieux S.A.

V - AMPOULE THAWING

Thaw the sealed ampoule in a 37°C water bath. Stop immersion as soon as the ampoule content is thawed. Inoculate without delay.

VI - CELL INOCULATION

Operate aseptically in an L.A.F. hood, wipe the ampoule dry. Remove the label. Dip the ampoule into an antiseptic solution (e.g. 70 % ethanol in water) and dry it off with a sterile gauze. Break the collar and retrieve the suspension with a 2 ml syringe and needle. Inject the content into the culture flask. Close tightly. Mix.

VII - INCUBATION

Incubate the closed flask in a lab incubator at 37°C, for 5 to 8 days before further splitting of the cell culture.

If felt necessary, the culture medium may be renewed after 2 days of incubation, when all viable cells have settled and adhered to the flask bottom; medium renewal will get rid of cell debris and stimulate cell growth.

An estimated 30 million cells may be expected out of a 175 cm² flask cultivated for 7-8 days.

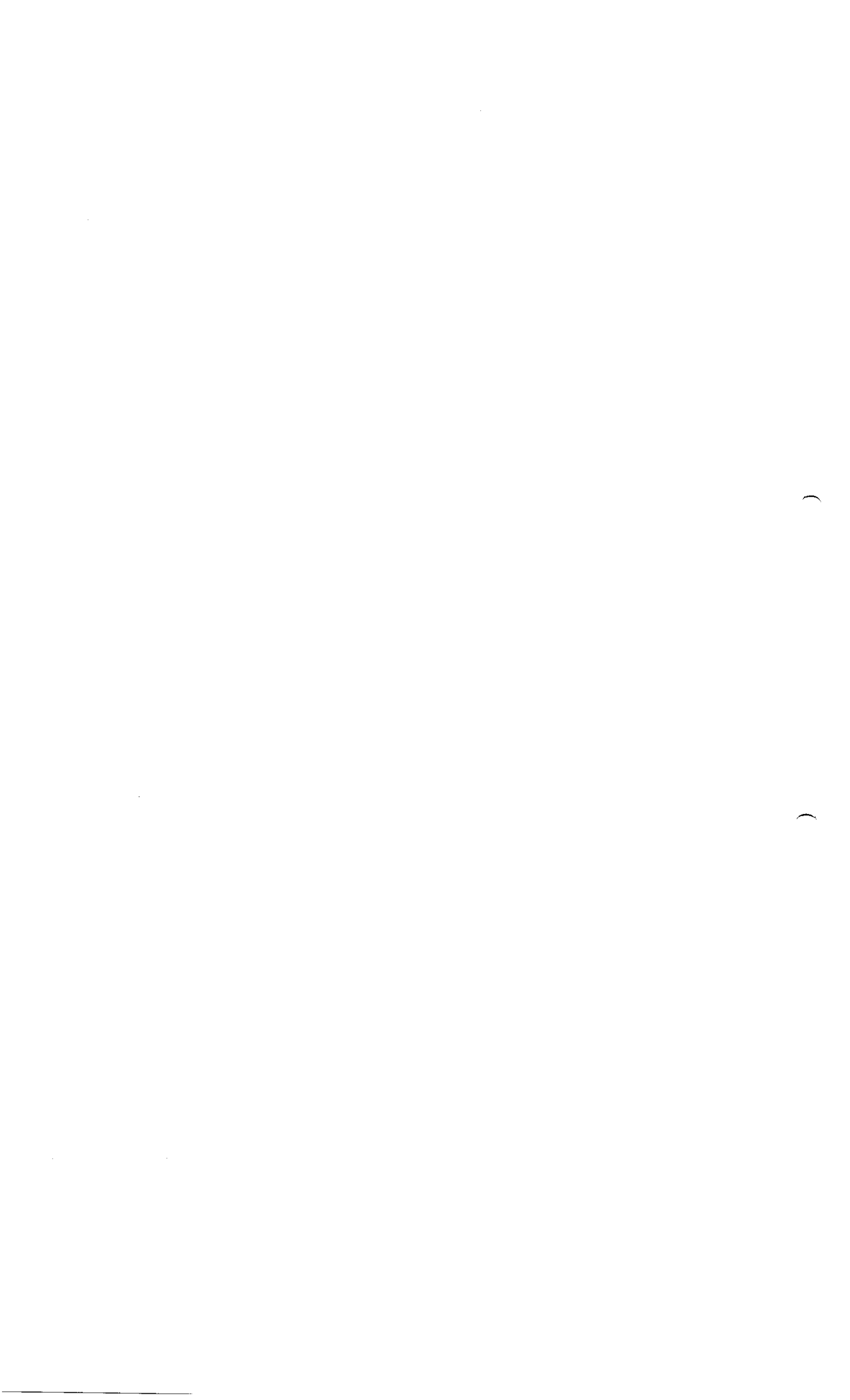
Institut Mérieux - France
Marcy, January 28, 1988

B. MONTAGNON
RESPONSIBLE HEAD OF VIROLOGY UNITS
PRODUCTION AND DEVELOPMENT

H. CHALUMEAU
HEAD OF VIROLOGY PRODUCTION UNIT

CAIF SA
Dra. Bernarda Belay
Co-Directora Técnica
M.N. 15.148

CAIF
Compañía Argentina de
Investigaciones Farmacológicas S.A.
Dra. María Bernarda Belay
Apoderada
DNI 29378925





March 14, 1988
VH/HC - MCH/79

**W.H.O. VERO SEED LOT 10-87
REPORT ON LOT MANUFACTURING**

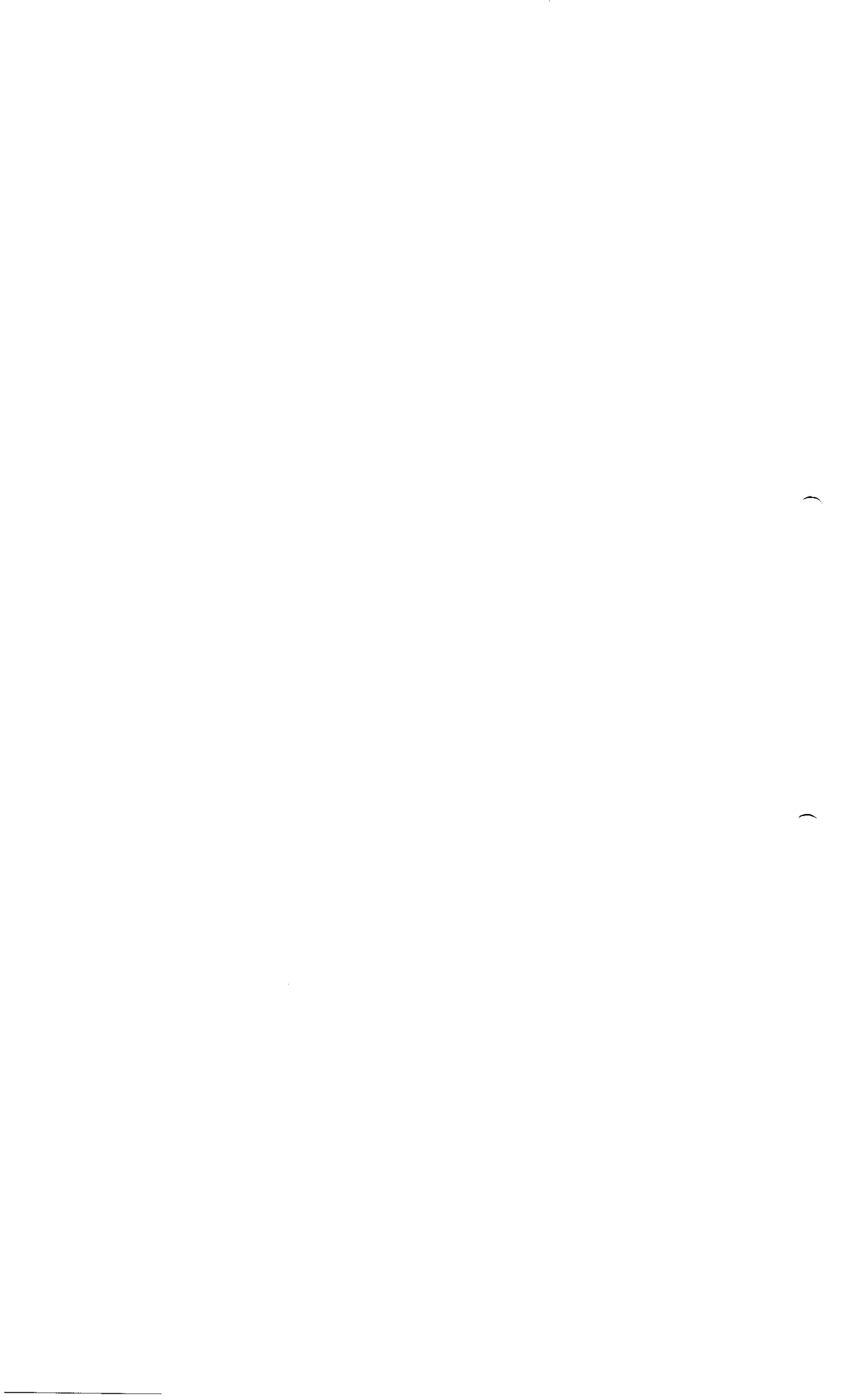
1*) CELL ORIGIN AND TRACEABILITY :

The subculture history of the cells of this lot can be traced back to the seed ampoule of the American Type Culture Collection.

<u>Date:</u>	<u>Passage n°:</u>	<u>Operation:</u>
May 22, 1979	124	Shipment of an ampoule of Vero Cells from the A.T.C.C. Ref. CCL 81 ; ampoule n° F 1415
May, June 1979	124 to 129	Successive splittings of the A.T.C.C. seed, to set up a Primary Cell Bank.
June 21, 1979	129	The Primary Cell Bank is obtained: lot n° 129 B (culture without antibiotics). Storage in liquid nitrogen.
September 28, 1987	130	One ampoule of lot 129 B is transferred to seed a Falcon [®] 25 flask

CAIF SA
Dra. Bernarda Belay
Co-Directora Técnica
M.N. 15.146

CAIF
Compañía Argentina de
Investigaciones Farmacológicas S.A.
Dra. María Bernarda Belay
Apostada
DNI 29378925

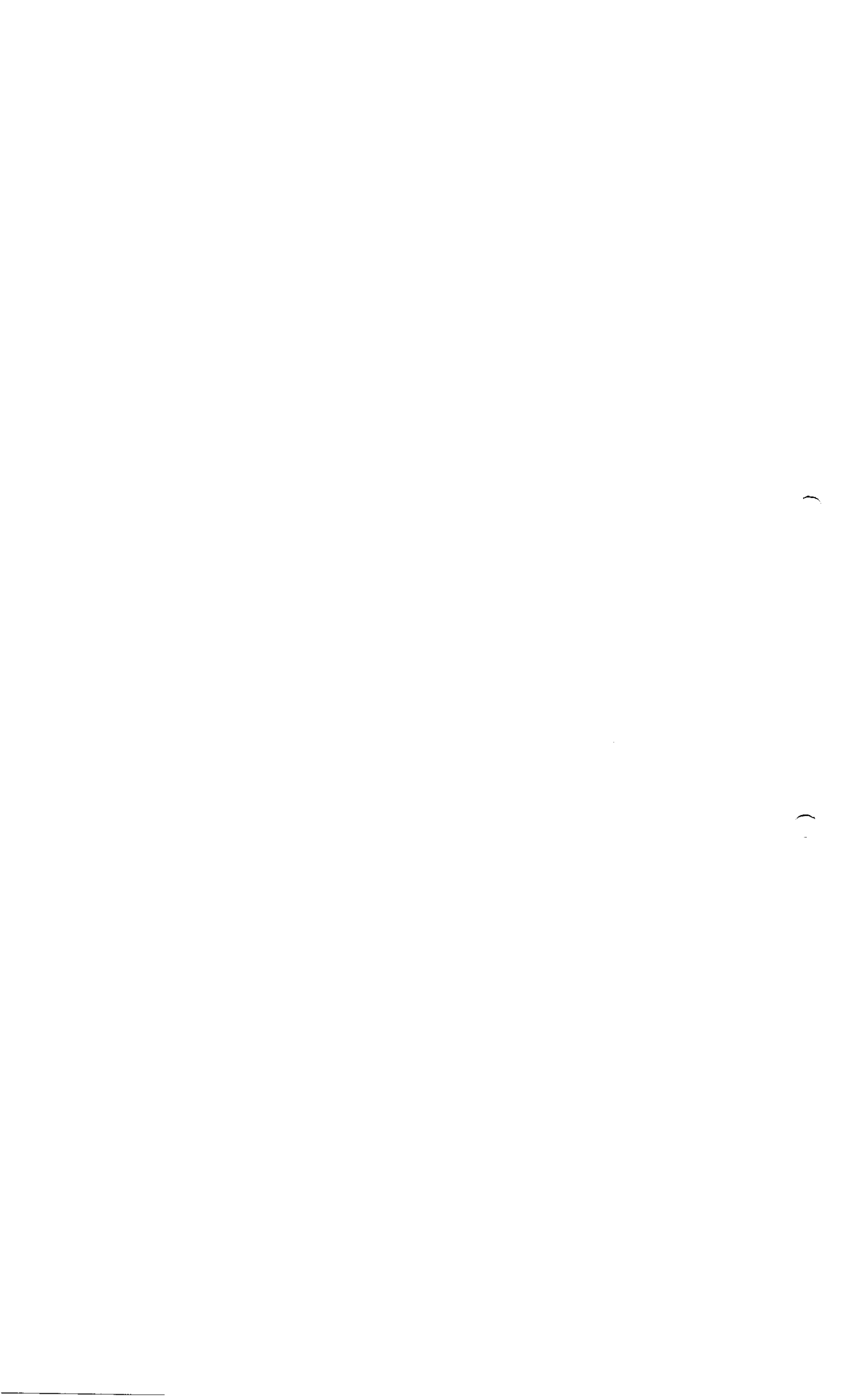




<u>Date:</u>	<u>Passage n°:</u>	<u>Opération:</u>
October 5, 1987	131	Seeding of a Falcon [®] 175 from the trypsinised 130th passage.
October 9, 1987	132	Seeding, from the 131st passage, of 8 Roux bottles.
October 16, 1987	133	Seeding, from the 132th passage, of a 6 liter biogenerator.
October 22, 1987	134	Seeding, from the 133rd passage, of a 28 liter biogenerator.
October 27, 1987	134	Trypsinisation of the 134th passage; the cell suspension is standardized; filling and sealing of seed lot ampoules, freezing; the W.H.O. Vero Cell Bank n° 10-87 is constituted.

CAIF SA
 Dra. Bernarda Belay
 Co-Directora Técnica
 M.N. 15.148

CAIF
 Compañía Argentina de
 Investigaciones Farmacológicas S.A.
 Dra. María Bernarda Belay
 Apoderada
 DNI 29379945





2*) DETAILED MANUFACTURING SCHEME OF LOT W.H.O. 10-87 FROM INSTITUT MERIEUX'S PRIMARY CELL BANK :

2.1) 130th passage :

On September 28, 1987 :

Ampoule n° 97 is withdrawn from Institut Merieux's Primary Cell Bank n° 129 B. The ampoule content (1 ml, ca. 1.8×10^6 cells) is used to seed a Falcon® 25 flask (25 cm²) containing 10 ml of Minimum Essential Medium (Earle base) supplemented with gentamicin and 5 % foetal calf serum (medium lot n° : 7425). Flask is incubated at 37°C.

On September 30 :

Medium is renewed (medium ref. n° : 7425).

On October 2 :

Medium is renewed (medium ref. n° : 7425).

On October 5 :

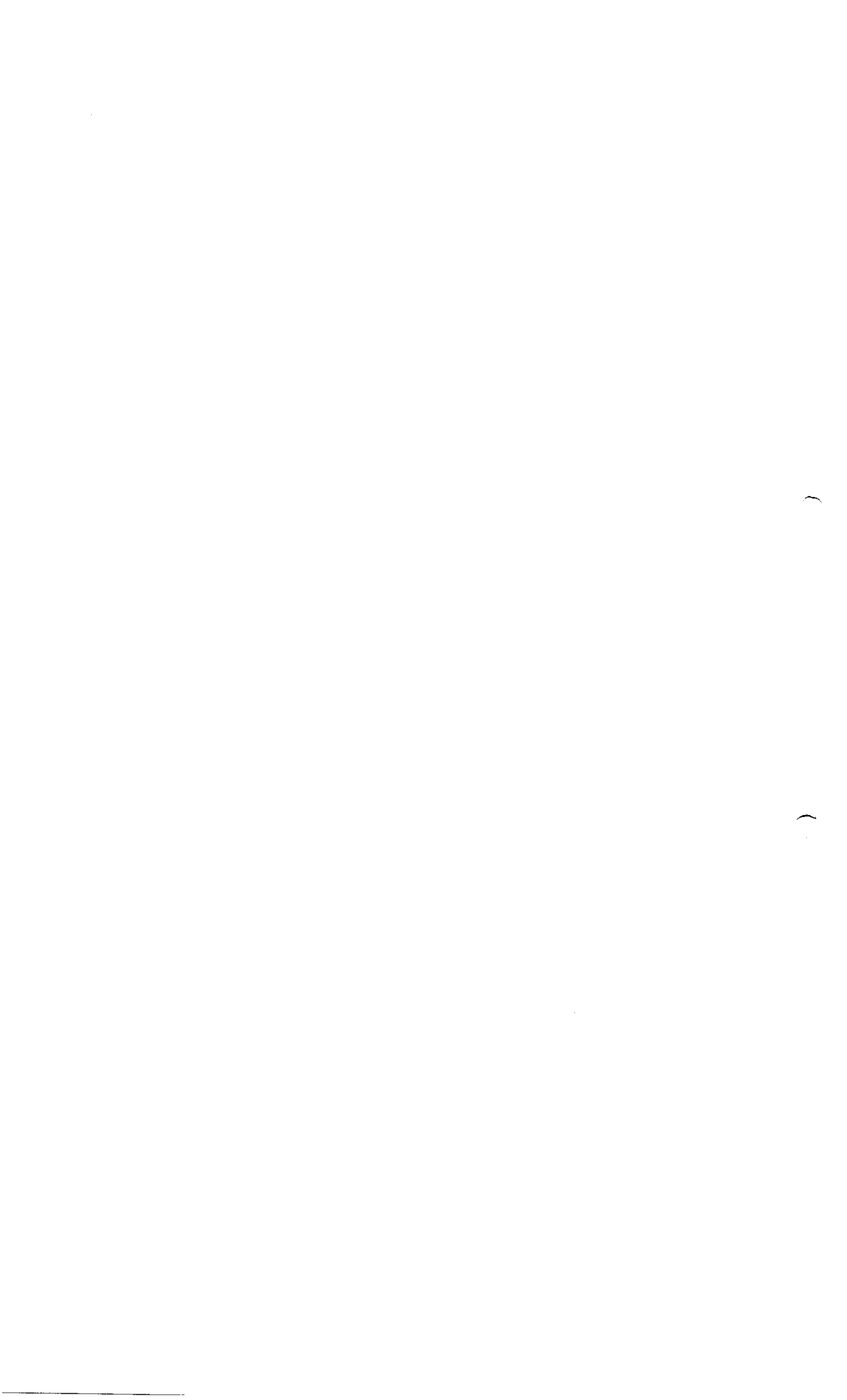
Trypsinisation of passage n° 130.
Cell harvest is estimated to :

= 9×10^6 cells

or an estimated 2.3 population doublings (PDL'S)

taking 90 % as the trypsinisation yield.

CAIF SA
Dra. Bernarda Belay
Co-Directora Técnica
M.N. 15.148
CAIF
Compañía Argentina de
Investigaciones Farmacéuticas S.A.
Dra. María Bernarda Belay
Apostada
DNI 20378025





2.2) 131th passage :

On october 5 :
A Falcon® 175 flask (175 cm²) is seeded with the 130th passage cell suspension. Culture medium is 100 ml of same medium lot (n° 7425). Incubation at 37°C.

On october 9 :
Trypsinisation of 131st passage.
Cell harvest is counted to :

60 x 10⁶ cells

or 2.9 PDL'S

trypsinisation yield taken as 90 %.

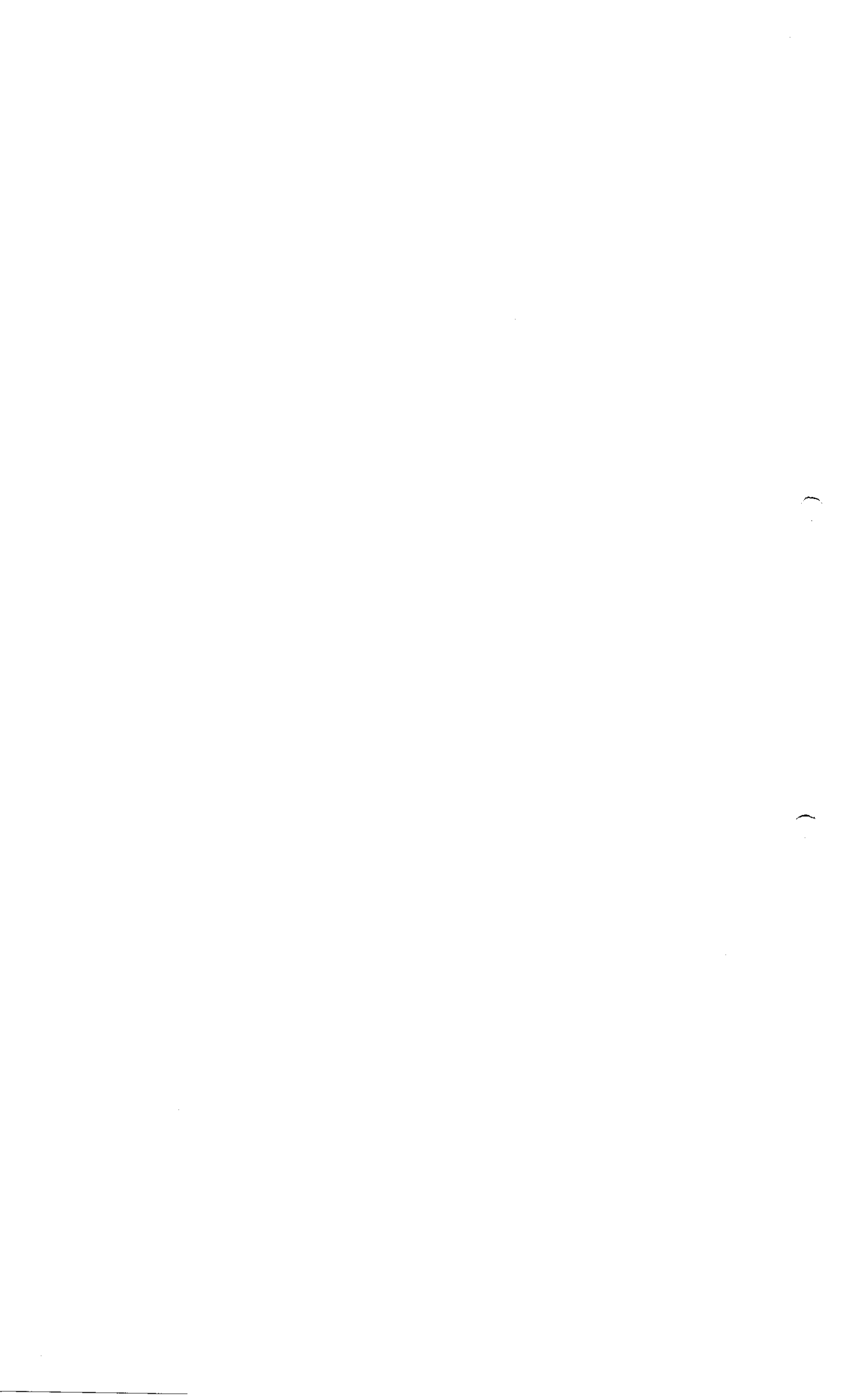
2.3) 132th passage :

On october 9 :
From the 131st passage, trypsinised, 8 Roux bottles, each containing 150 ml of same culture medium as above (lot n° 7425) are seeded and placed at 37°C.

On october 15 :
Culture medium (lot n° 7425) is renewed in Roux bottles.

CAIF SA
Dra. Bernarda Belay
Co-Directora Técnica
I.N. 15.148

CAIF
Compañía Argentina de
Investigaciones Farmacéuticas S.A.
Dra. María Bernarda Belay
Apoderada
DNI 29278925





On October 16 :
The Roux bottles are trypsinised, yielding :

690 x 10⁶ cells or 3.7 PDL'S

(trypsinisation yield assessed to 90 %).

2.4) 133rd passage :

On October 16 :
Seeding, from the trypsinised 132nd passage, of a biogenerator containing 6 liters of medium n° 7425 and 10.2 g of CYTODEX 1® (PHARMACIA) beads, on a surface of 6.1 m² available for cell growth.

Culture parameters are :

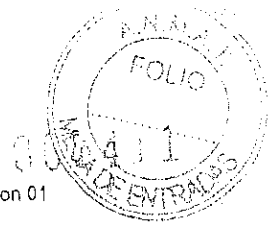
- pH : 6,8 to 7,05
- Temperature : 37°C
- Aeration : Air sweeping of culture medium surface
- Carbon dioxide : According to medium pH
- Impeller speed : 45 RPM'S

On October 20 :
4 liters of the medium are renewed, with medium n° 7453 (same nutrients as medium 7425).

CAIF SA
Dra. Bernarda Belay
Co-Directora Técnica
M.N. 16.148

CAIF
Compañía Argentina de
Investigaciones Farmacéuticas S.A.
Dra. María Bernarda Belay
Apostada
DNI 29374925





On October 22:
The 6 liters culture is trypsinised, when having attained 1.2×10^6 cells per ml or:

7.2×10^9 cells in total, and 3.4 PDL'S

Trypsinisation gives 6.42×10^9 cells, i.e. a yield of 89.2 %

2.5) 134e passage:

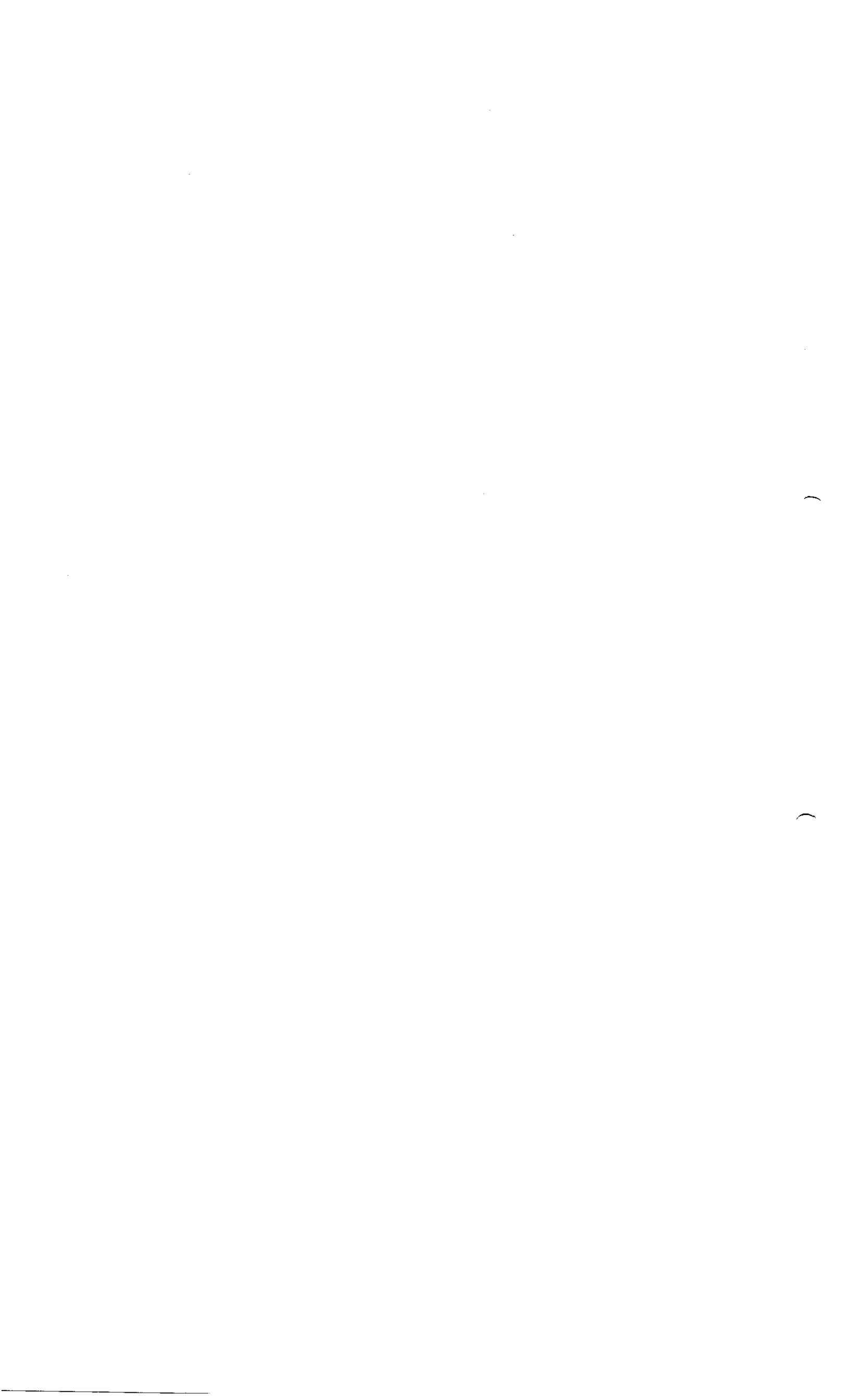
On October 22:
Seeding, from the trypsinised 133rd passage, of a biogenerator containing 28 liters of medium 7425 and 62.2 g of CYTODEX 1® beads and thus providing a surface of ca. 37 m² to cell growth.

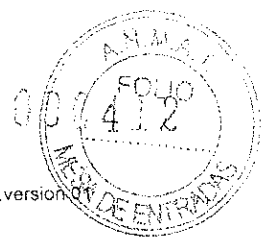
Culture parameters are:

- Impeller speed : 45 RPM
- pH : 6,85 to 7,20
- Temperature : 37°C
- Aération : Medium surface sweeping with air
- Oxygen pressure control : By oxygen sparging.
- Carbon dioxide, sodium hydroxide : For pH control.

CAIF SA
Dra. Bernarda Belay
Co Directora Técnica
M.N. 15.148

CAIF
Compañía Argentina de
Investigaciones Farmacológicas S.A.
Dra. María Bernarda Belay
ABO 20000
CMT 2000000





On October 27:

134th passage is trypsinised, when the culture attains a cell density of 1.8×10^6 cells/ml or a total of:

50.4 x 10⁹ cells and 3.0 PDL'S

After trypsinisation, discarding of the beads from the cell suspension, transfer of the cells in a freezing medium, the final suspension is adjusted to 11.8×10^6 cells/ml for a total of 35.4×10^9 cells, i.e. an overall yield of 70.2%.

2.6) Setting up and distribution of the Seed Lot:

On October 27:

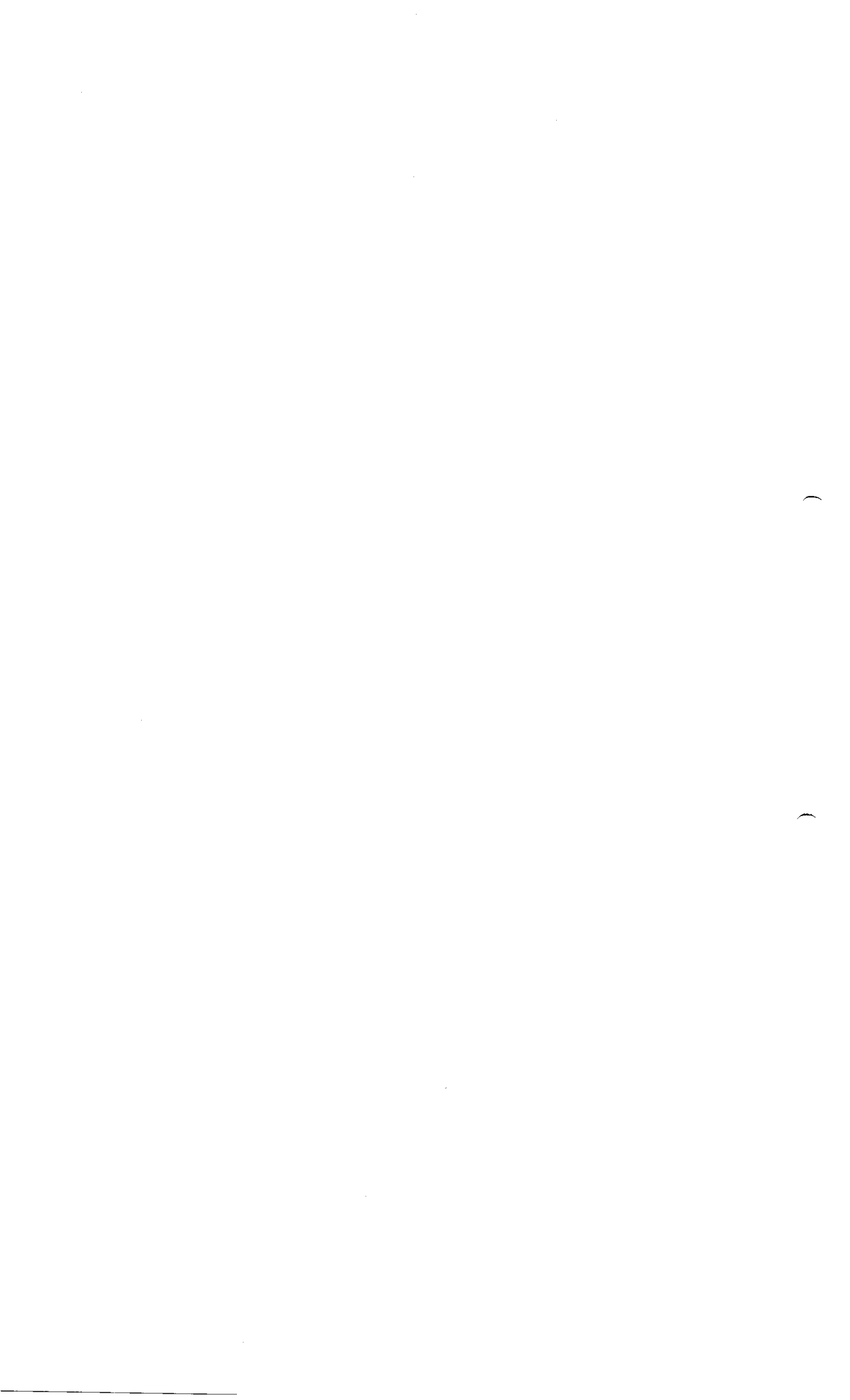
The cell suspension is diluted in freezing medium n° 7560 containing M 199 (Earle's base) supplemented with newborn calf serum (final concentration 30 % V/V) and dimethylsulfoxide (final concentration 10 % V/V).

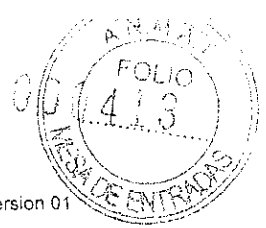
The cell suspension is then distributed into 2 ml glass ampoules, at the rate of 1.1 ml of suspension per ampoule. 1 910 ampoules are so filled, sealed and labelled to the following text:

VERO CELLS
W.H.O. SEED
134th PASSAGE
OCT. 1987
N°

CAIF SA
Dra. Bernarda Belay
Co-Directora Técnica
M.N. 10.148 15

CAIF
Compañía Argentina de
Investigaciones Farmacéuticas S.A.
Dra. María Bernarda Belay
Acreditada
DNI 29376925





The rest of the suspension is discarded or used up in tests to monitor the filling.

The n° given is sequential, so that each ampoule of the lot bears a unique number.

The ampoules are frozen in the upright position, in cardboard boxes, at - 70°C.

3*) STORAGE OF THE SEED LOT :

On October 28 :

The ampoules are transferred into liquid nitrogen, in groups of 80. A storage log book is constituted, tracking, ampoule per ampoule, the stock movements.

4*) TRANSFER OF AMPOULES FROM THE STOCK :

On February 1, 1988 :

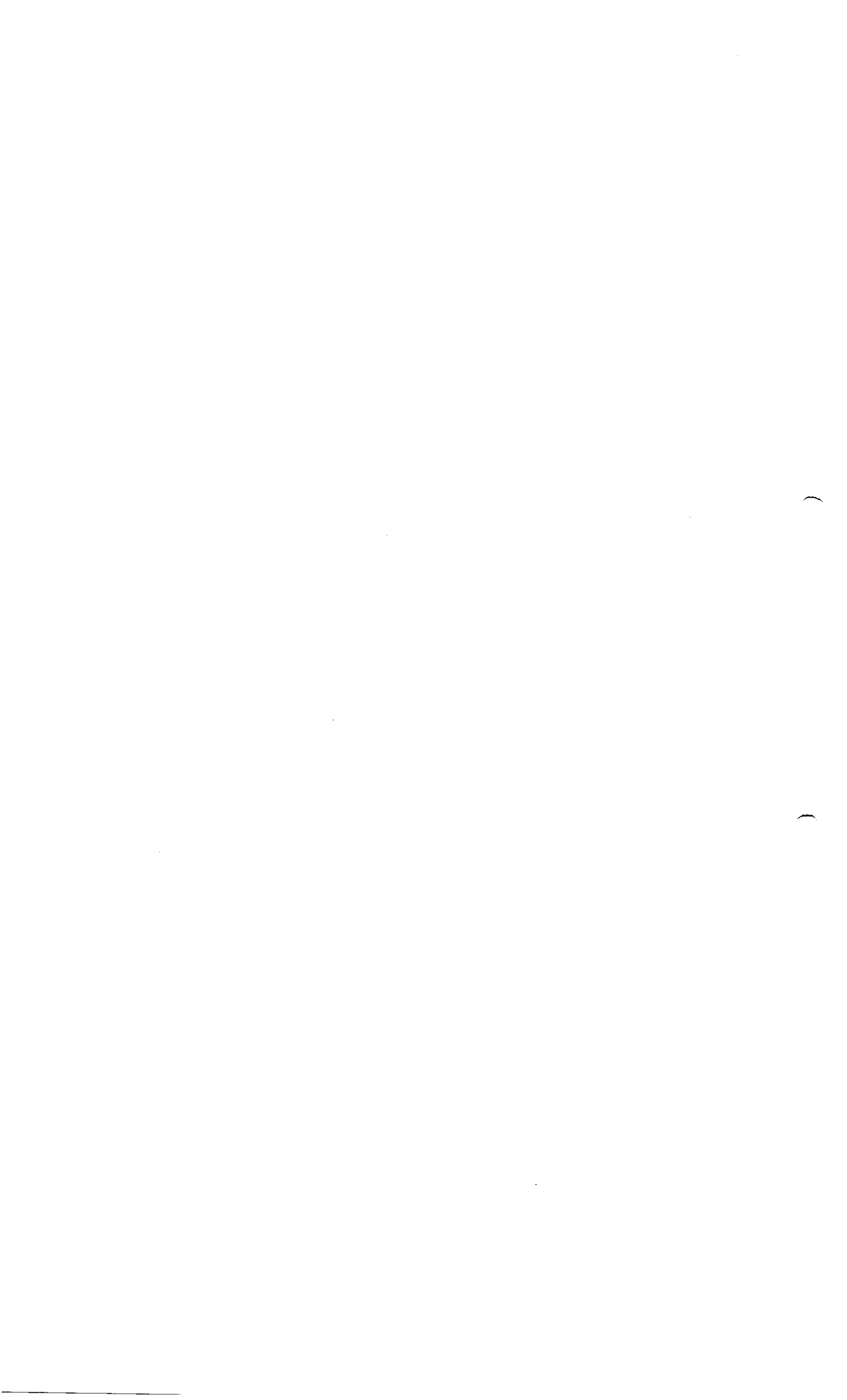
At W.H.O.'s request, 1 000 ampoules (i.e. all available ampoules between 1 ar 1 016) are packed in dry ice and transferred to :

Dr. A. DOYLE
Center for Applied Microbiology and Research
Porton Down
U.K.

During this movement a check, ampoule by ampoule, was run to verify that the shipment corresponded exactly to what was reported on the storage log book.

CAIF SA
Dra. Bernarda Belay
Co-Directora Técnica
M.N. 15.148

CAIF
Compañía Argentina de
Investigaciones Farmacéuticas S.A.
Dra. María Bernarda Belay
Apoderada
DNI 29378925





THE RESULTS OF TESTING OF THE WILD VIRUS CELL
MASTER SEED LOT (Passage 131)

TEST	LEVEL OF PASSAGE	RESULTS	TESTED BY
Tests for antigenic identity			
Tests in rabbits & mice			
2 liters of suckling mice	181 and 156	satisfactory	Dr S. Suarez, Central Research Institute, India
10 adult mice	"	"	"
5 guinea-pigs	"	"	"
5 rabbits	"	"	"
10 embryonated chick eggs	"	"	"
Serologic tests			
Xenotransmission	139, 135, 136, 141	negative	Dr A. Peller, Laboratoire National de la Santé, Paris, France
Sterility	139, 135, 136, 141	negative	Dr J. Forrest, Health & Welfare, Canada Dr A. Wells, Food & Drug Administration, Washington, USA
Tests for reproductibility			
Reverse transcriptase	135	negative	Dr B. Heston, Laboratoire National de la Santé, Paris, France Dr A. Wells, Food & Drug Administration, Washington, USA
Stain			
Ernst, positive, adenocytol, CV, ST, viruses	137	negative	Dr F. Oswald, Institut Pasteur, France
Tests for non-reproductibility			
In vitro			
Colony forming ability in soft agar	137	Positive but characteristic of wild cells	Dr A. Wells, Food & Drug Administration, Washington, USA
Multiplicity cultures	137	Positive, but characteristic of wild cells	"
Colony forming ability in soft agar	135, 140, 145, 150	Cells which have originated in soft agar with 5% FCS have had phenotypes resembling wild and no progressive increase	Dr T. Sato, State University, Japan
Multiplicity cultures	135, 140, 145, 150	"	"
Colony forming ability in soft agar	141	5% soft cells formed colonies	Dr J. Forrest, Health & Welfare, Canada
In vivo			
All-injected newborn white mice	141	Reproductibility at the inoculation site in 3 of 10 of the 15 animals without subcutaneous	Dr J. Forrest, Health & Welfare, Canada
Antithymic globulin Allthoven, Netherlands	139	Small amounts of the virus	Dr van Steenis, NIVOP, Bilthoven, Netherlands
AIC-treated New born mice	156	Small non-reproductibility forming colonies at low inoculation sites. An antiserum was prepared in isopharmacia, Jung, Vienna, liver, brain and other tissues of mice	Dr van Steenis, NIVOP, Bilthoven, Netherlands
Identity tests			
Characterization of isopharmacia CV, FCB		Satisfactory	Dr A. Peller, Laboratoire National de la Santé, Paris, France
Specific fluorescence		Identical with wild cells	Dr F. Oswald, Institut Pasteur, France

CAIF SA
 Dra. Bernarda Belay
 Co-Directora Técnica
 M.N. 18.148

CAIF
 Compañía Argentina de
 Investigaciones Farmacológicas S.A.
 Dra. María Bernarda Belay
 Apoderada
 DNI 29378925



3.2.S.2.3. Monovalent pools of inactivated poliomyelitis vaccine, NVI

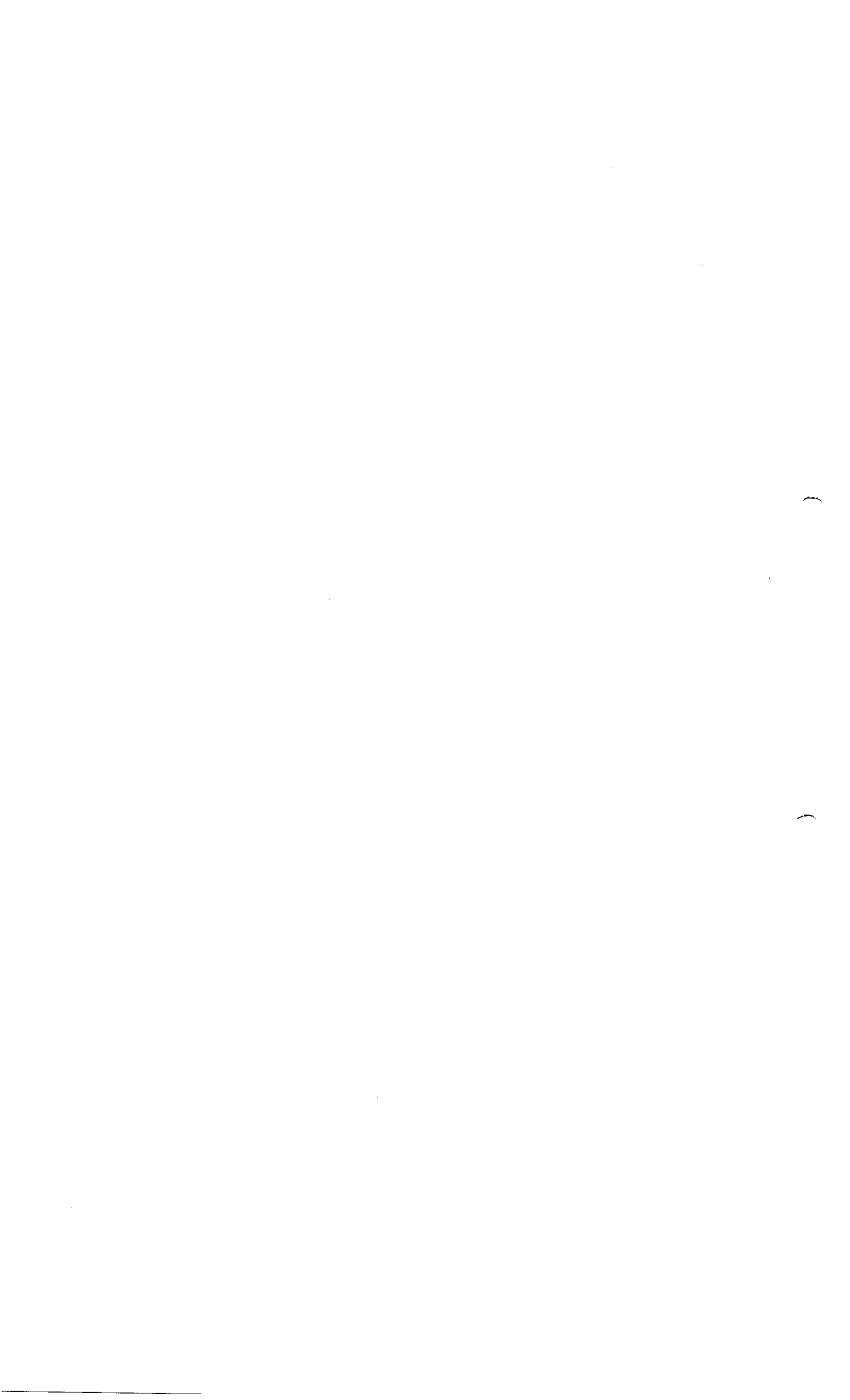
WHO Vero cell substrate

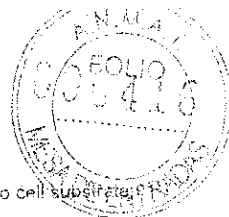


Appendix 3: WHO Vero cells as substrate in production of biologicals

CAIF SA
Dra. Bernarda Belay
Co-Directora Técnica
M.N. 15.148

CAIF
Compañía Argentina de
Investigaciones Farmacéuticas S.A.
Dra. María Bernarda Belay
Amdorreda
DNI 20378915





Page 2 - Paula Burzstyn Goldberg, Ph.D.

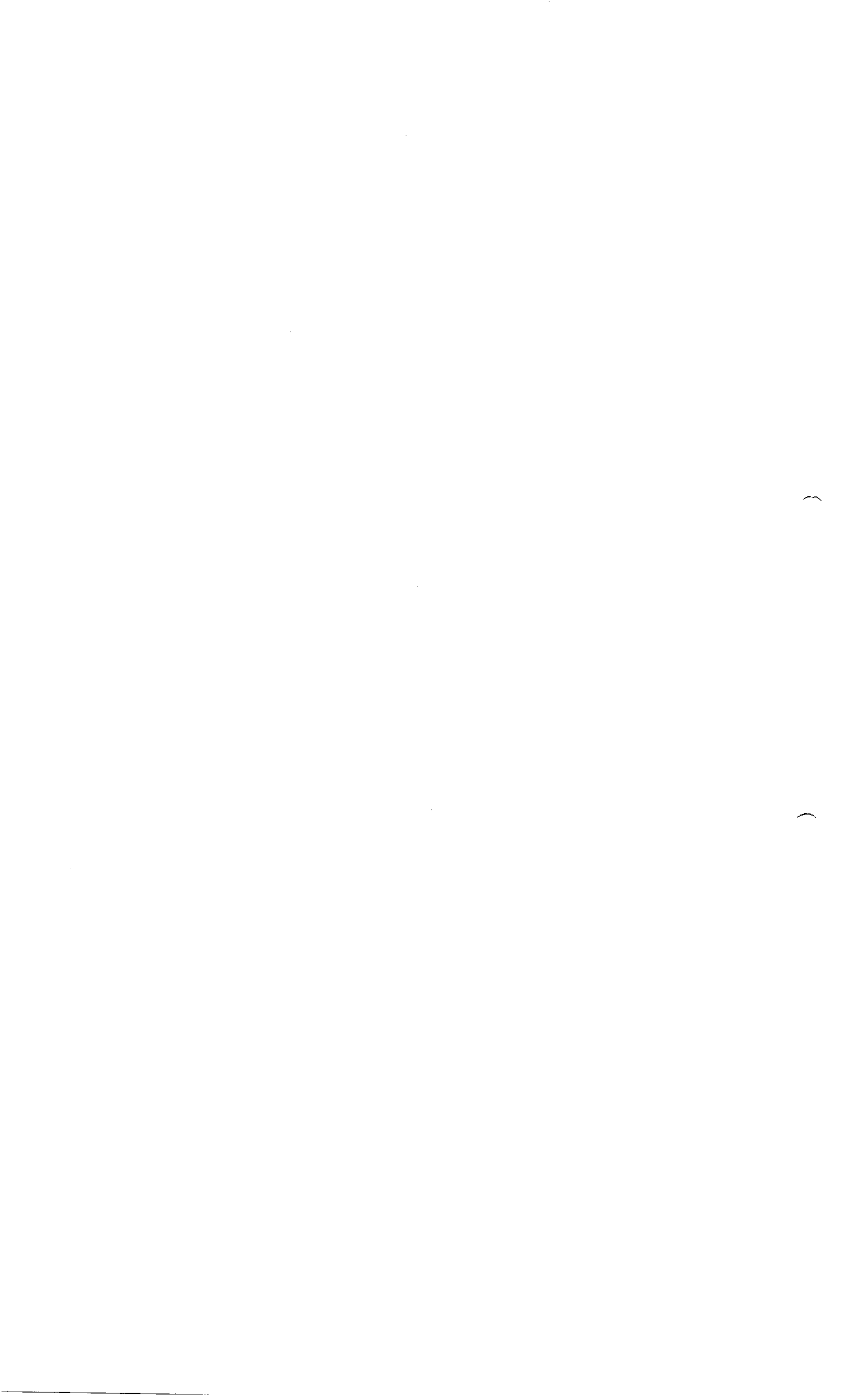
parenteral, mucosal, or other route. Based on this concern, CBER recommends that you:

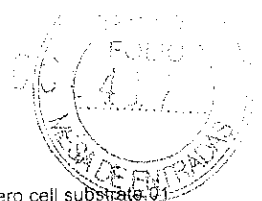
- A. Measure the amount and size distribution of residual cellular DNA in your final product if you have not done so already. Please submit these results to your IND or MF and describe them in terms of the amount of residual cellular DNA per human dose of final formulated vaccine.
- B. Consider various methods (e.g., DNase treatment) by which the amount and size of residual cellular DNA might be further reduced. Please comment on what you have done or intend to do to consider the introduction of additional DNA reducing methods into your process, as well as the potential impact of such changes on the performance (e.g., immunogenicity) of the product.

Internal discussions and preliminary comments of the VRBPAC also suggest the need for tumorigenicity testing of each manufacturer's Vero master cell bank and the end-of-production-passage-level-cells (EOPC) derived from this cell bank. The term "EOPC" is meant to include cells at the end of a production run, as well as cells cultured from the master or working cell bank to a population doubling level comparable to or beyond cells at the end of production. EOPC should preferably be described in terms of population doublings from your Vero master cell bank. The preferred model for this test is the immunosuppressed newborn Wistar rat, which should be followed for a period of at least five months. Alternative tumorigenicity models may also be appropriate in certain circumstances and their use should be discussed with CBER. If any evidence of tumorigenic potential is demonstrated in these tests, or if the results are inconclusive, the need for additional tumorigenicity testing with cell lysates and/or DNA will also need to be discussed with CBER.

CAIF SA
 Dra. Bernarda Belay
 Co-Directora Técnica
 M.N. 15.148

CAIF
 Compañía Argentina de
 Investigaciones Farmacológicas S.A.
 Dra. María Bernarda Belay
 Apoderada
 ONI 29178913





Page 3 - Paula Burzstyn Goldberg, Ph.D.

Please submit your responses to your IND(s) or MF(s) within six months from the date of issuance of this letter. Please direct any questions in the interim to Dr. Rebecca Sheets at the telephone number above.

Sincerely yours,

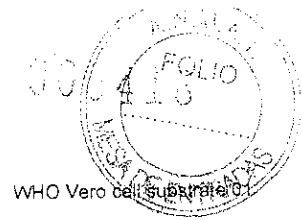
Karen Midthun, M.D.
Director
Office of Vaccines
Research and Review
Center for Biologics
Evaluation and Research

CAIF SA
Dra. Bernarda Belay
Co-Directora Técnica
M.N. 15.148

CAIA
Compañía Argentina de
Investigaciones Farmacológicas S.A.
Dra. María Bernal de Belay
Apudada
DNI 20170921



3.2.S.2.3. Monovalent pools of inactivated poliomyelitis vaccine, NV1



WORLD HEALTH ORGANIZATION



ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE

extra copie

Téléphone Central/Exchange: 791.31.11
Direct: 791

In reply please refer to:
Please de rappeler la référence: **BLG-B3/370/5**

Dr G. van Steenis
Rijksinstituut voor de Volksgezondheid
en Milieuhygiene
Antonie van Leeuwenhoeklaan 9
Postbus 1
Bilthoven
Pays-Bas

3 August 1990

Dear Dr van Steenis,

This is a follow-up to your recent telephone conversations with Dr J. Milstien, and your request relating to the results of tests on the WHO Vero cell bank.

I am sending you, under separate cover, a copy of my verbal report "The acceptability of the proposed WHO Vero cell bank for the production of biologicals (The results of testing of the WHO Vero Cell Master Seed)", which was presented by me at the last Expert Committee on Biological Standardization in 1989. A short précis of this information will be published in the WHO Technical Report Series some time this year.

I hope this information will be helpful to you, and please do not hesitate to contact me if you need any further assistance.

Once again, many thanks for your cooperation.

Best regards.

Yours sincerely, *V. Grachev*

Dr V. Grachev
Scientist
Biologicals

CAIF SA
Dra. Bernarda Belay
Co-Directora Técnica
M.N. 15/148

CAIF
Compañía Argentina de
Investigaciones Farmacéuticas S.A.
Dra. María Bernarda Belay
Apoderada
DNI 29278925







by ETCC in Salisbury, UK and samples together with a leaflet of instruction will be supplied, on request, to suitable producers.

Samples of this bank were tested in 7 laboratories including the Central Research Institute, India, Laboratoire national de la Santé, France, Health and Welfare, Canada, Food and Drug Administration, USA, Institut Pasteur, France, Kyoto University, Japan, RIVM, Bilthoven, Netherlands, in relation to compliance with the Requirements. The results of these tests were as follows (table):

Tests for adventitious agents including bacteria and mycoplasma.

Tests for adventitious agents have been done by the five laboratories. Vero cells at 141 and 156 levels of passage were tested for adventitious viruses using at least 10⁷ viable cells divided equally among the animals in each group:

- 2 litters of suckling mice, 20 animals, less than 24 hours old;
- 10 adult mice;
- 5 guineapigs
- 5 rabbits and
- 10 embryonated eggs.

The results were satisfactory, no adventitious viruses were detected in cells at the 141 and 156 passage levels.

Tests for retroviruses were performed by one laboratory using an assay for viral reverse transcriptase on the 135 level of passage of the vero cells. The results were negative. Tests on the 137 level of passage of the vero cells were negative for Herpes, papilloma, adenovirus, simian viruses.

CAIF SA
Dra. Bernarda Belay
Co-Directora Técnica
M.N. 15.148

CAIF
Compañía Argentina de
Investigaciones Farmacológicas S.A.
Dra. María Bernarda Belay
Apoderada
DNI 24178915





- 3 -

Tests for bacteria, fungi and mycoplasmas were performed according to the General Requirements for the Sterility of Biological Substances (WHO, TRS No.530, 1973) by three laboratories using 134, 135, 136 and 144 levels of passage. The results were satisfactory.

Tests for tumorigenicity.

In vivo tests

Tests for tumorigenicity were performed by two laboratories.

The tumorigenicity test carried out in ATG-treated newborn Wistar rats demonstrated that vero cells of passage 141 caused adenocarcinomas at the inoculation site in 9 of the 19 animals inoculated. No lung metastasis was detected in any of the rats.

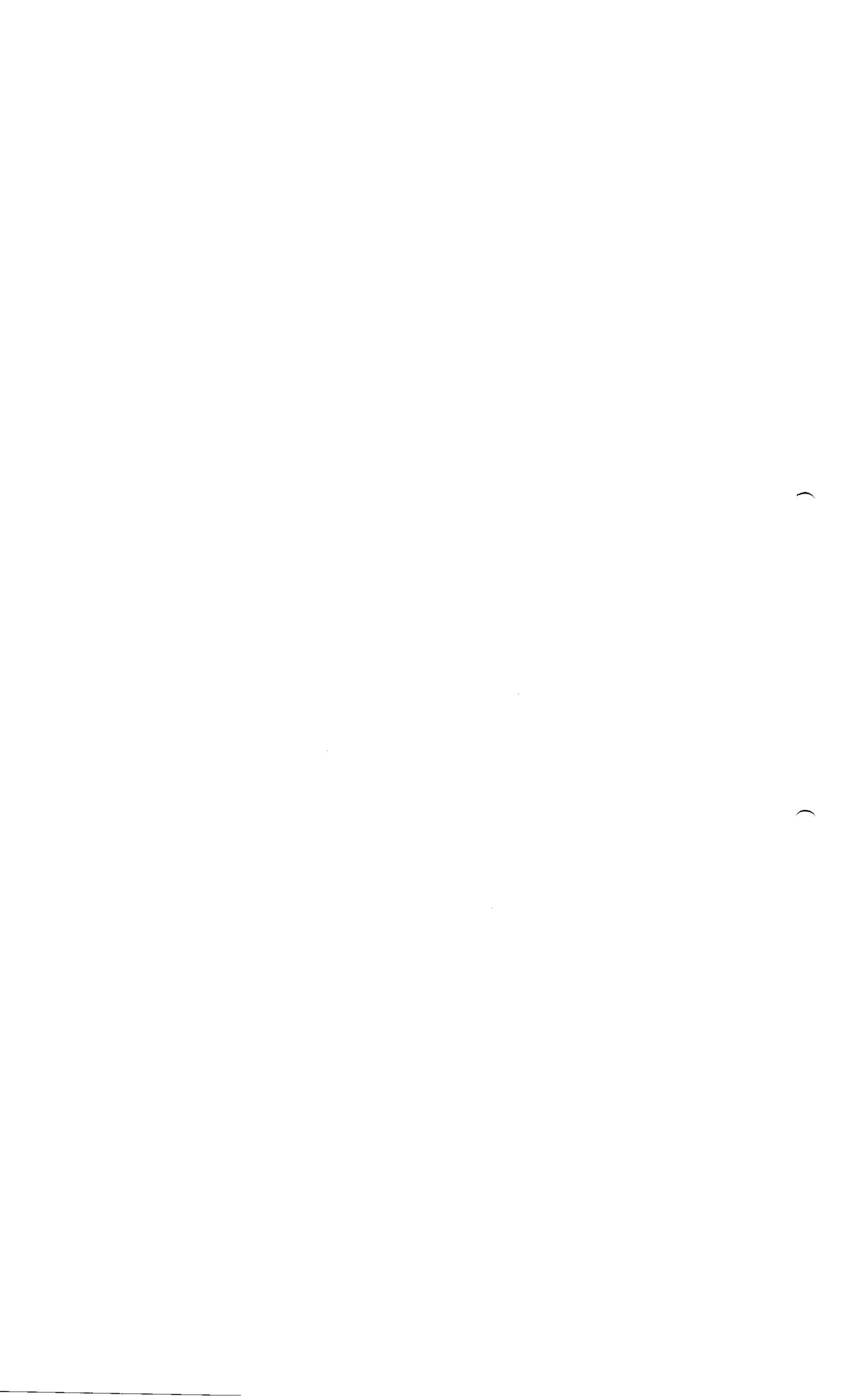
In the other laboratory samples of the WHO Master Vero Cell Seed lot were tested for tumorigenicity in antithymocyte globulin (ATG) treated new born rats according to current WHO Requirements. The cells were received at passage 134 and further cultivated to be tested at passage level 156 i.e. more than 10 population doublings beyond the maximum passage level permitted for production. They were also tested at passage level 139 for comparison. As a positive control HeLa cells and as a negative control MRC5 human diploid cells were used.

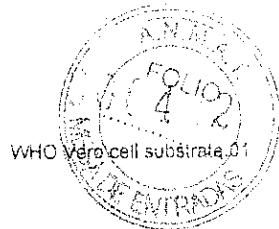
Vero cells at passage level 156 caused small non-progressively growing nodules at the injection site. These nodules, consisting of accumulations of

7

CAIF SA
Dra. Bernarda Belay
Co-Directora Técnica
M.N. 15.148

CAIF
Compañía Argentina de
Investigaciones Farmacéuticas S.A.
Dra. María Bernarda Belay
Avenida
DNI 29378925





Vero cells, and stroma, were still grossly visible at the end of the three week observation period. No metastasis was observed in lymph-nodes, lungs, kidneys, liver, brain and other tissues of rats inoculated with Vero cells at this passage level. Vero cells at passage level 139 induced small nodules at the site of injection that regressed after the first week. Histologically morphologic structures resembling those observed at the injection site in rats inoculated with passage 156 cells were however present in all rats inoculated with passage 139 cells. Signs of metastasis were not observed in rats inoculated with passage 139 cells.

In contrast to these results Hela cells used as positive control, induced progressively growing tumours at the site of injection in all inoculated animals, and extensive metastasis in lungs and some other tissues.

MRC₅ cells induced no grossly visible nodules but histologically at least one animal showed an accumulation of cells at the site of injection which probably represented proliferated MRC₅ cells. Signs of metastasis were not observed.

It was concluded that Vero cells of the WHO Vero cell Master Seed lot at passage level 156 did meet requirements for non-progressive growth and absence of metastasis in antithymocyte-treated new-born rats.

In vitro tests

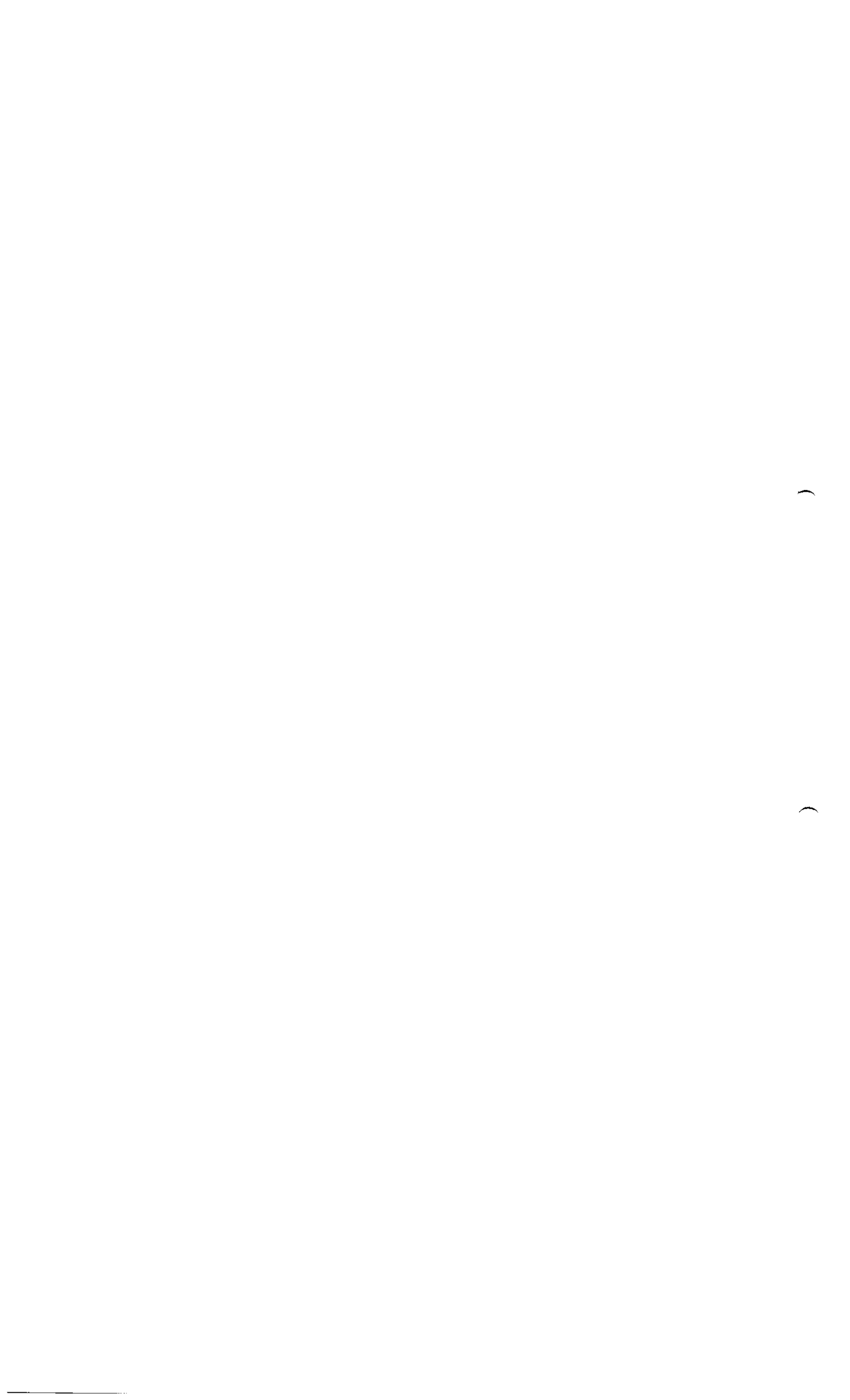
In vitro tests were conducted by three laboratories

Colony forming ability in soft agarose. The test was positive but the deviation from normal shown by vero is insignificant with respect to its safety

8

CAIF SA
Dra. Bernarda Belay
Co-Directora Técnica
M.N. 15.148

CAIF
Compañía Argentina de
Investigaciones Farmacéuticas S.A.
Dra. María Bernarda Belay
Apodada
DNI 15.148.148





when used as substrate for biological products. Muscle-organ culture: This was also positive but characteristic of Vero cells. Again these results with WHO Vero cells are fully consistent with all Vero cells that the consultant has examined and in his opinion are not significant with respect to cell substrate safety issues.

In another laboratory 54% of Vero cells formed colonies in soft agar.

In further studies when Vero cells were maintained in both MEM with fetal calf serum (FCS) and modified Eagle's medium with 12% calf serum (CS) and a comparison of in vitro malignant phenotypes of these culture conditions was made. As long as Vero cells were cultivated in MEM with 5% FCS they showed no progression in their malignant phenotypes growth in 0.3% agar medium or invasive potential in muscle organ culture (MOC). However, those cells which had been maintained in modified Eagle's medium with 12% CS showed progressive increase in their invisible potentials and growth in 0.3% agar medium. The doubling times of cells maintained in modified Eagle's medium reduced gradually but not for those cells maintained in MEM with 5% FCS. It was concluded that as long as Vero cells are maintained in MEM with 5% FCS, their in vitro phenotypes are extremely stable and show no progress increase.

Identity test

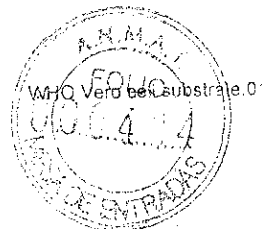
Identity tests including biochemical e.g. isoenzyme analysis. Characterization of isoenzymes LDH (lactate dehydrogenase), GPI (glucose phosphate isomerase) and PGD (phosphogluconate dehydrogenase) and the specific fingerprint were conducted by two laboratories. WHO cell bank identity to vero cells American Tissue Culture Collection (initial cells).

CAIF SA
Dra. Bernarda Belay
Gr. Directora Técnica
M.N. 15.148

CAIF
Compañía Argentina de
Investigaciones Farmacológicas S.A.
Dra. María Bernarda Belay
Académica
DNI 29.749.2



3.2.S.2.3. Monovalent pools of inactivated poliomyelitis vaccine, NVI

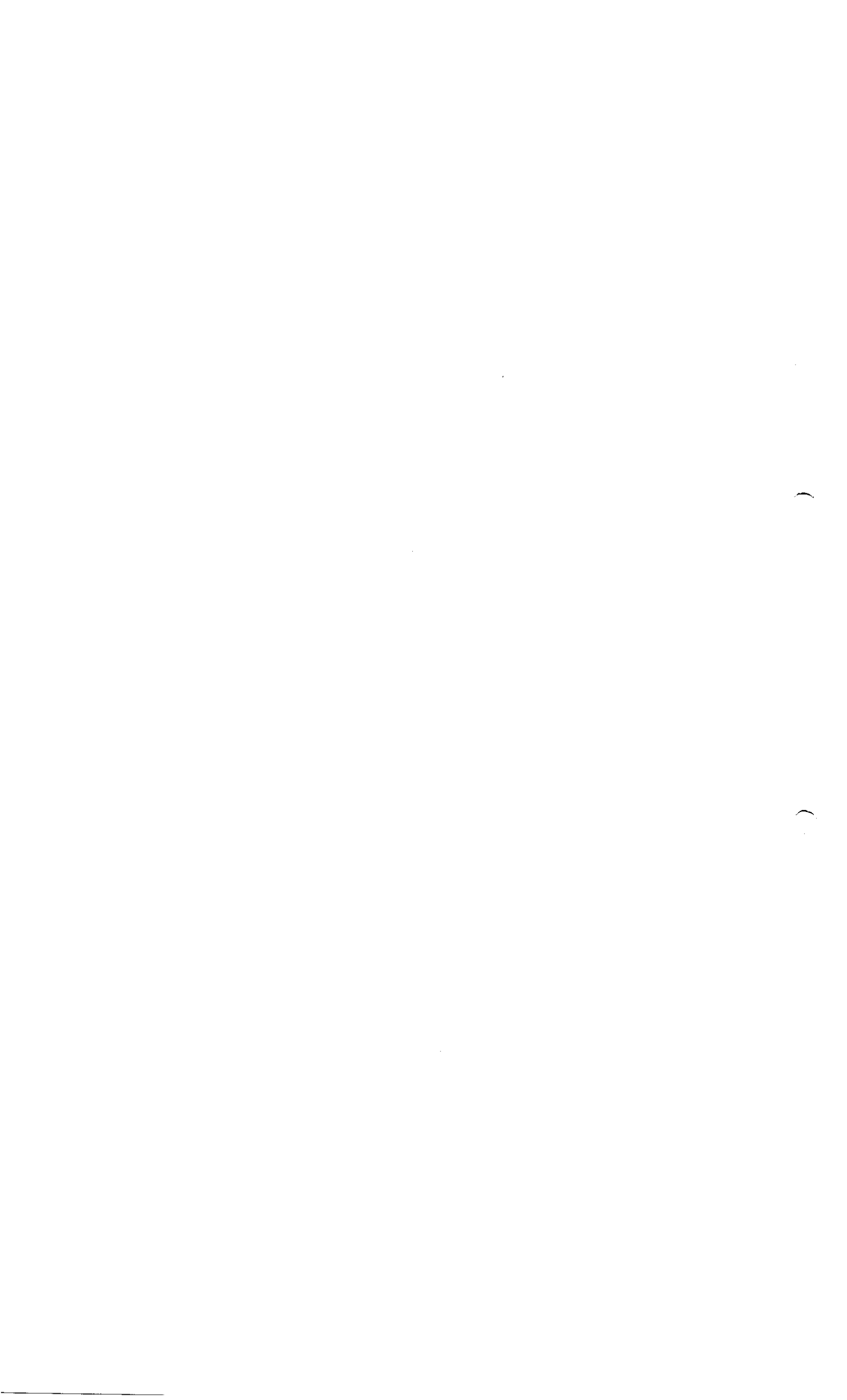


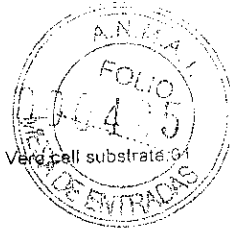
Conclusion

The results of testing of the WHO Vero cell Master Seed lot meet the Requirements for Continuous Cell Lines used for Biologicals Production (Requirements for Biological Substances No. 37) WHO, TRS No. 745, 1987, Annex 3, pp. 93-107.

CAIF SA
Dra. Bernarda Belay
Co-Directora Técnica
M.N. 15.148

CAIF
Compañía Argentina de
Investigaciones Farmacéuticas S.A.
Dra. María Bernarda Belay
Apoderada
ONI 21.780.25





Annex 2.

Summary of the tests^a performed on the cell seed (CS)^b, manufacturing working cell bank (MWCB) and high passage of this cell bank (HiP-MWCB) of Verocells for the preparation of both poliovaccines

Test	CS	MWCB	HiP-MWCB
3.2. <u>for adventitious agents</u>			
3.2.1. in animals and eggs	+ (141) ^d	- ^e	+ (156) ^d
3.2.2. sterility	+ (134, 135, 136, 144)	+	+
3.2.3. morphology (EM)	+	-	+
3.2.4. on cell cultures	+ (137)	+	+
3.2.5. for neuroviruses ^{refers}	+ (135)	-	+
3.3. <u>for tumorigenicity</u>			
3.3.1. <u>in vivo</u> tests			
b. newborn rats treated with ATG	+ (134, 141)	-	+ (156)
3.3.2. <u>in vitro</u> tests			
a. in soft agar	+ (135, 137, 140, 145)	-	+ (150)
b. onto muscle-organ cultures	+ (135, 137, 140, 145)	-	+ (150)
3.4. identity	+ (?)	+	+

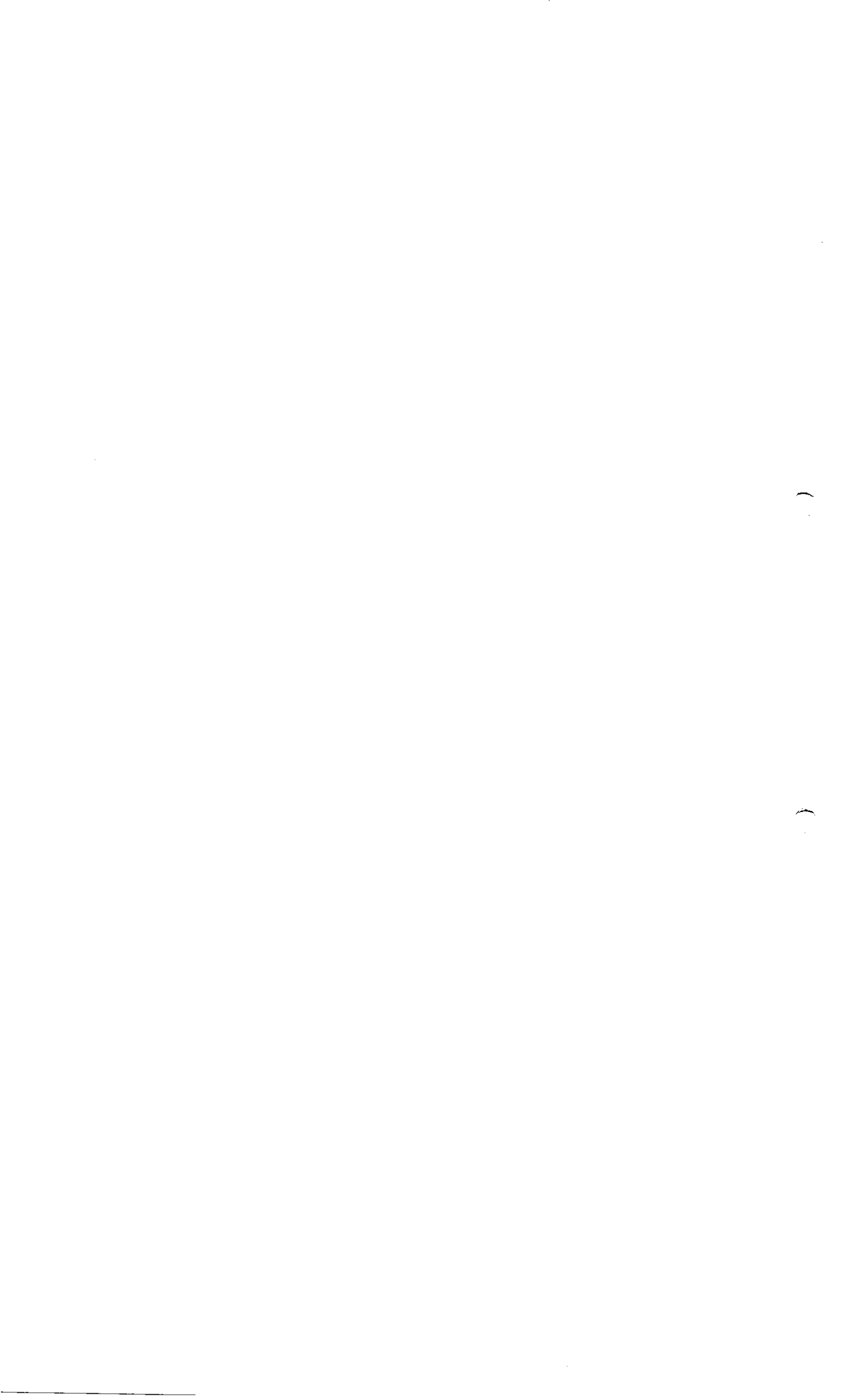
^aDescribed in TRS 745, 93 (1987).

^bAvailable at the 134th passage from WHO.

^c+: required -: not required.

^dThe number between brackets refers to the passage level at which the tests have been performed (see ecbs-89.6 (WHO-document)).

CAIF SA
 Dra. Bernarda Belay
 Co-Directora Técnica
 M.S. 15.148
 CAIF
 Compañía Argentina de
 Investigaciones Farmacológicas S.A.
 Dra. María Bernarda Belay
 Apoderada
 DNI: 25378925



P. N. M. A. I.
FOLIO
M. N. DE ENTRADA

10.2.3 Control de Productos Terminado



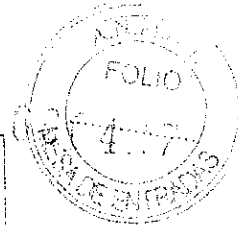
CAIF SA
Dra. Bernarda Belay
Co-Directora Técnica
M.N. 15.148

Compañía Argentina de
Investigaciones Farmacéuticas S.A.
Dra. Maria Bernarda Belay
Apoderada
01/12/1981





Laboratorio CAIF, Compañía Argentina de Investigaciones Farmacéuticas S.A.
VAXIPOLIO, Suspensión inyectable
Vacuna antipoliomielítica inactivada



Técnica analítica
VAXIPOLIO, Suspensión inyectable
Vacuna antipoliomielítica inactivada

ESPECIFICACIONES

1. *Aspecto*: Solución clara color naranja/roja.
2. *Contenido de antígeno D / Identidad* :
Antígeno de poliomielitis Tipo 1: \geq a 30 DU / 0.5 ml
Antígeno de poliomielitis Tipo 2: \geq a 6 DU / 0.5 ml
Antígeno de poliomielitis Tipo 3: \geq a 24 DU / 0.5 ml
3. *pH*: 6.8 - 7.4
4. *Volúmen extraíble*: \geq a 0.5 ml
5. *Contenido de proteínas*: \leq a 20 μ g/ml
6. *Esterilidad*: Estéril
7. *Endotoxinas Bacterianas*: \leq a 10 UI/ml

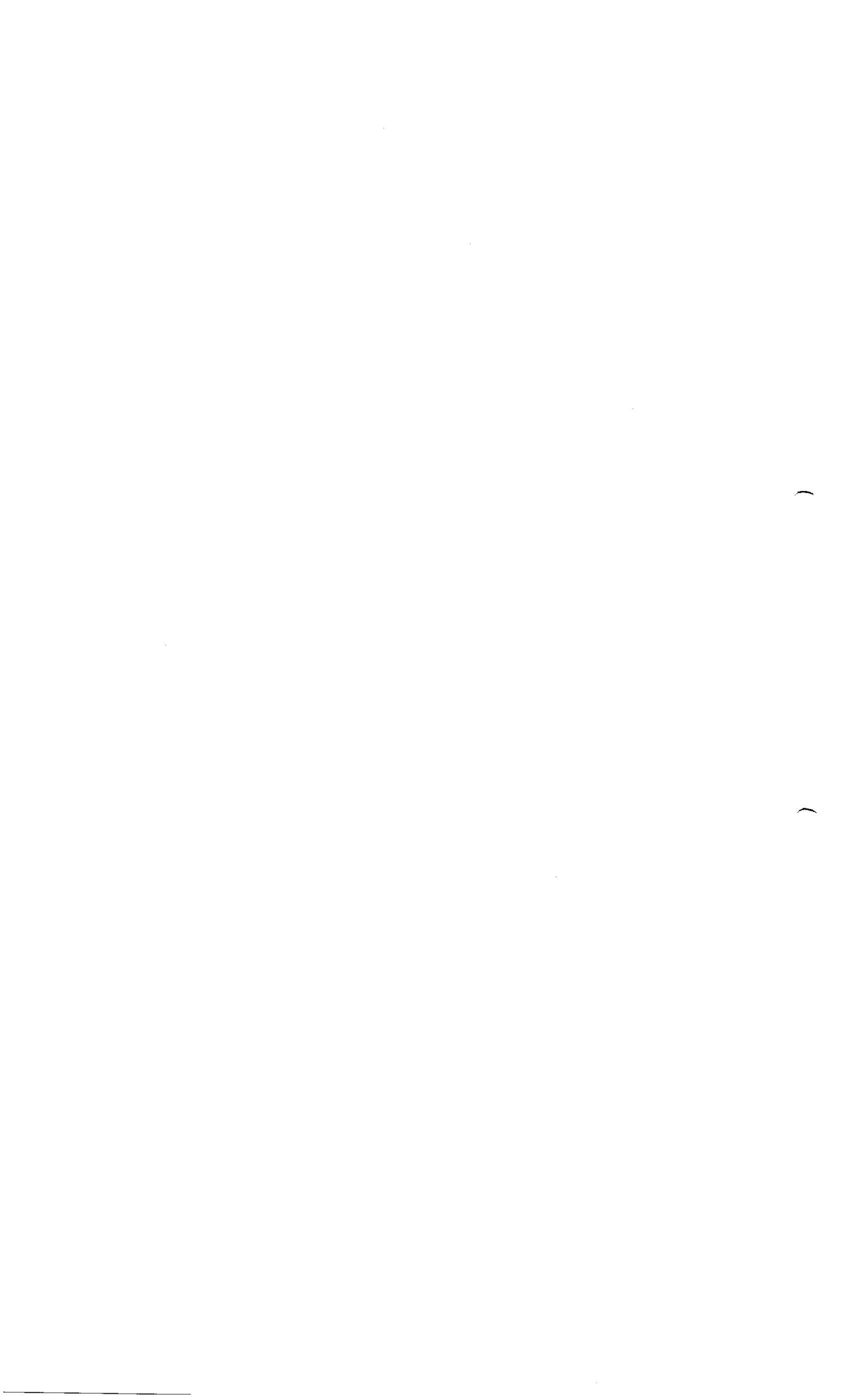
PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS

1. *Aspecto*: inspección visual.

2. *Contenido de antígeno D/ Identidad*: Según SOP n° C-082-vigente: "Determinación del contenido de antígeno D de poliovirus 1, 2 y 3 mediante un método ELISA"

CAIF SA
Dra. Bernarda Belay
Co-Directora Técnica
M.N. 15.148

CAIF
Compañía Argentina de
Investigaciones Farmacéuticas S.A.
Dra. Bernarda Belay
Apt. 1000
CNI 231.0023





Laboratorio CAIF, Compañía Argentina de Investigaciones Farmacéuticas S.A.
VAXIPOLIO, Suspensión inyectable
Vacuna antipoliomielítica inactivada



3. *pH*: medir la muestra utilizando un pH-metro previamente calibrado.

4. *Volumen extraíble*: Se controla sobre 5 viales. Con una jeringa de 1 ml con aguja 21G de 1" y ½ para cada vial, extraer individualmente todo el volumen posible, expulsar burbujas y pesar el contenido descargando en un recipiente tarado, sin vaciar la aguja. Asumiendo densidad = 1, el peso para cada vial no debe ser menor de 0.5 g.

5. *Contenido de proteínas*: Se calcula a partir del contenido de nitrógeno y se multiplica por 6.25 para obtener el contenido de proteína.
Para medir la concentración de nitrógeno proteico se utiliza el ensayo de determinación fotométrica de nitrógeno total por el método de Kjeldahl, previa precipitación de la proteína con ácido tricloroacético. Al final de la reacción se genera un color cuya absorción se determina fotométricamente a 590 nm.
Se utilizan como estándar una serie de soluciones de sulfato de amonio de 0-200 µmol/L

6. *Esterilidad*: Según SOP n° 01-06-039-vigente

7. *Endotoxinas Bacterianas*: Según SOP n° 01-06-040-vigente

CAIF SA
Dra. Bernarda Bejay
Co-Directora Técnica
M.N. 15.148

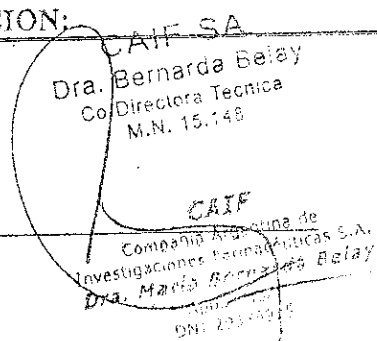
CAIF
Compañía Argentina de
Investigaciones Farmacéuticas S.A.
Dra. Maria Bernarda Bejay
Apoderada
CMI 201 0011



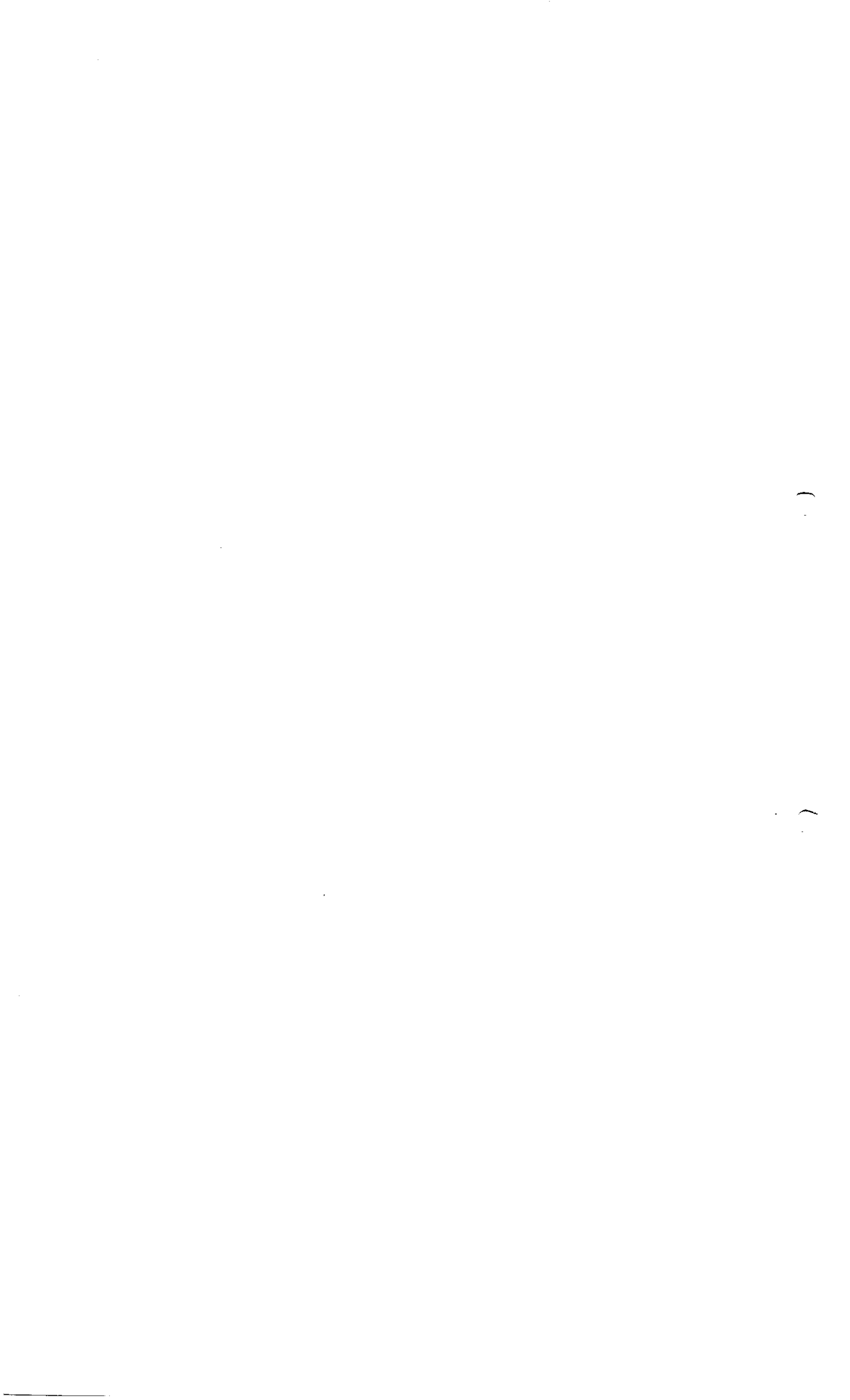
Procedimiento Operativo Estandar	
TITULO: DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ANTIGENO D DE POLIOVIRUS 1, 2 Y 3 MEDIANTE UN MÉTODO ELISA	
Numero: C- 082-01	Reemplaza a: -----
Fecha de emisión: 25/04/2013	Dto: Laboratorio.

<p>EMITE:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Supervisión de Control de Calidad <p>EVALUA IMPACTO:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Supervisión de Control de Calidad <p>VERIFICA Y PONE EN VIGENCIA:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Responsable operativo • Dirección Técnica <p>FECHA DE VIGENCIA:</p>

1° REVISION:	5° REVISION:
2° REVISION:	6° REVISION:
3° REVISION:	7° REVISION:
4° REVISION:	8° REVISION:


CAIF SA
 Dra. Bernarda Belay
 Co. Directora Técnica
 M.N. 15.148

CAIF
 Compañía Argentina de
 Investigaciones Tecnológicas S.A.
 Dra. María Bernarda Belay
 M.N. 15.148
 DNI: 23.000.015



Procedimiento Operativo Estandar	
TITULO: DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ANTIGENO D DE POLIOVIRUS 1, 2 Y 3 MEDIANTE UN MÉTODO ELISA	
Numero: C-082-01	Reemplaza a: -----
Fecha de emisión: 25/04/2013	Dto: Laboratorio.

OBJETIVO:

Disponer de un procedimiento para la determinación del contenido de antígeno D de poliovirus tipo 1, 2 y 3 presentes en la vacuna antipoliomielítica inactivada.

ALCANCE:

Todo el personal del Laboratorio de Análisis Biológicos.

RESPONSABILIDADES:

Es responsabilidad del personal del Laboratorio de Análisis biológicos conocer y aplicar lo expresado en este SOP.

Es responsabilidad del Jefe del Laboratorio de Análisis Biológicos, aplicar y entrenar al personal en todo lo referente a este SOP.

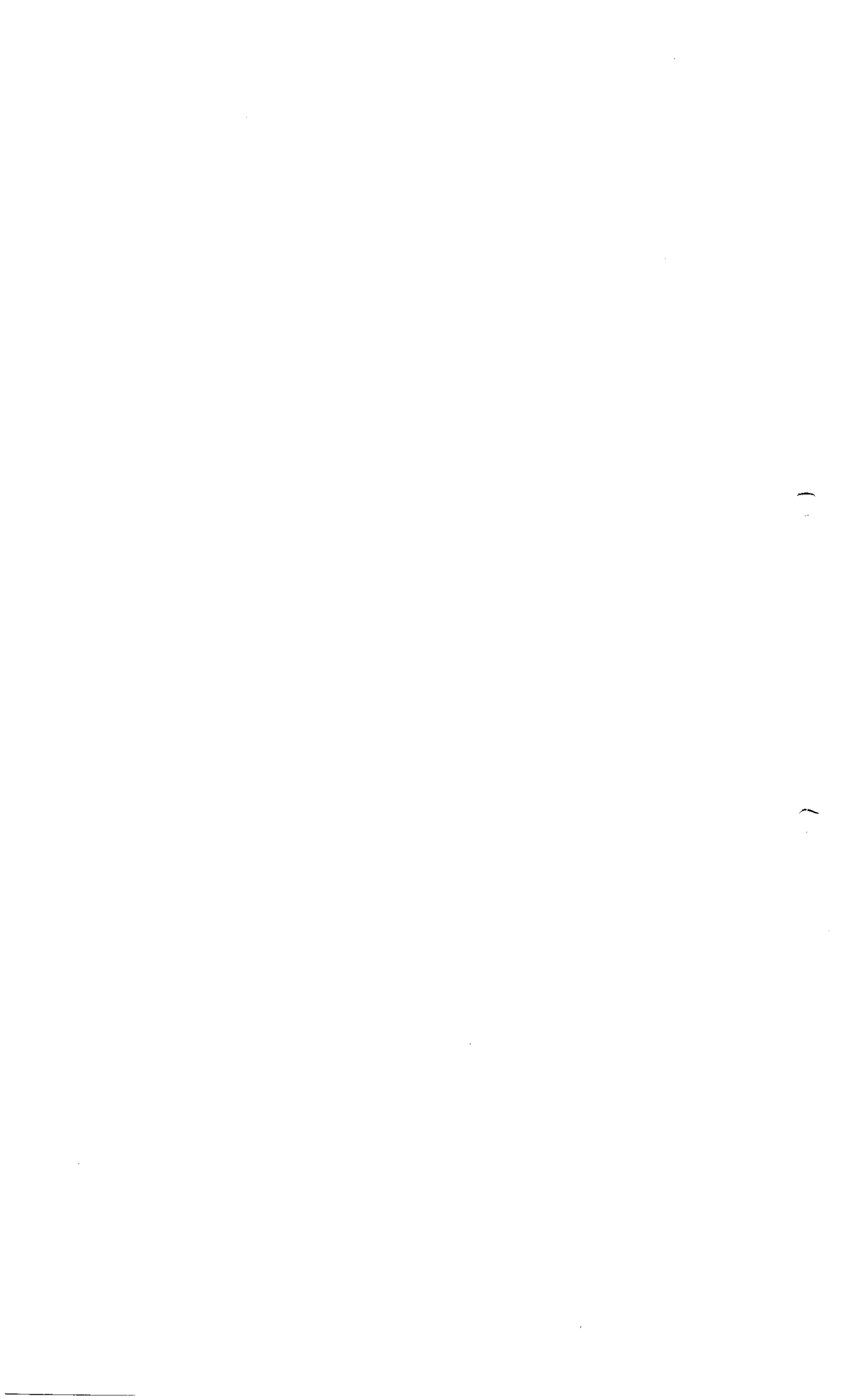
PROCEDIMIENTO

Se determina el contenido de antígeno - D de los tipos 1, 2 y 3 de poliovirus humano mediante el método de ELISA usando una preparación de referencia calibrada en Unidades de Farmacopea Europea de antígeno. Las unidades de Farmacopea Europea y las Unidades Internacionales son equivalentes.

Materiales de Referencia:

1. Estándar de referencia de polio para los tipos 1, 2 y 3 actual. ID:IPV08-143. Batch: IPV08-143 (Almacenar a -20°C). Calibrado contra el 2nd International Reagent 1994 Poliomyelitis Vaccine (inactivated) NIBSC CODE: 91/574. versión 02, dated 01 march 2004
2. Lote final IPV 785 B o equivalente. (Almacenar a -20°C)
3. Anticuerpo bovino anti polio tipo 1 (RIVM): ID: R62/Marianne o equivalente: diluir 1/100 (cubrimiento de placas). (Almacenar a -20°C)
4. Anticuerpo bovino anti polio tipo 2 (RIVN): ID: R1616/8280 Batch: 01/2001 o equivalente: diluir 1/100 (cubrimiento de placas). (Almacenar a -20°C)
5. Anticuerpo bovino anti polio tipo 3 (RIVM): ID: R1497/Betje. Batch: 01/2001. Diluir 1/100 (cubrimiento de placas). (Almacenar a -20°C)
6. Anticuerpo monoclonal (Moab) anti virus de poliomiélitis tipo 1 (RIVM). ID: 3-4-E4. Batch: 03/2002. Diluir 1/240. (Almacenar a -20°C)
7. Anticuerpo monoclonal (Moab) anti virus de poliomiélitis tipo 2 (RIVM). ID: 3-14-4. Batch: 03/2002. Diluir 1/240. (Almacenar a -20°C)

CAIF SA
Dra. Bernarda Belay
Co-Directora Técnica
M.N. 15.148
CAIF
Compañía Argentina de
Investigaciones Farmacéuticas S.A.
Dra. Bernarda Belay



Procedimiento Operativo Estandar	
TITULO: DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ANTIGENO D DE POLIOVIRUS 1, 2 Y 3 MEDIANTE UN MÉTODO ELISA	
Numero: C-082-01	Reemplaza a: -----
Fecha de emisión: 25/04/2013	Dto: Laboratorio.

8. Anticuerpo monoclonal (Moab) anti virus de poliomielitis tipo 3 (RIVM).ID:1-12-9. Batch: 03/2002. Diluir 1/240 . (Almacenar a -20°C)
9. Conjugado: Amersham ECL anti-mouse IgG, Horseradish peroxidase-linked species-specific hole antibody (from sheep). code:NA931 (reacción con Moab anti polio tipo 1, 2 y 3). (Almacenar entre 2 -8°C):

Materiales, Buffers y diluyentes

- Placas para ELISA MARCA MICROLON (Greiner bio-one.) o equivalente
- Albúmina sérica bovina, fracción V, pH 5.2. grado estándar, liofilizado. Marca Serva. Número de catalogo:11922 o equivalente.
- SureBlue TMB Microwell Peroxidase Substrate (1-component). Número de catalogo:52-00-02. (Almacenar entre 2-8°C)
- PBS 0.01 M , pH 7.2 (dilución del antisuero de recubrimiento)
- PBS 0.01 M pH 7.2 + 1% BSA buffer de bloqueo)
- PBS 0.01 M, pH 7.2 + 0.005% Tween (dilución de poliantígenos)
- PBS 0.01 M pH 7.2 + 0.005% Tween + 1 % BSA (dilución de anticuerpos monoclonales y conjugados).
- PBS 0.01 M, pH 7.2 + 0.05% Tween (buffer de lavado)
- Solución de Tetramethylbenzidina (TMB)
- Ácido sulfúrico 0.2 M

Para el antisuero bovino antipolio , los anticuerpos monoclonales y el conjugado, la dilución utilizada es determinada mediante un ensayo de dosis respuesta cada vez que un nuevo batch de reactivo es usado.

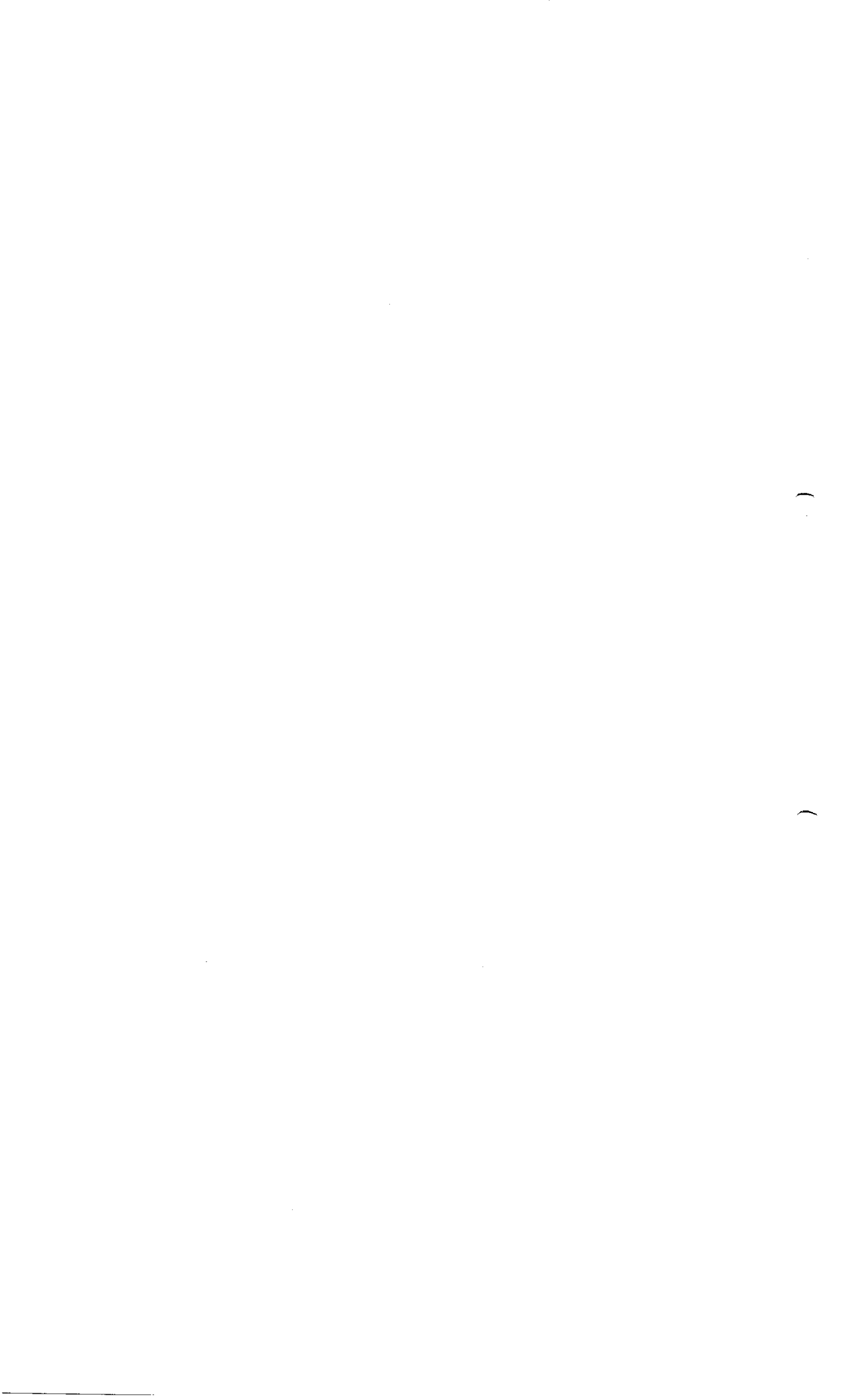
Procedimiento de ELISA

Las muestras son probadas en paralelo contra una preparación de referencia para determinar la curva de calibración

1. Recubrimiento y bloqueo de la placa

Diluir el anticuerpo bovino antipolio (1, 2 o 3) en una relación 1/100 en PBS 0.01 M, pH 7.2. (Para una placa colocar 120 ul de anticuerpo en 1880 ul de buffer de dilución de antisuero de recubrimiento).

CAIF SA
Dra. Bernarda Belay
Co-Directora Técnica
M.N. 15.148
CAIF
Compañía Argentina de
Investigaciones Farmacéuticas S.A.
Dra. María Bernarda Belay
Abogado
DNI 29.176.325



Procedimiento Operativo Estandar	
TITULO: DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ANTIGENO D DE POLIOVIRUS 1, 2 Y 3 MEDIANTE UN MÉTODO ELISA	
Numero: C-082-01	Reemplaza a: -----
Fecha de emisión: 25/04/2013	Dto: Laboratorio.

Colocar 100 ul de esta dilución en cada uno de los pocillos utilizando una pipeta multicanal.

Sellar la placa

Dejar incubar en un ambiente húmedo overnight

Al día siguiente: escurrir la placa , resellar y guardar a -80°C para su posterior uso.

Escurrir la placa.

Lavar la placa con un volumen de lavado de 1.1 ml por pocillo en una lavadora de placas. o 5 lavados de 300 ul cada uno utilizando una pipeta multicanal.

Trabajar siempre la placa sobre un paño humedecido.

Escurrir la placa

Colocar 150 ul de la solución de bloqueo (PBS 0.01 M pH 7.2 + 1% BSA buffer de bloqueo) en cada pocillo

Incubar la placa durante un mínimo de 30 minutos a 37 °C.

Durante este tiempo preparar las diluciones del estándar y las muestras de acuerdo a la siguiente guía:

Preparación del lote final de IPV(Muestra para propósitos de control del ensayo), estándar de referencia de polio y muestras

El estándar de referencia de polio es diluido 1/25 y el lote final de IPV para control del ensayo es diluido al 1/2 en PBS 0.01 M, pH 7.2 + 0.005% Tween 80. Las muestras son diluidas a una concentración equivalente al estándar de referencia de polio. Todas las muestras son diluidas con el buffer de dilución de antígenos. Todas las muestras son testeadas en duplicado.

Pasado el tiempo de incubación :

Lavar la placa y escurrir de acuerdo al protocolo de lavado

Colocar 100 ul de PBS 0.01 m, pH 7.2 + 0.005% Tween (dilución de poli antígenos) en todos los pocillos desde la fila B hasta la fila H.

Colocar 200 ul de las diluciones de antígeno en la fila A de acuerdo a la hoja del protocolo del ensayo

Transferir 100 ul de las mismas diluciones a la fila B y mezclar.

Transferir 100 ul de la fila B a la siguiente fila y mezclar 5 veces

Repetir la operación hasta llegar a la fila G.

CAIF SA
Dra. Bernarda Belay
Co-Directora Técnica
M.N. 15.148

CAIF
(Compañía Argentina de
Investigaciones Farmacológicas S.A.)
Dra. Maria Bernarda Belay
Resolución
DNI 15.148.148



Procedimiento Operativo Estandar	
TITULO: DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ANTIGENO D DE POLIOVIRUS 1, 2 Y 3 MEDIANTE UN MÉTODO ELISA	
Numero: C-082-01	Reemplaza a: -----
Fecha de emisión: 25/04/2013	Dto: Laboratorio.

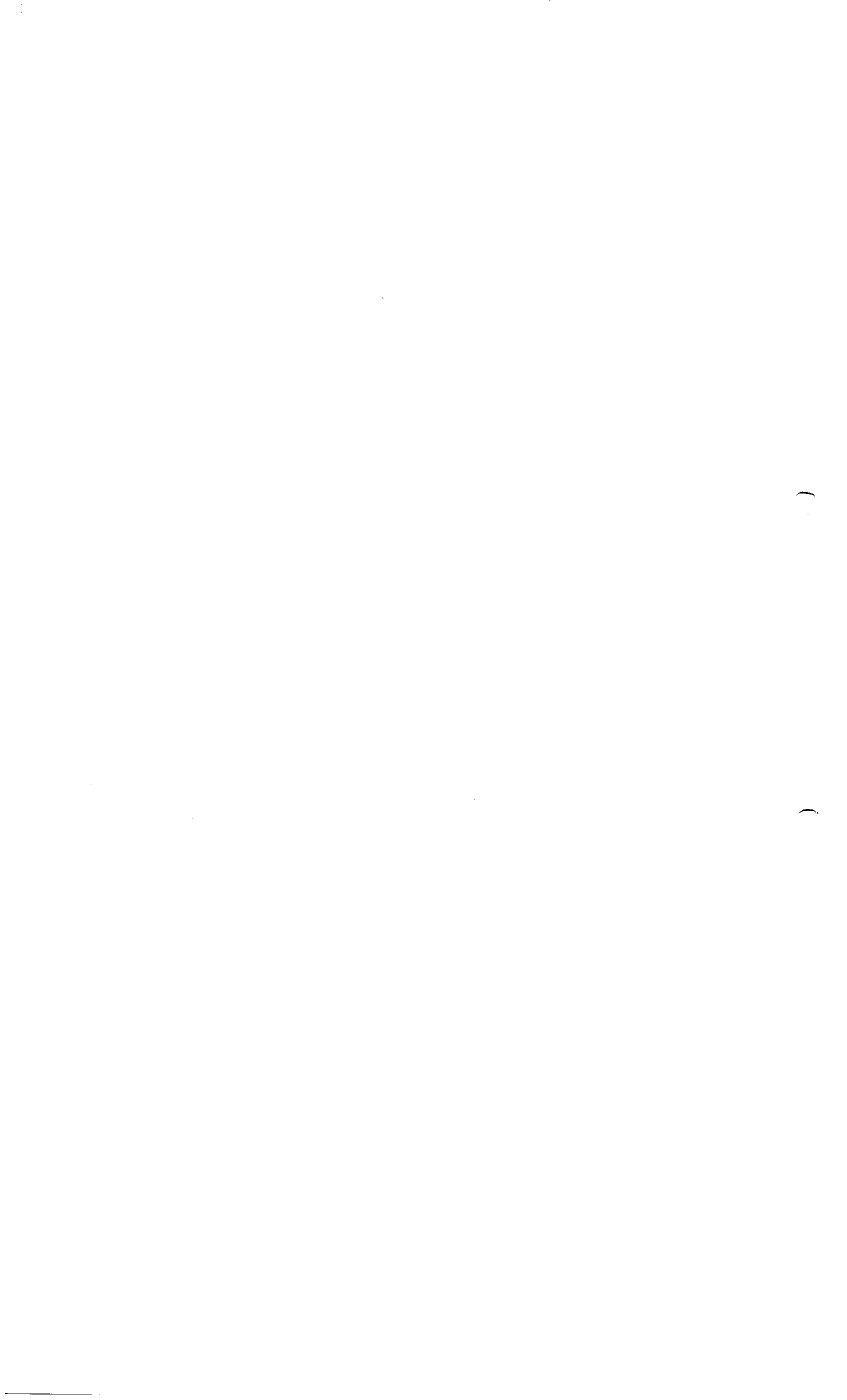
Mezclar y descartar 100 ul.
 Sellar la placa
Incubar durante 2 horas a 37 °C
Incubar a 5°C overnight
 La fila H sirve como blanco.
 Durante este tiempo realizar una dilución 1/240 del anticuerpo monoclonal específico (1,2 o 3) en PBS 0.01 M pH 7.2 +0.005% Tween 80 + 1 % BSA (dilución de anticuerpos monoclonales y conjugados).
 Para una placa diluir 50 ul de anticuerpo monoclonal en 11950 ul de buffer
 Lavar la placa de acuerdo al protocolo de lavado
 Colocar 100 ul de la dilución de monoclonal específico en cada uno de los pocillos
 Sellar la placa
Incubar la placa durante 1 hora a 37 °C
 Durante este tiempo preparar la dilución de trabajo de anticuerpo anti IgG de ratón marcado con peroxidasa colocando 6 ul de conjugado en 11994 ul de PBS 0.01 M pH 7.2 + 0.005% Tween + 1 % BSA (dilución de anticuerpos monoclonales y conjugados).
 Lavar la placa y escurrir de acuerdo al protocolo de lavado (dilución 1/2000)
 Colocar 100 ul de la dilución de conjugado en cada pocillo de la placa
 Sellar la placa
Incubar la placa durante 1 hora a 37 °C
 Lavar la placa de acuerdo al protocolo de lavado
 Colocar 100 ul de solución de sustrato en cada pocillo
 Incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente
 Se debe desarrollar un color azul
 Parar la reacción con 100 ul de acido sulfúrico 2 N
 Leer la placa en un lector de placas a 450 nm

Calcular los valores de DU/ml (DU: Unidades de antígeno D) de las muestras utilizando el método estadístico de ajuste de cuatro parámetros utilizando un programa conveniente para tal fin : Ej Combistats

RESULTADOS

CAIF SA
 Dra. Bernarda Belay
 Co-Directora Técnica
 M.N. 18.146

CAIF
 Compañía Argentina de
 Investigaciones Farmacéuticas S.A.
 Dra. María Bernarda Belay
 DNI 29.186.75



Procedimiento Operativo Estandar	
TITULO: DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ANTIGENO D DE POLIOVIRUS 1, 2 Y 3 MEDIANTE UN MÉTODO ELISA	
Numero: C-082-01	Reemplaza a: -----
Fecha de emisión: 25/04/2013	Dto: Laboratorio.

VALIDEZ DE LA PRUEBA

Controlar que el ensayo cumple con los siguientes criterios:

- El valor de R2 del estándar y del control de muestra es mayor o igual a 0.990
- La dispersión promedio de los residuales del estándar está entre -10% y +10%
- La dispersión de los residuales del estándar es menor o igual a 20%.
- Los valores de DU/ml del control interno se encuentra dentro de 2 SD de los datos de tendencia
- Además llevar un control de la muestra control en cuanto a :
 1. El valor cae dentro del área de +/- 3 SD
 2. El valor no debe caer fuera del área de 2 SD para dos pruebas consecutivas
 3. El rango entre el valor y el valor previo es más pequeño que 4 SD
 4. El valor no debe caer fuera del área de 1SD para cuatro pruebas consecutivas.
 5. El valor no debe caer sobre un solo lado del promedio para 10 ensayos consecutivos)

VALIDEZ DE LA MUESTRA

Controlar que cada muestra cumple con los siguientes criterios:

- Los valores de R2 son mayores o iguales de 0.990
- La dispersión de los duplicados es menor o igual a 20%.

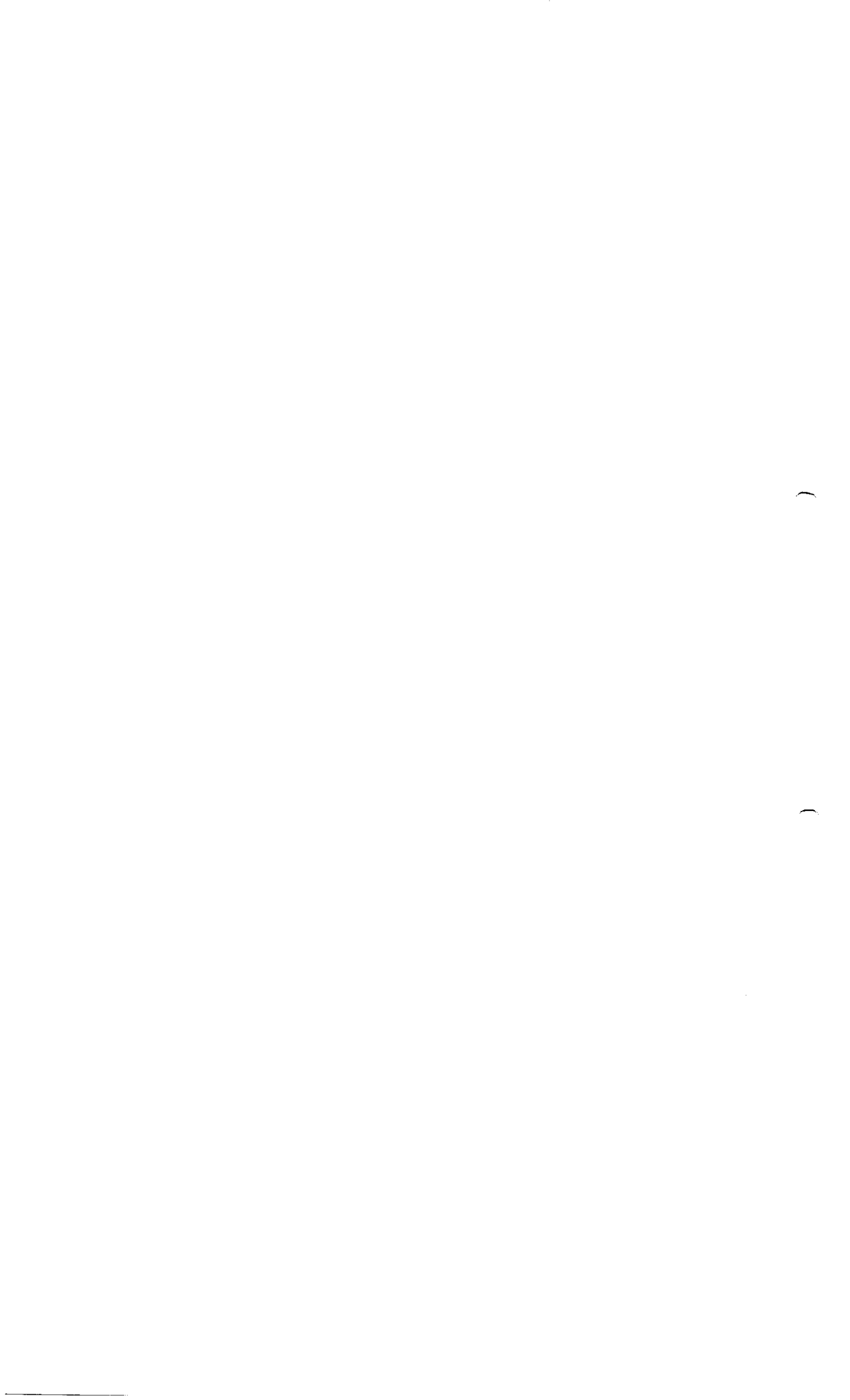
Controlar que cada muestra cumple con las especificaciones para el producto:

- La potencia de la vacuna IPV debe cumplir:
 Para antígeno D del virus de poliomieltis tipo 1: \geq a 30 DU/ 0.5 ml
 Para antígeno D del virus de poliomieltis tipo 2: \geq a 6 DU/ 0.5 ml
 Para antígeno D del virus de poliomieltis tipo 3: \geq a 24 DU/ 0.5 ml

REFERENCIAS:

- Analytical procedures 3.2s.s4.2 .Bilthoven Biologicals B.V.IPV/NC/AR/05/P2
- European Pharmacopoeia 7.0

CAIF 05/P2
 Dra. Bernarda Belay
 Co-Directora Técnica
 M.N. 15.148
 CAIF
 Comisión Venezolana de Normalización Tecnológica S.A.
 Dra. Bernarda Belay



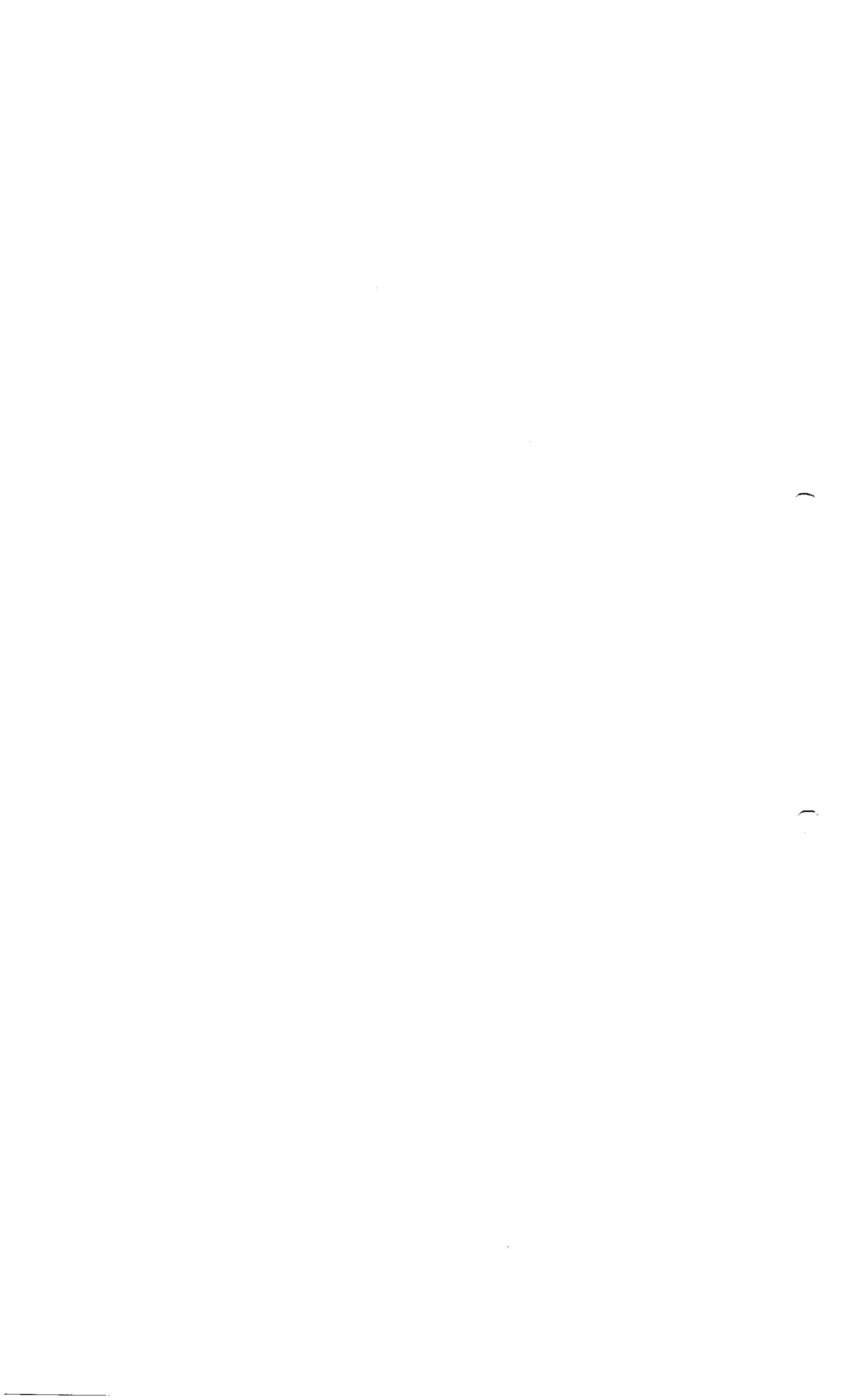
Procedimiento Operativo Estandar	
TITULO: DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ANTIGENO D DE POLIOVIRUS 1, 2 Y 3 MEDIANTE UN MÉTODO ELISA	
<i>Numero:</i> C-082-01	<i>Reemplaza a:</i> -----
<i>Fecha de emisión:</i> 25/04/2013	<i>Dto:</i> Laboratorio.

- WHO Technical reports series, N° 910.2002. annex 2: recomendations for the production and control of poliomyelitis vaccine (inactivated)


MOTIVO DEL CAMBIO: Nuevo

CAIF SA
Dra. Bernarda Belay
Co-Directora Técnica
M.N. 15.148

CAIF
Compañía Argentina de
Investigaciones Farmacéuticas S.A.
Dra. Maria Bernarda Belay
Aprobada
DNI 29378925





	Vacuna antipoliomielítica inactivada, suspensión inyectable, Bilthoven Biologicals B.V.	IPV/NC/AR/09-12 Página 1 de 8
Control de calidad y datos de estabilidad		

Especificaciones del producto farmacéutico

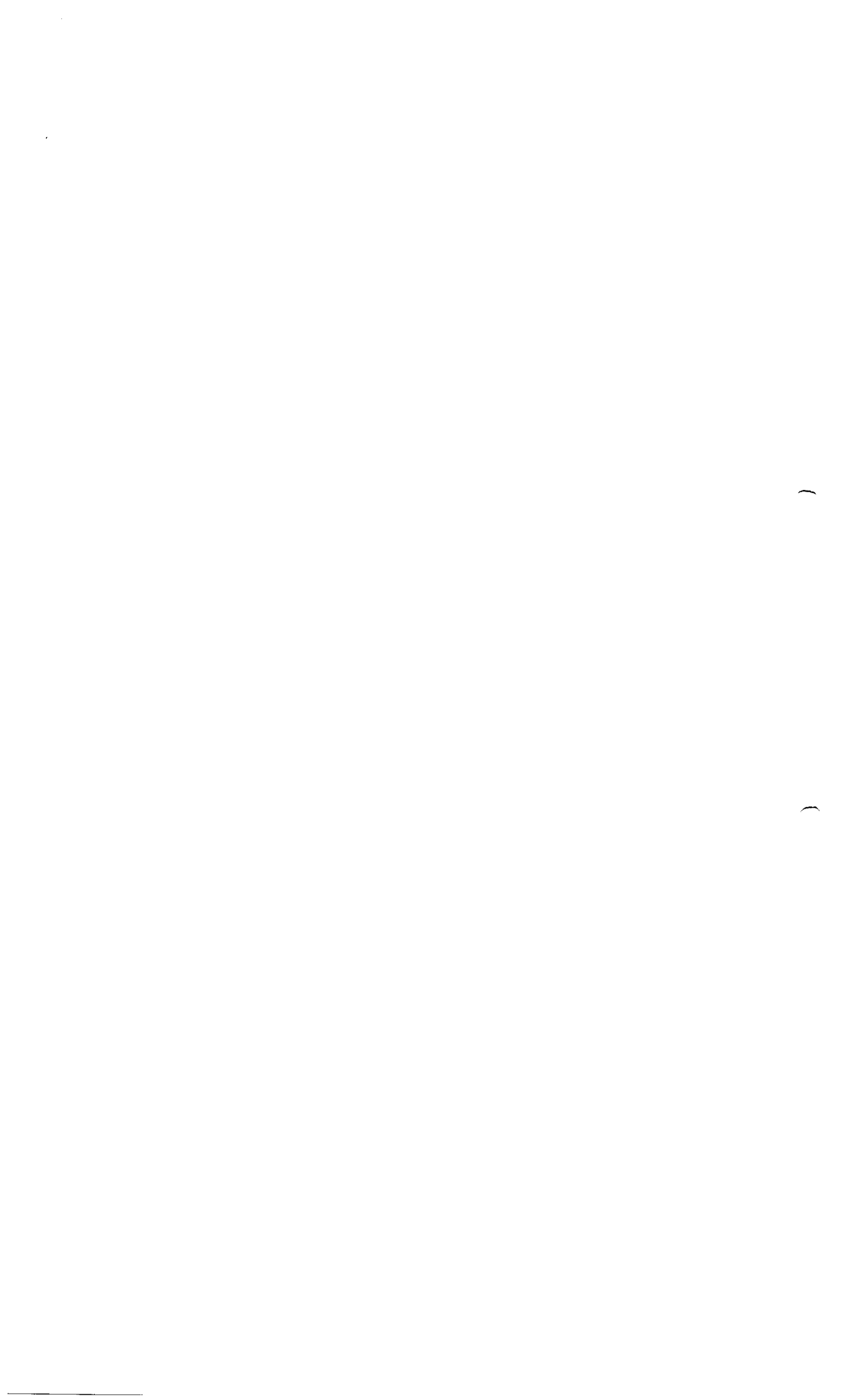
Las especificaciones del producto farmacéutico se describen en la tabla 1.

Tabla 1: Especificaciones de la vacuna antipoliomielítica inactivada (VPI)


Especificación	Requisito
Apariencia	solución transparente de color rojo anaranjado
Contenido de antígeno D/identidad	virus poliomielítico tipo 1: como mínimo 75 % (30 UD/dosis para humanos)
	virus poliomielítico tipo 2: como mínimo 75 % (6 UD/dosis para humanos)
	virus poliomielítico tipo 3: como mínimo 75 % (24 UD/dosis para humanos)
Esterilidad	pasa la prueba
Proteínas	$\leq 20 \mu\text{g/ml}$ ($\leq 10 \mu\text{g/dosis}$ para humanos)*
Endotoxinas	$\leq 5 \text{ UI/dosis}$ para humanos
pH	6,8-7,4
Volumen extraíble	$\geq 0,5 \text{ ml}$

* Las proteínas se calculan a partir del nitrógeno proteico medido en el granel trivalente.

CAIF SA
Dra. Bernarda Belay
Co-Directora Técnica
M.N. 15.148
CAIF
Compañía Argentina de
Investigaciones Farmacéuticas S.A.
Dra. María Bernarda Belay
Apoderada
DNI 29378925





	Vacuna antipoliomielítica inactivada, suspensión inyectable, Bilthoven Biologicals B.V.	IPV/NC/AR/09-12 Página 2 de 8
Control de calidad y datos de estabilidad		

Procedimientos analíticos del producto farmacéutico

Las descripciones de los métodos de prueba se incluyen en los siguientes documentos:

1. pH

El pH se mide de acuerdo con la Farmacopea Europea.

2. Apariencia

La apariencia se observa visualmente.

3. Endotoxinas

Para determinar las endotoxinas bacterianas, se utiliza el método cromogénico cinético. La prueba se realiza de acuerdo con la Farmacopea Europea.

4. Nitrógeno proteico

[IPVV.3.2.S.2.4.protein nitrogen.02.pdf](#)

El contenido proteico en el lote final de la VPI se calcula a partir del contenido de nitrógeno proteico medido en el granel trivalente. El contenido de nitrógeno proteico del granel trivalente se multiplica por 6,25 para calcular el contenido proteico del granel trivalente y luego se divide por 5 (el factor de dilución) para calcular el contenido proteico del lote final.

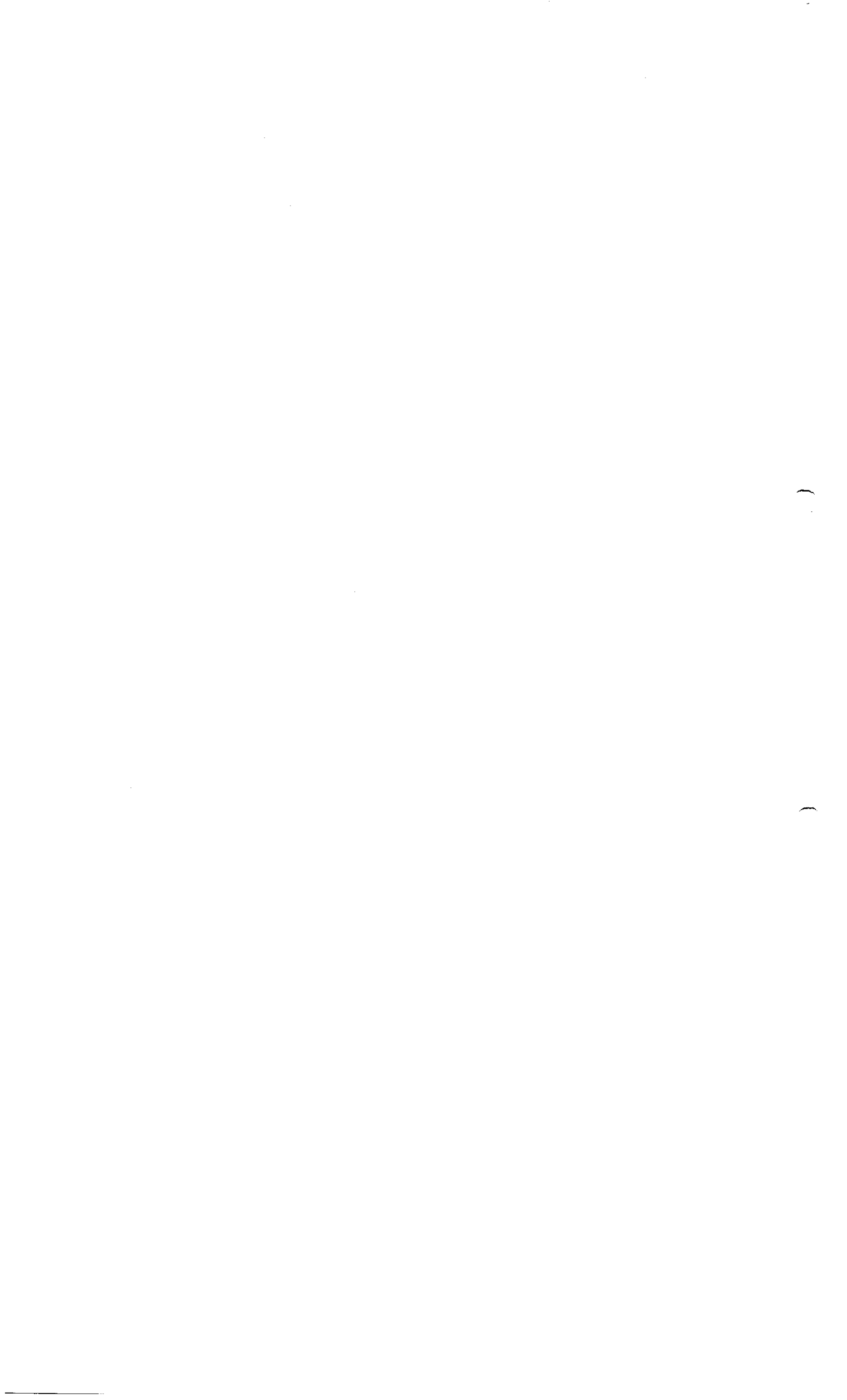
5. Esterilidad

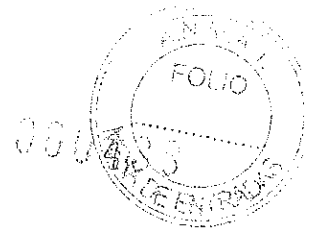
La esterilidad del producto se determina de acuerdo con la Farmacopea Europea.


6. Determinación/prueba del antígeno D

CAIF SA
Dra. Bernarda Belay
Co-Directora Técnica
M.N. 15.148

CAIF
Compañía Argentina de
Investigaciones Farmacéuticas S.A.
Dra. ~~Hertha Bernarda Belay~~
Buenos Aires
DNI: 23.319.975





	Vacuna antipoliomielítica inactivada, suspensión inyectable, Bilthoven Biologicals B.V.	IPV/NC/AR/09-12 Página 3 de 8
Control de calidad y datos de estabilidad		

Determinación del contenido de antígeno D (prueba del antígeno D) e identidad

La determinación del contenido de antígeno D y la prueba de identidad del tipo de poliovirus se realizan según el método inmunológico (ELISA) descrito en la Farmacopea Europea.

El ensayo consiste en un procedimiento de 5 pasos:

1. Los pocillos de un sistema de microprueba se cubren con antisuero bovino contra el tipo específico de poliovirus.
2. El antígeno del tipo específico de poliovirus se adhiere a los pocillos recubiertos.
3. Los anticuerpos monoclonales de ratones contra el tipo específico de poliovirus se unen al antígeno adherido.
4. Los conjugados de oveja antiinmunoglobina de ratón marcados con peroxidasa se adhieren a los anticuerpos monoclonales de ratón.
5. La tetrametilbencidina (TMB) es un sustrato para la peroxidasa y produce una reacción colorimétrica.

Para la prueba se utilizan los siguientes materiales de referencia:

— Vacuna antipoliomielítica trivalente PU 91-01 de referencia con virus poliomiéltico tipo 1 (430 UD/ml), virus poliomiéltico tipo 2 (95 UD/ml) y virus poliomiéltico tipo 3 (285 UD/ml). Consulte el Módulo 3.2.P.6.0: Material de referencia.

— Estándar interno de poliovirus simple 785 B. Consulte el Módulo 3.2.P.6.0: Material de referencia.

Para la prueba también se utilizan los siguientes materiales:


- Bovino contra el poliovirus tipo 1: R62 (fuente: RIVM)
- Bovino contra el poliovirus tipo 2: R1616 (fuente: RIVM)
- Bovino contra el poliovirus tipo 3: R1497 (fuente: RIVM)
(recubrimiento de las placas)

CAIF SA
Dra. Bernarda Belay
Co-Directora Técnica
M.N. 15.146

CAIF
Compañía Argentina de
Investigaciones Farmacológicas S.A.
Dra. María Bernarda Belay
Apdo. 205
BNT 2937892





	Vacuna antipoliomielítica inactivada, suspensión inyectable, Bilthoven Biologicals B.V.	IPV/NC/AR/09-12 Página 4 de 8
Control de calidad y datos de estabilidad		

Anticuerpos monoclonales contra el poliovirus (MoAb): Contra el virus poliomiéltico tipo 1, tipo 2 o tipo 3

- Tipo 1: 3-4E4 (fuente: RIVM)
- Tipo 2: 3-14-4 (fuente: RIVM)
- Tipo 3: 1-12-9 (fuente: RIVM)

(reacción con el antígeno D)

— Conjugado: de oveja antiinmunoglobina de ratón, marcado con peroxidasa de rábano

(reacción con anticuerpos monoclonales contra el poliovirus tipo 1, 2 y 3)

— Soluciones amortiguadoras y diluyentes:

- PBS 0,01 M, pH 7,2 (dilución de antisuero bovino contra el poliovirus para el recubrimiento)
- PBS 0,01 M, pH 7,2 + 1 % BSA (solución amortiguadora de bloqueo)
- PBS + 0,005 % Tween (dilución de antígenos del poliovirus)
- PBS + 0,005 % Tween + 1 % BSA (dilución de anticuerpos monoclonales y de conjugados)
- PBS 0,01 M, pH 7,2 + 0,05 % Tween (solución de lavado)

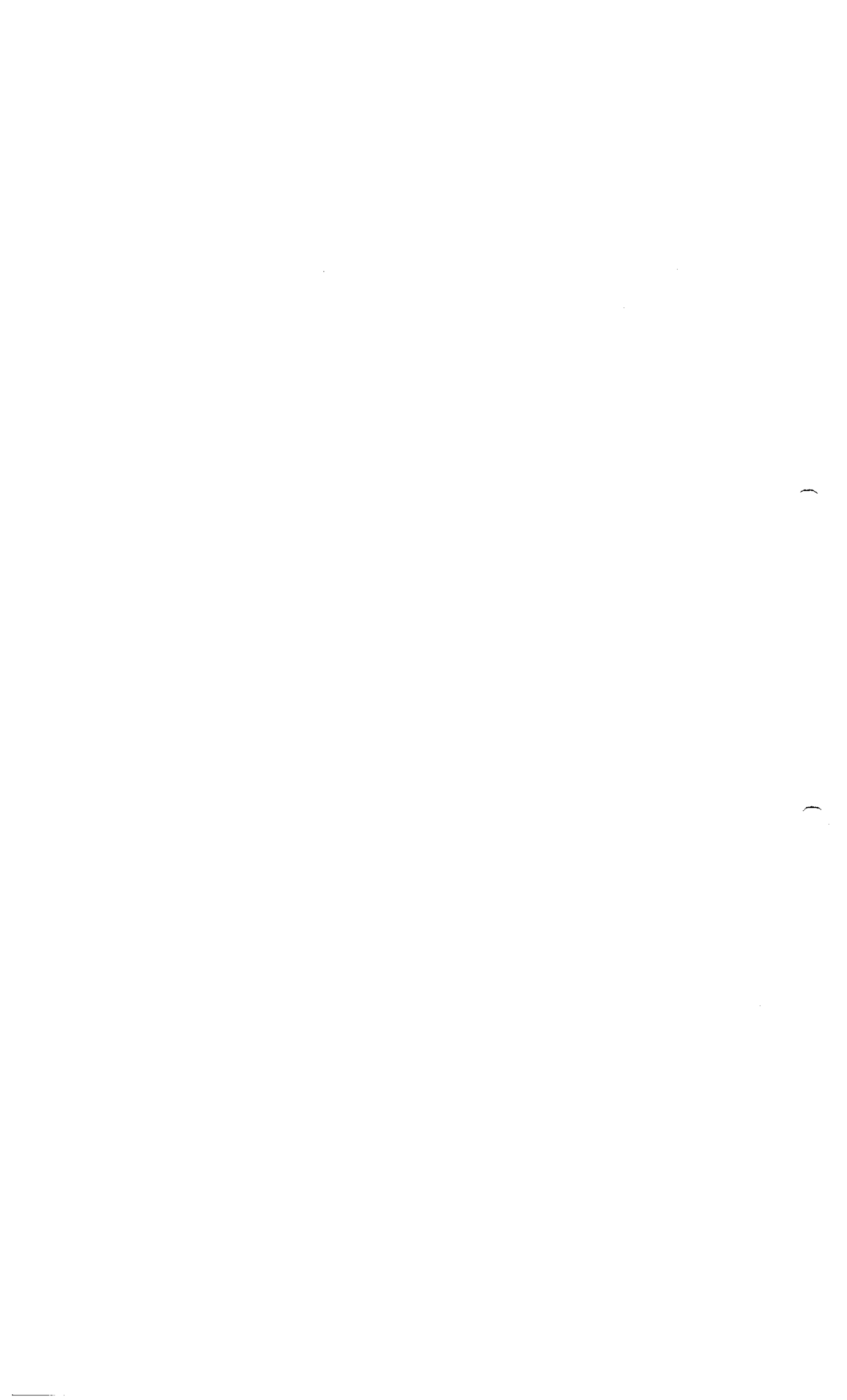
— Solución de tetrametilbencidina (TMB) (300 mg en 50 ml de etanol al 95 %)

— H₂SO₄ (0,2 M)


Para el antisuero bovino contra el poliovirus, los anticuerpos monoclonales y los conjugados, la dilución práctica real se determina mediante una curva de respuesta según la dosis cada vez que se utiliza un nuevo lote.

CAIF SA
Dra. Bernarda Belay
Co-Directora Técnica
M.N. 15.148

CAIF
Compañía Argentina de
Investigaciones Farmacéuticas S.A.
Dra. ~~Marta~~ Bernarda Belay
Apodada
DNI 23376925





	Vacuna antipoliomielítica inactivada, suspensión inyectable, Bilthoven Biologicals B.V.	IPV/NC/AR/09-12 Página 5 de 8
Control de calidad y datos de estabilidad		

Procedimiento ELISA:

Las muestras se someten a pruebas junto con una preparación de referencia para establecer una línea de calibración.

1. Recubrimiento y bloqueo de las placas

Los pocillos de las placas se cubren con antisuero bovino contra el tipo específico de poliovirus y se incuban durante la noche a temperatura ambiente. Las placas se lavan con solución de lavado. Luego, las placas se bloquean con solución de bloqueo y se incuban, como mínimo, durante 30 minutos a 37° y se vuelven a lavar.

2. Preparación del estándar interno, la vacuna de referencia y las muestras:

La referencia se diluye a 1:25 y el estándar interno se diluye a 1:2. Las muestras se diluyen a una concentración equivalente a la referencia. Todas las muestras se diluyen con solución de dilución de antígenos. Todas las muestras se someten a pruebas por duplicado.

3. Incubación de antígenos

La vacuna de referencia, el estándar interno y las muestras se diluyen con una serie de diluciones 1:2 en la placa ELISA, con una hilera llena de solución de dilución de antígenos como control negativo. La placa se incuba durante 2 horas a 37 °C y luego se incuba durante la noche a 4 °C.

4. Incubación monoclonal

Las placas se lavan con solución de lavado y luego se incuban con anticuerpos monoclonales de ratones contra el tipo específico de poliovirus durante 2 horas a 37 °C.

5. Incubación de conjugados

Las placas se lavan con solución de lavado y luego se incuban con conjugados de oveja antiinmunoglobulina de ratón, marcados con peroxidasa de rábano, durante 1 hora a 37 °C.


6. Coloración de las placas

Las placas se lavan con solución de lavado y la solución de sustrato (TMB) se agrega a los pocillos. Después de 10 minutos de incubación, se agrega H₂SO₄ para detener la reacción. Las absorbancias se miden a 450 nm.

CAIF SA
Dra. Bernarda Belay
Directora Técnica
CAIF
Compañía Argentina de Investigaciones Farmacéuticas S.A.
Dra. Bernarda Belay





	Vacuna antipoliomielítica inactivada, suspensión inyectable, Bilthoven Biologicals B.V.	IPV/NC/AR/09-12 Página 6 de 8
Control de calidad y datos de estabilidad		

Cálculo

El cálculo de la concentración de antígeno D se realiza con el método de ajuste de 4 parámetros. Las concentraciones de antígeno D en las muestras se calculan en UD/ml y se basan en los resultados de la curva de calibración de referencia. La referencia genera una curva sigmoidea con una zona lineal donde la concentración de referencia se determina en relación con las absorbancias obtenidas. Esta región lineal se utiliza para calcular la concentración de antígeno D (UD/ml) en las muestras. Las absorbancias de las muestras que entran en esta región se convierten a concentraciones de antígeno D mediante el programa de cálculo KC Junior.

Criterios de validez

La concentración de antígeno D para cada tipo de poliovirus se calcula sobre la base de los resultados de un ensayo válido.

El ensayo es válido si se cumplen los siguientes criterios:

1. El coeficiente de correlación de la línea de calibración de la vacuna de referencia y el estándar interno es $\geq 0,990$.
2. El coeficiente de variación del resultado final para el estándar interno es $\leq 20\%$.
3. El estándar interno cumple los criterios del seguimiento de tendencias. Por ejemplo:
 - El valor está dentro del área de ± 3 DE.
 - El valor no debe estar fuera del área de ± 2 DE en dos pruebas consecutivas.
 - El margen entre el valor actual y el anterior es menor de 4 DE.
 - El valor no debe estar fuera del área de ± 1 DE en cuatro pruebas consecutivas.
 - El valor no debe estar de un lado del promedio en diez pruebas consecutivas.
4. La desviación promedio de los residuales (absorbancias del estándar recalculadas con la curva ajustada) debe estar entre -10% y 10% , con un margen máximo de 20% .


La muestra de prueba es válida si se cumplen los siguientes criterios:

1. El coeficiente de correlación para cada muestra es $\geq 0,990$. El coeficiente de variación del resultado final promedio para las muestras es $\leq 20\%$.

CAIF SA
Co-Directora Técnica
M.N. 15.148
CAIF
Compañía Argentina de
Investigaciones Farmacológicas S.A.
Dra. Alicia Baranda Belay





	Vacuna antipoliomielítica inactivada, suspensión inyectable, Bilthoven Biologicals B.V.	IPV/NCI/AR/09-12 Página 7 de 8
Control de calidad y datos de estabilidad		

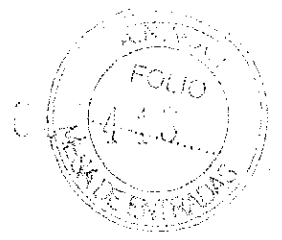
7. Volumen extraíble


El volumen extraíble se somete a pruebas de acuerdo con la Farmacopea Europea.

CAIF SA
Dra. Bernarda Belay
Co-Directora Técnica
M.H. 15.148

CAIF
Compañía Argentina de
Investigaciones Farmacéuticas S.A.
Dra. María Bernarda Belay
Apostada
M.H. 15.148





	Vacuna antipoliomielítica inactivada, suspensión inyectable, Bilthoven Biologicals B.V.	IPV/NC/AR/09-12 Página 8 de 8
Control de calidad y datos de estabilidad		

Datos de estabilidad

Producto farmacéutico de la VPI

Resultados de estabilidad de la VPI a escala de producción:

En este momento, existe un estudio de estabilidad en curso, en el que se investiga la estabilidad del lote final de la VPI, fabricado a escala de producción y presentado en viales con tapones de goma FM457. Los resultados se describen en los apéndices: [Stability report IPV in vials with FM457 stopper.01.pdf](#).

CAIF SA
Dra. Bernarda Belay
Co-Directora Técnica
M.N. 16.148

CAIF
Compañía Argentina de
Investigaciones Farmacéuticas S.A.
Dra. María Bernarda Belay
Acreditada
DNI 23376925

