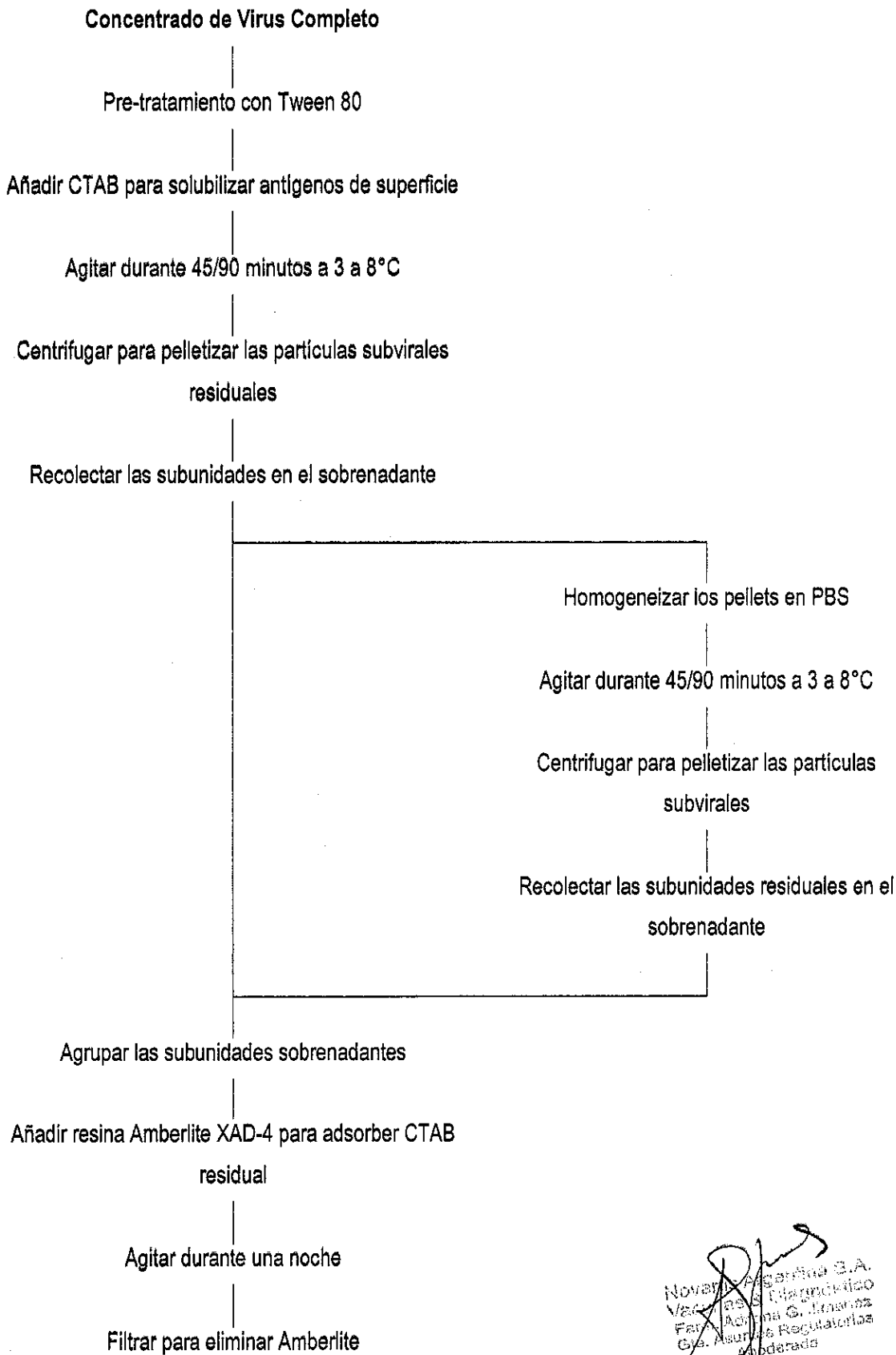
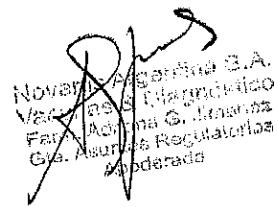


**Virus Concentrado Completo**  
(10 a 60 litros)

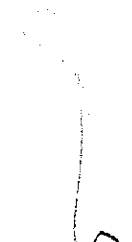
**Método de solubilización con Bromuro de Cetiltrimetilamonio (CTAB)**

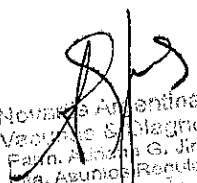


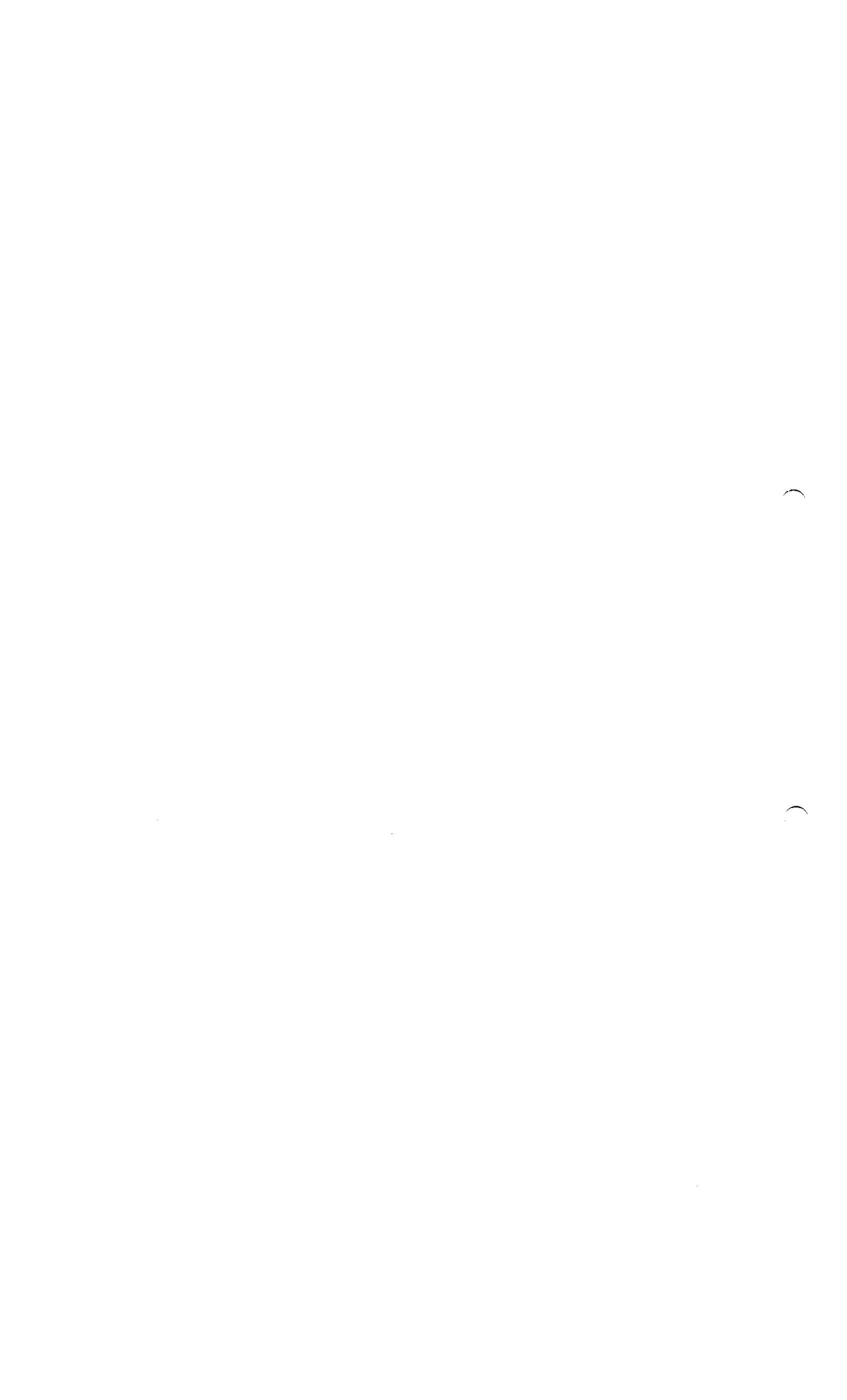
  
Novartis Argentina S.A.  
Vacunas y Productos Biológicos  
Farm. Adriana G. Maronez  
Cte. Asuntos Regulatorios  
Buenos Aires





  
Novartis Argentina S.A.  
Farm. Elsa Orosa  
Co-Directora Técnica - M.N. 15.576  
Gte. de Asuntos Regulatorios  
Apoderada

  
Novartis Argentina S.A.  
Ved. Lic. S. Magnifico  
Farm. Andres G. Jimenez  
Gte. Asuntos Regulatorios  
Apoderada



### **Producción de Semilla Maestra y de Trabajo**

La producción y análisis de semillas está de acuerdo con los requerimientos de OMS y Ph.Eur. Las Semillas Maestra y de Trabajo se cultivan en huevos Libres de Patógenos Específicos (SPF).

### **Preparación de Semilla Maestra**

Cada lote de Semilla Maestra se prepara en un área exclusiva de producción de semilla de influenza (bajo condiciones de flujo laminar) a partir de un solo vial de cepa primaria del virus congelado o liofilizado obtenida del NIBSC o de un centro de referencia de influenza aprobado por la OMS. La semilla congelada se transporta a Siena con hielo seco. La cepa viral primaria, dependiendo del título inicial, puede diluirse de  $10^{-1}$  a  $10^{-8}$  con solución salina con buffer fosfato (PBS) de pH 8,0 que contiene sulfato de kanamicina y sulfato de neomicina, estos antibióticos son de calidad Ph.Eur.

Al menos cuatro diluciones  $\log_{10}$  consecutivas de semilla viral son inoculadas en huevos SPF preincubados controlados por observación al trasluz (0,2 ml/huevo), se utilizan de 5 a 10 huevos por dilución. Los huevos se incuban luego a una temperatura de referencia adecuada para el crecimiento de virus específicos dentro del rango de  $32^{\circ}\text{C}$  a  $36^{\circ}\text{C}$  ( $34 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) durante 2 o 3 días antes de la refrigeración a  $2$  a  $8^{\circ}\text{C}$  durante 12 a 24 horas para matar a los embriones o a  $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora para permitir el pasaje del huevo el mismo día. El líquido alantoideo se cosecha bajo una campana de flujo laminar para riesgo biológico como muestras individuales y se analiza para determinar hemaglutinación (prueba inmediata de HA). Todas las muestras positivas para una dilución son agrupadas. Se determina el título de HA en los grupos utilizando glóbulos rojos (RBC) apropiados. Los grupos con títulos elevado (1 a 2 grupos) son seleccionados por no más de un total de 14 pasajes más y no menos de tres pasajes de la Cepa Viral Primaria aprobada por la OMS (de acuerdo con la Ph.Eur.) en huevos SPF, a partir del virus recombinante o el aislamiento viral aprobado.

En el pasaje final, los grupos son seleccionados y analizados en cuanto a título de HA. Los grupos con títulos altos de HA que posteriormente pasan una prueba de esterilidad son seleccionados como la Semilla Maestra. Se colocan alícuotas de 1 ml en viales estériles con tapa a rosca bajo flujo laminar y se congelan a menos de  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### **Semilla de Trabajo**

Las Semillas de Trabajo se preparan en un área exclusiva de producción de semillas de influenza (bajo campana de flujo laminar para riesgo biológico). Las Semillas de Trabajo para cada cepa de la vacuna de virus de influenza se obtienen mediante el cultivo de los virus de la Semilla Maestra en la cavidad alantoidea de huevos SPF. Se producen alrededor de 30 viales de cada semilla de trabajo y se almacenan a menos de  $-70^{\circ}\text{C}$ . Estos viales (normalmente uno) sirven como semilla para la inoculación de cada lote de Huevos para Producción. La Semilla de Trabajo se obtiene después de sólo un pasaje de la Semilla Maestra. Se utilizan huevos SPF embrionados. El inóculo viral contiene sulfato ácido de kanamicina y sulfato de neomicina de calidad Ph.Eur.

Novartis Argentina S.A.  
Farm. Elsa Orosa  
Co-Directora Técnica - M.N. 15.576  
Gte. de Asuntos Regulatorios  
Apoderada

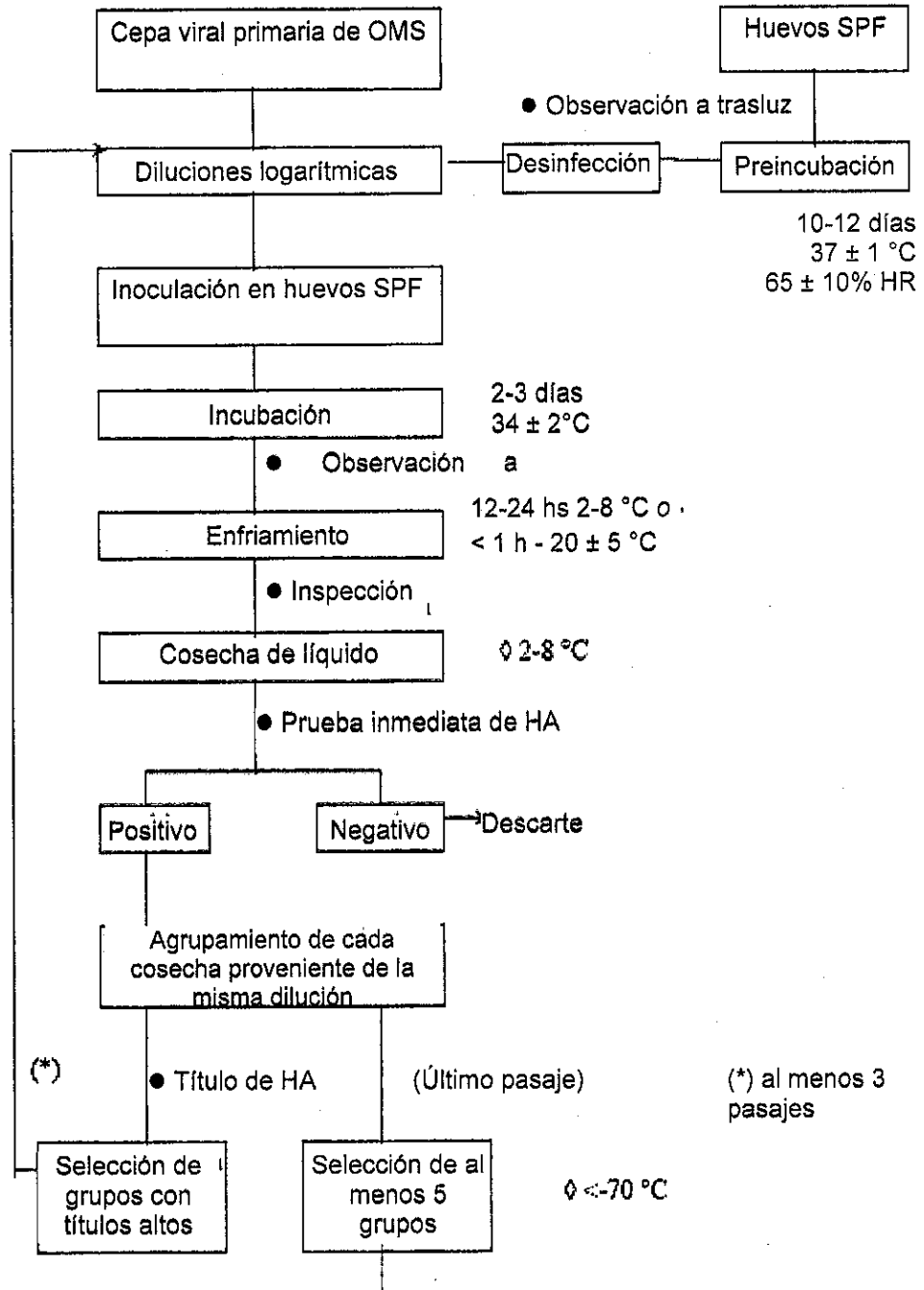
Novartis Argentina S.A.  
Vial de Diagnóstico  
Farm. Elsa O. Orosa  
Gte. Asuntos Regulatorios  
Apoderada



Un diagrama de flujo más detallado del proceso es presentado en páginas siguientes con información sobre los parámetros de operación y los controles durante el proceso.

**Diagrama de flujo**

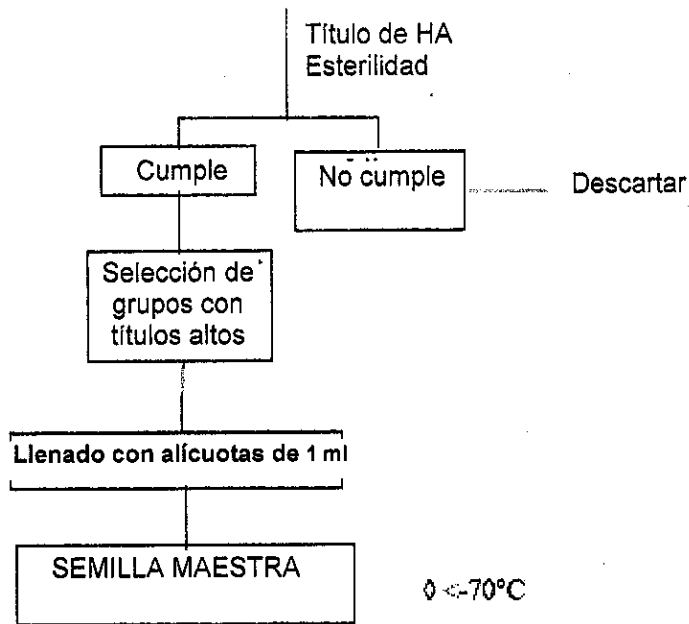
**a. Preparación de la Semilla Maestra**



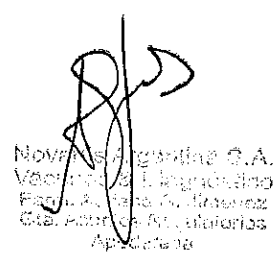
*[Signature]*  
 Novartis Argentina S.A.  
 Farm. Elsa Orosa  
 Co-Directora Técnica - M.N. 15.575  
 Gte. de Asuntos Regulatorios  
 Apoderada

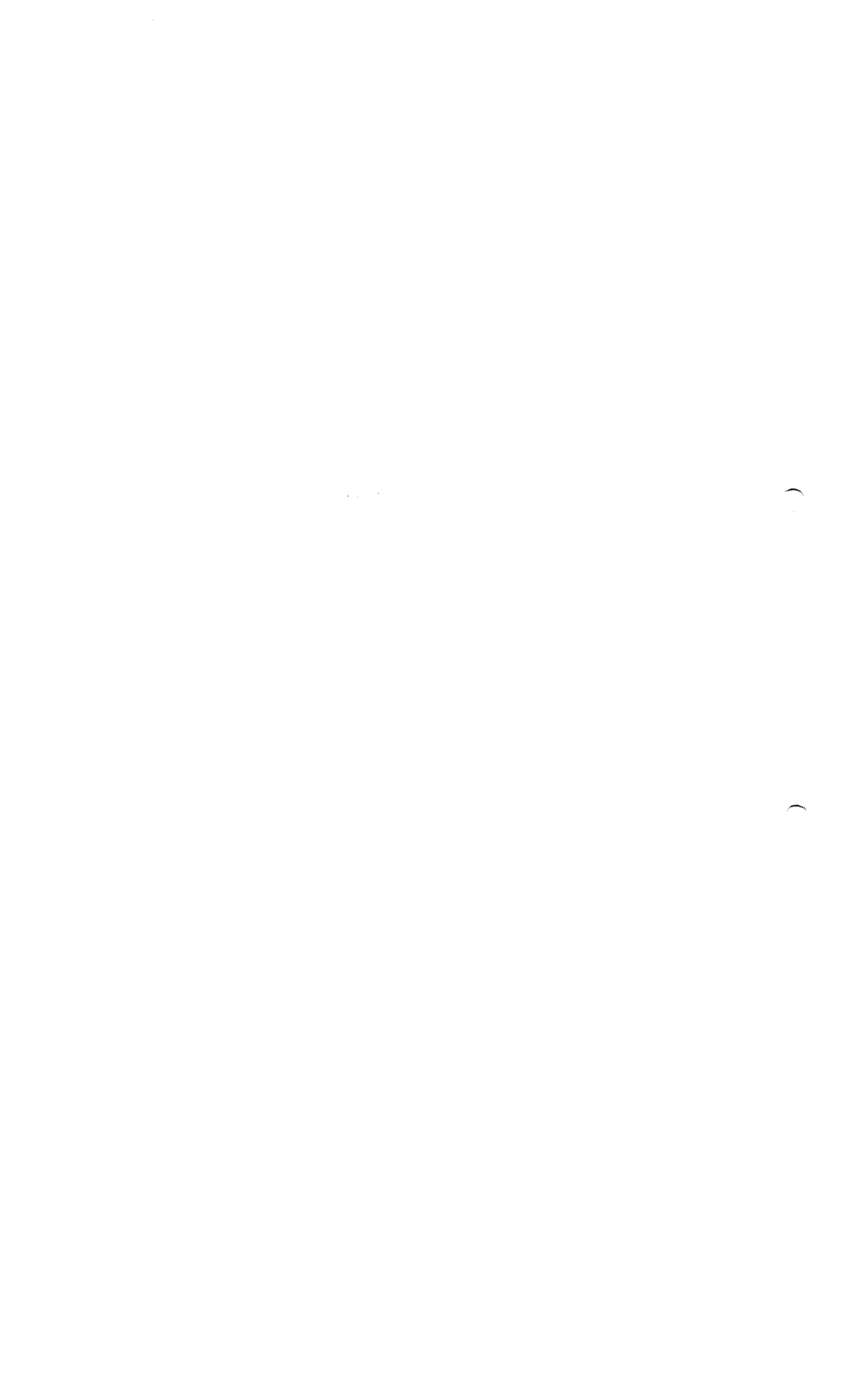
Novartis Argentina S.A.  
 Vacunas & Biológicos  
 Farm. Acuña G. Grechaz  
 Gte. Asuntos Regulatorios  
 Apoderada



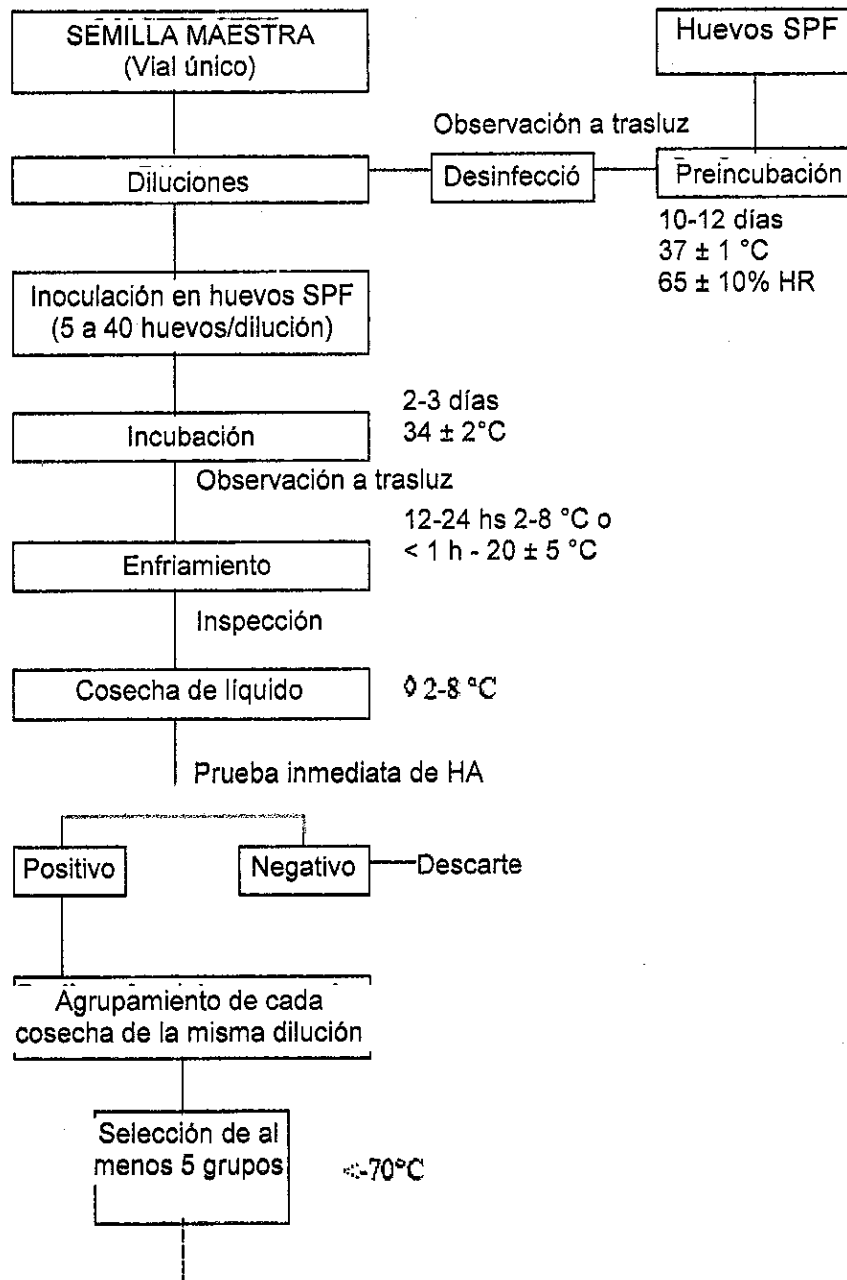


  
Novartis Argentina S.A.  
Farm. Elsa Orosa  
Calle 14 de Septiembre - M.N. 16.575  
Ger. de Asuntos Regulatorios  
Apoderada

  
Novartis Argentina S.A.  
Vacunas y Biológicos  
Farm. Elsa Orosa  
Calle 14 de Septiembre  
Apoderada

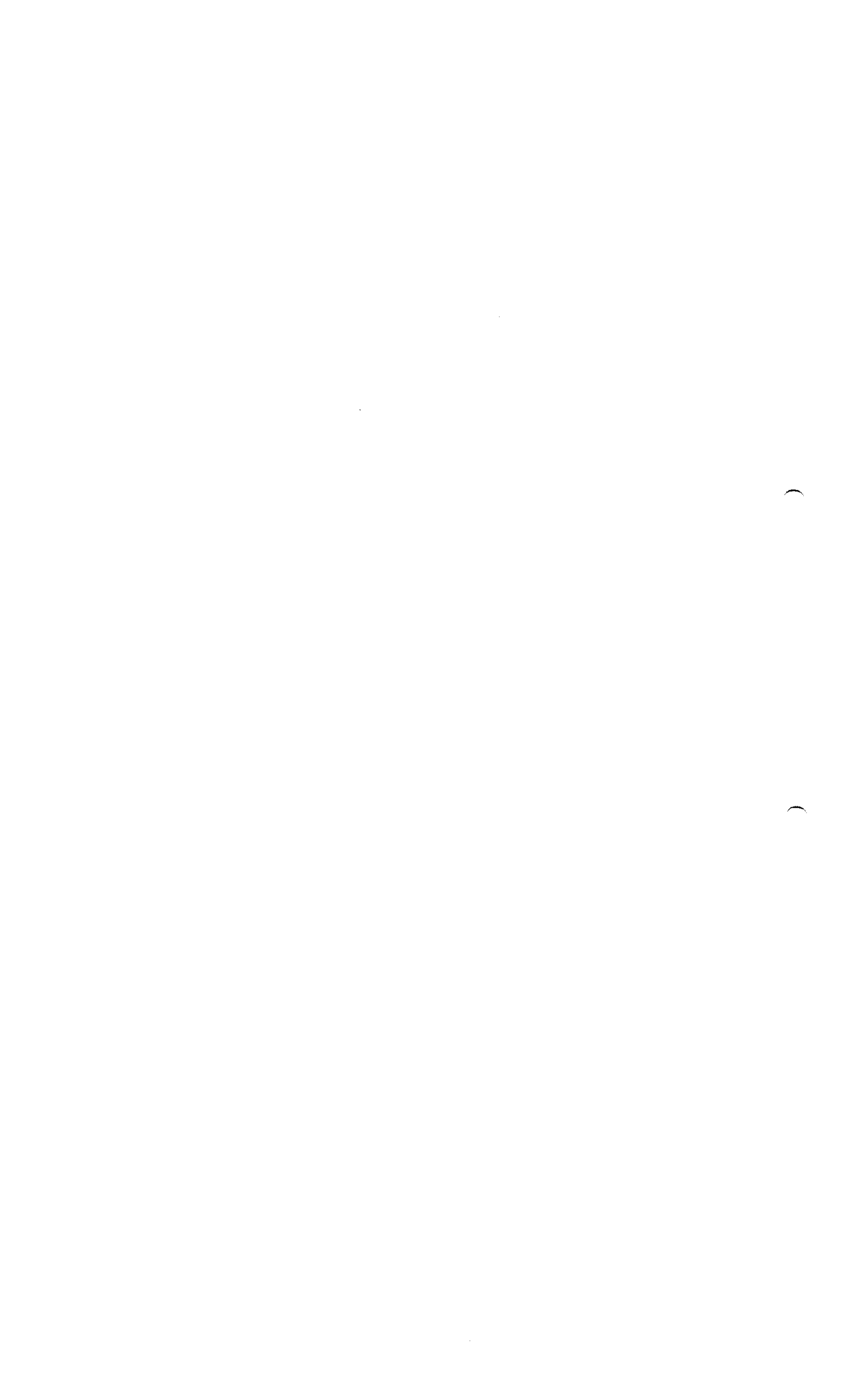


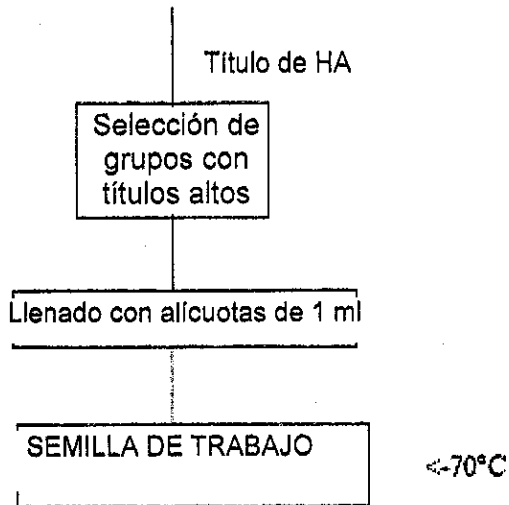
**b. Preparación de Semilla de Trabajo**

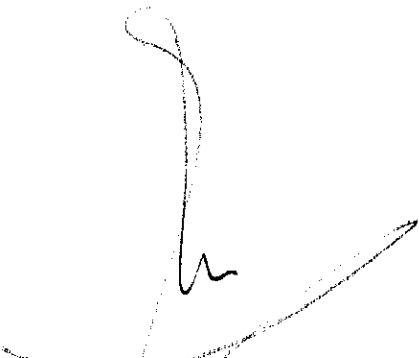


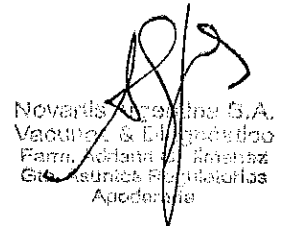
Novartis Argentina S.A.  
Farm. Elsa Orsola  
Co-Directora Técnica - M.N. 15.575  
Gte. de Asuntos Regulatorios  
Apoderada

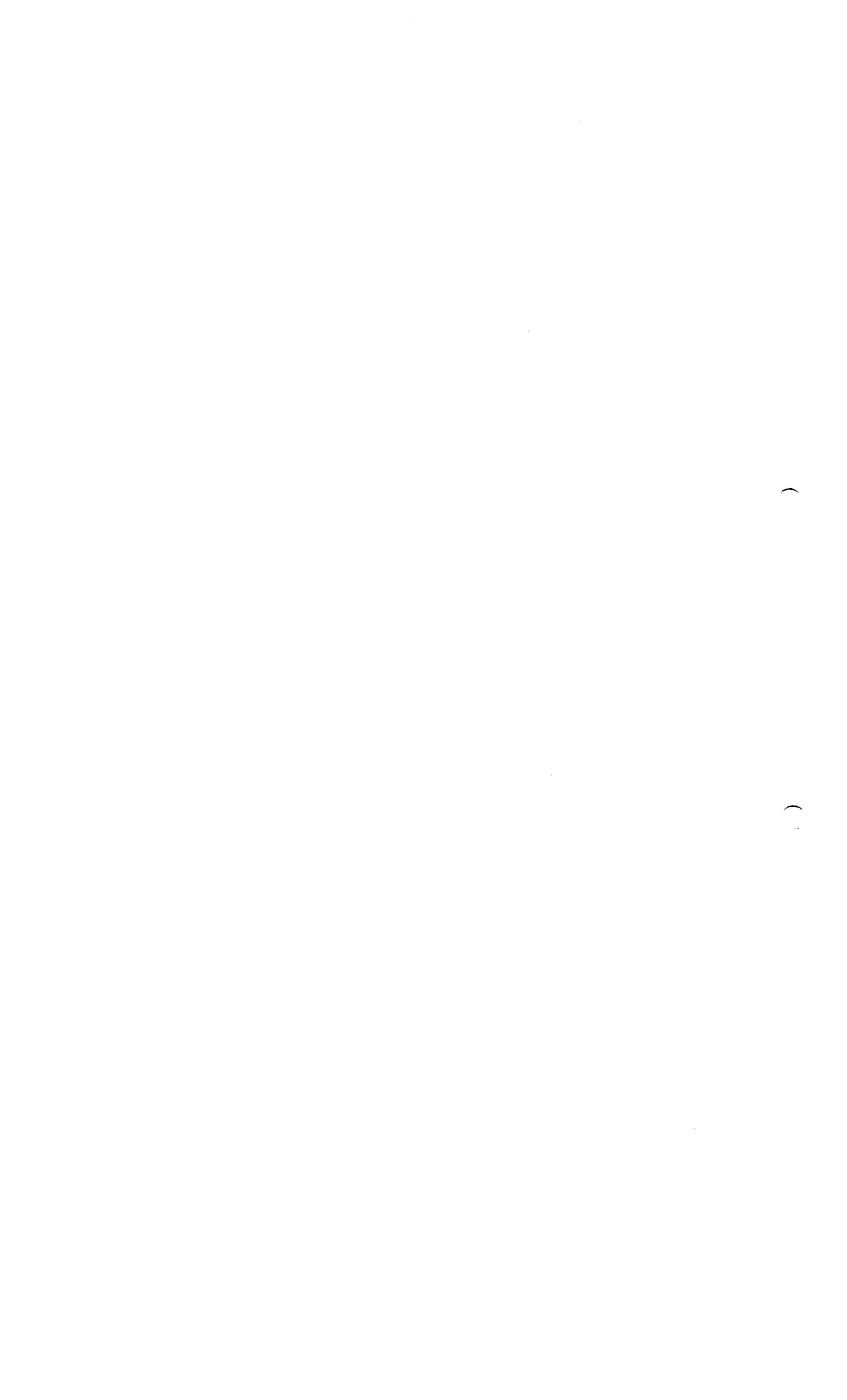
Novartis Argentina S.A.  
Vaccinas y Diagnóstico  
Farm. Anselmi G. de la Cruz  
Gte. Asuntos Regulatorios  
Apoderada



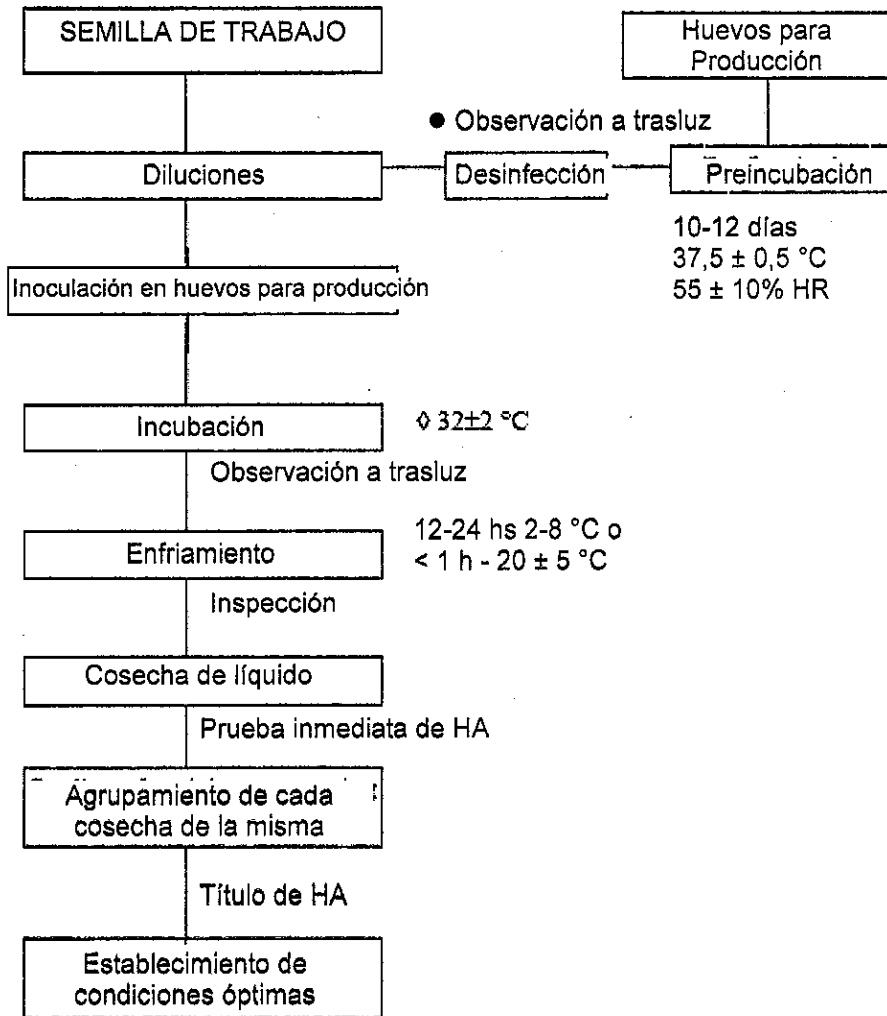


  
Novartis Argentina S.A.  
Farm. Elsa Orosa  
Co-Directora Técnica - M.N. 15.576  
Gte. de Asuntos Regulatorios  
Apoderada

  
Novartis Argentina S.A.  
Vacunas & Diagnóstico  
Farm. Adolfo J. Riquelme  
Gte. Técnica Regulatorias  
Apoderada



**c. Optimización de diluciones para producción**



Novartis Argentina S.A.  
Farm. Elsa Orosa  
Co-Directora Técnica - M.N. 15.576  
Gta. de Asuntos Regulatorios  
Apoderada

Novartis Argentina S.A.  
Vegetales y Alimentos  
Farm. Argentina G. Jiranoz  
Gta. de Asuntos Regulatorios  
Apoderada



## **Producción de Concentrado de Virus Completo**

### *Inoculación*

La Semilla de Trabajo se diluye en una solución que contiene sulfato de kanamicina y sulfato de neomicina en buffer fosfato a pH 8,0 para producir la Semilla para Inóculo. Después de la dilución de la Semilla de Trabajo, se analiza una muestra de semilla para inóculo para determinar esterilidad.

Los huevos para producción, antes del envío al centro de producción de Siena, son pre-incubados durante 10 a 12 días y observados al trasluz en un 100%. Después de fumigarlos en el área de producción, los huevos se inoculan con 0,2 ml de la Semilla para Inóculo. La incubación es normalmente a 35°C para virus de Tipo A y a 33°C para virus de Tipo B durante 3 días. Después de la incubación los huevos se enfrían durante una noche para matar a los embriones.

### *Cosecha y clarificación de líquido alantoideo*

Los huevos son cosechados por una máquina semi-automática que retira la parte superior del huevo a fin de permitir la inspección visual y la eliminación de huevos inadecuados antes de la cosecha. El líquido alantoideo se recolecta por vacío en un tanque aislado. Se añade solución de citrato de sodio al líquido alantoideo para evitar la agregación del virus y como auxiliar de procesamiento. La cantidad y punto de adición del citrato de sodio son específicos para la cepa viral.

El líquido alantoideo clarificado se concentra a alrededor de 400 a 500 litros por ultrafiltración.

### *Inactivación viral*

Se añade formaldehído (solución al 40%) al líquido alantoideo concentrado (0,5 ml/l de líquido alantoideo) y la mezcla se transfiere a un tanque de inactivación. El tiempo de contacto en agitación continua no es menor de 18 horas a una temperatura (de referencia) de 20°C a 30°C. Rutinariamente se realiza una cinética de inactivación en tres lotes de producción de cada nueva cepa de influenza introducida en conformidad con las recomendaciones anuales de la OMS.

### *Purificación*

El líquido alantoideo inactivado es ultracentrifugado y el virus se recolecta en un gradiente de sacarosa de 20% a 60%. El flujo está limitado a  $20 \pm 2$  l/hora. Sólo se retienen las fracciones II, III y IV. Las fracciones II y IV, fracciones hombro, se agrupan para el tratamiento con sulfato de bario. A partir de la campaña del 2003, se añade tanto a la Fracción Pico como a la Fracción Hombro una solución de NaOH 1M (INF 04.27) hasta un pH de 9,0 a 10,0 en lugar de tiomersal. La carga biológica es controla en esta etapa por la adición de hidróxido de sodio para obtener un pH que inhibe el crecimiento bacteriano sin desnaturalizar el antígeno de la influenza.

### *Sulfato de bario*

Novartis Argentina S.A.  
Farm. Elsa Orosa  
Av. Dirección Tecnológica - M.N. 15.575  
Gta. de Asuntos Regulatorios  
Apoderada

Novartis Argentina S.A.  
Virus de la Influenza  
Farm. Elsa Orosa  
Gta. Asuntos Regulatorios  
Apoderada



El virus contenido en las fracciones hombro se adsorbe en sulfato de bario. Luego de una precipitación durante toda una noche a  $5 \pm 3^\circ\text{C}$ , se decanta el sobrenadante y el precipitado resultante se centrifuga para formar un pellet del virus. El virus es luego eluido con citrato de sodio 0,45 M y la solución es centrifugada. La elución de virus y la centrifugación del pellet se repiten dos veces y se agrupan los sobrenadantes. Después de una centrifugación final, el sobrenadante se combina con la fracción pico III para producir un agrupamiento viral.

#### *Diafiltración*

Hasta tres agrupamientos virales de cosechas de huevos individuales de la misma cepa viral pueden combinarse para la diafiltración. Se eliminan la sacarosa y el citrato de sodio del agrupamiento viral y el diluyente se sustituye con buffer fosfato de pH 7,3. El agrupamiento se filtra a través de un filtro de  $1,2 \mu\text{m}$  y se añade Solución de Polisorbato 80 0,6% antes de la solubilización de las proteínas de la cubierta para ayudar a controlar la carga biológica ya que no se agrega más tiomersal en esta etapa. Las características específicas de algunas cepas virales requieren el uso de pre-filtros (de  $8 \mu\text{m}$ ,  $5 \mu\text{m}$  o  $3 \mu\text{m}$ ) contruidos del mismo material antes del filtro final de  $1,2 \mu\text{m}$ .

#### **Producción de Cosechas Monovalentes Agrupadas**

##### *Solubilización de hemaglutinina y neuraminidasa*

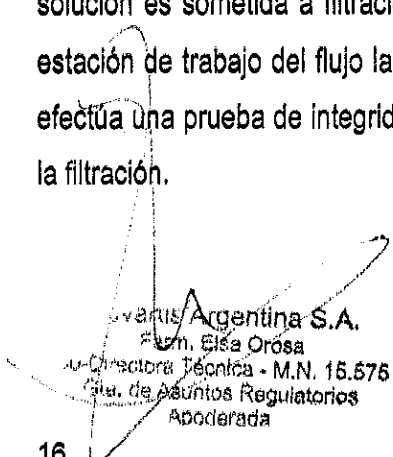
Las condiciones requeridas para la solubilización óptima de cada cepa viral se determinan mediante la "Prueba de Fraccionamiento" que ha sido recalificada satisfactoriamente para cada cepa del virus luego del aumento de tamaño del lote y los cambios en la producción con respecto a tiomersal en trazas. Puede añadirse polisorbato 80 (solución 0,6%) adicional al concentrado de virus completo y mezclar a  $2-8^\circ\text{C}$ . A continuación se añaden buffer fosfato pH 7,3 y solución de CTAB 1%. Los antígenos obtenidos después de la solubilización se purifican por ultracentrifugación para eliminar partículas subvirales y se recolecta el sobrenadante que contiene los antígenos de superficie.

##### *Adsorción de CTAB*

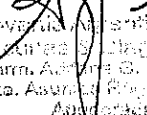
Se añade resina Amberlite para adsorber el CTAB presente. La suspensión se filtra para eliminar Amberlite y CTAB.

##### *Cosechas Monovalentes Agrupadas*

Se añade Solución B al filtrado. Los resultados de la prueba de carga biológica bacteriana llevada a cabo desde 1997, antes de la filtración estéril final, fueron de cero para todos los pre-filtrados. La solución es sometida a filtración esterilizante por  $0,2 \mu\text{m}$  a un recipiente estéril colocado frente a la estación de trabajo del flujo laminar en una sala limpia de clase C a través de filtros a los que se les efectúa una prueba de integridad. La prueba de integridad de los filtros se realiza antes y después de la filtración.



Novartis Argentina S.A.  
Farm. Elsa Orsola  
Co-Directora Técnica - M.N. 15.575  
Caja. de Asuntos Regulatorios  
Aprobada




Novartis Argentina S.A.  
Vejunta de Investigación  
Farm. Asunción S. Brachoz  
Gto. Asuntos Regulatorios  
Aprobada

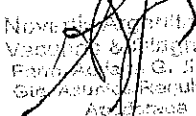


Inmediatamente después de la filtración descrita anteriormente, los agrupamientos monovalentes se transfieren al centro de Rosia en un tanque. Luego se transfieren a una sala de clase C después de su sanitización externa de acuerdo con procedimientos internos. Se pasa un tubo de transferencia a través de un puerto de transferencia, se realiza un muestreo del producto para Carga Biológica y es sometida a filtración esterilizante a un recipiente estéril, colocado bajo una campana de flujo laminar de Clase A en una sala limpia de Clase B. Para la esterilización de la Cosecha Monovalente Agrupada (MPH) se utiliza una capa filtrante validada. El filtro esterilizante con membrana de acetato de celulosa es similar al utilizado en el centro de Siena, con una carcasa de polipropileno y capas de apoyo/drenaje. El material filtrante de acetato de celulosa consiste en una membrana doble heterogénea. La primera membrana (0,45  $\mu\text{m}$ ) actúa como un pre-filtro adicional para la membrana esterilizante final de 0,2  $\mu\text{m}$ . Los filtros se suministran con una certificación adecuada de Garantía de Calidad.

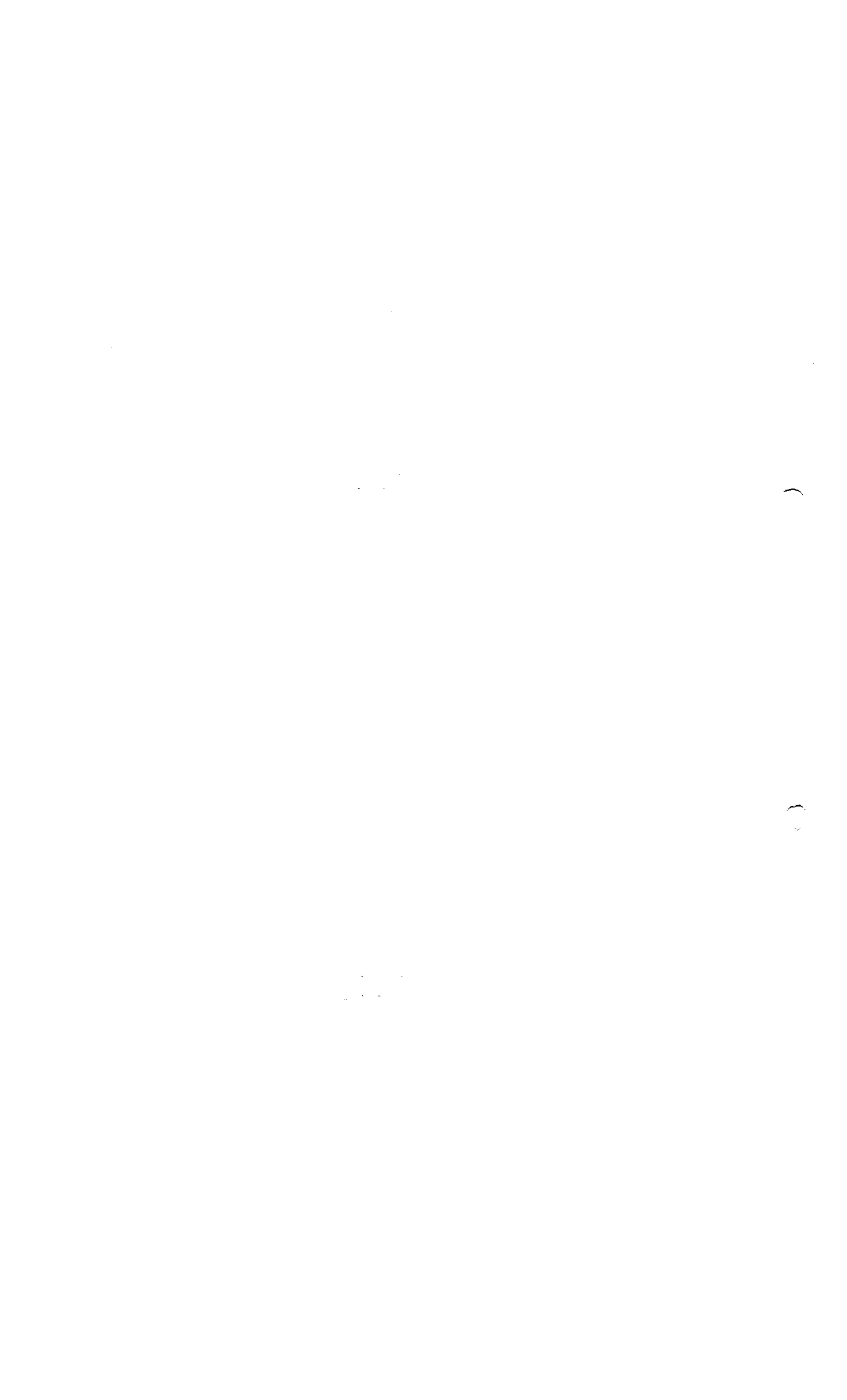
Todas las pruebas críticas, incluyendo endotoxina, esterilidad y SRID, se han recalificado o revalidado para el producto sin tiomersal.



Novartis Argentina S.A.  
Farm. Elsa Orosa  
Directora Técnica - M.N. 15.675  
Gta. de Asuntos Regulatorios  
Apoderada



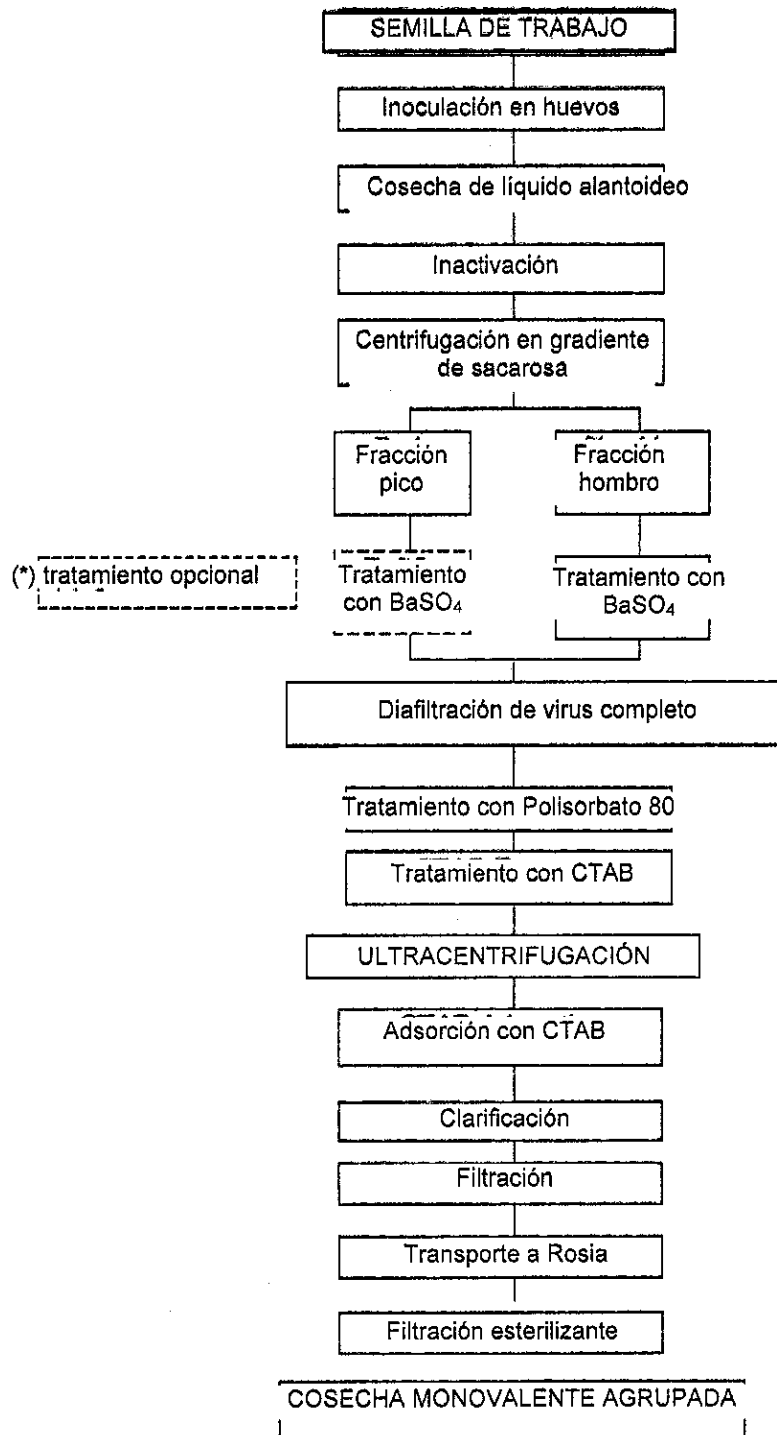
Novartis Argentina S.A.  
Vendedor & Farmacéutico  
Farm. Elsa O. Rosas  
Gta. de Asuntos Regulatorios  
Apoderada



### Diagramas de Flujo

En la página siguiente se presenta un esquema del proceso de producción de la Cosecha Monovalente Agrupada que indica los pasos clave. Un diagrama de flujo más detallado del proceso es presentado en páginas siguientes con información sobre los parámetros de operación y los controles durante el proceso, que comprenden cultivo del virus, cosecha de líquido alantoideo, inactivación viral, purificación, diafiltración, solubilización de hemaglutinina y neuraminidasa, adsorción de CTAB y filtración esterilizante.

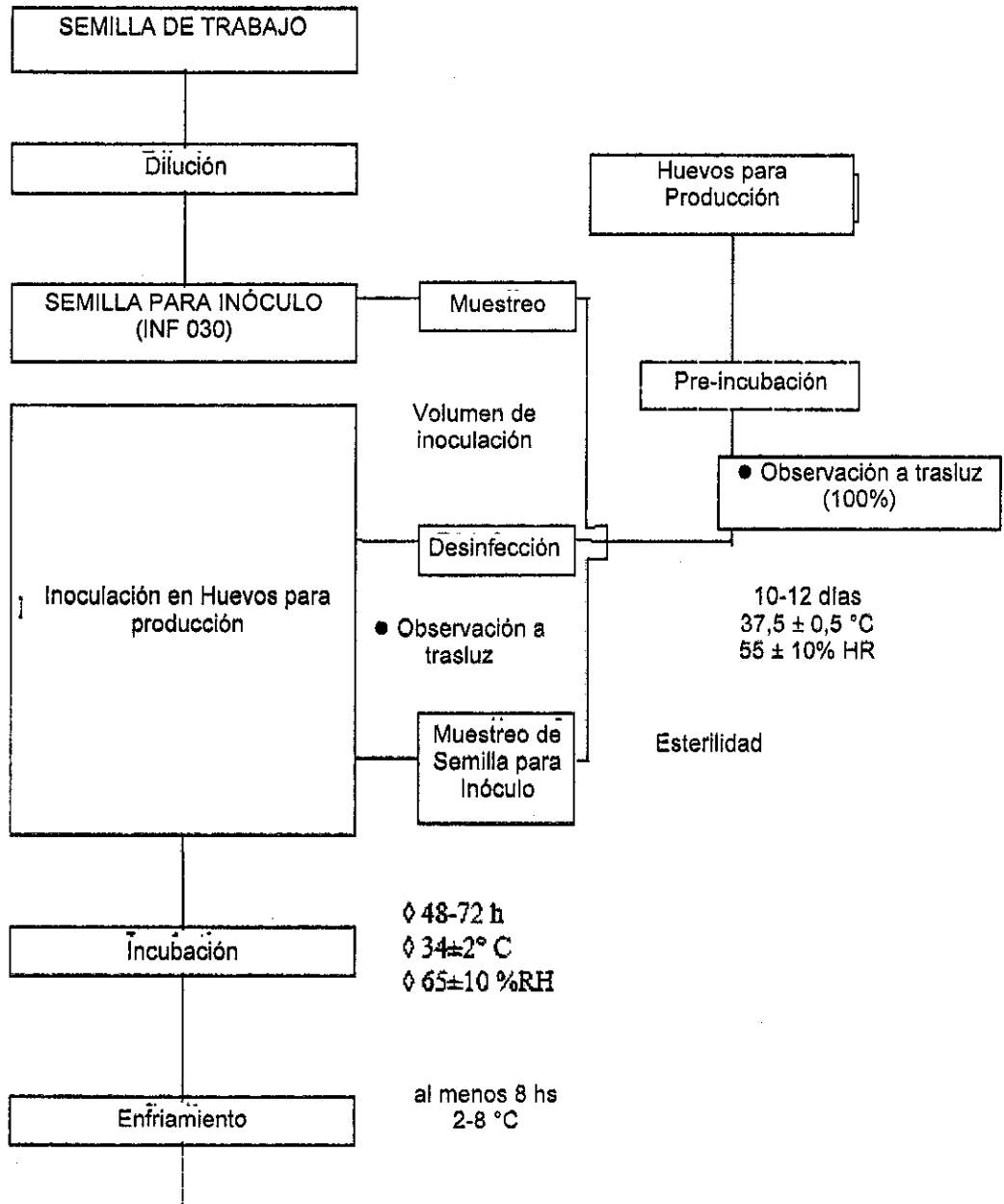
### Diagrama de flujo



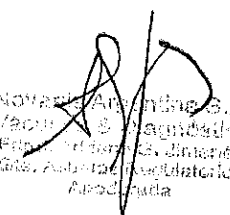
Novartis Argentina S.A.  
 Fama, Elsa Orosa  
 Co-Directora Técnica - M.N. 15.575  
 Gte. de Asuntos Regulatorios  
 Apoderada

Novartis Argentina S.A.  
 Virus y S. Oligonucleico  
 Fama, Elsa Orosa  
 Gte. de Asuntos Regulatorios  
 Apoderada

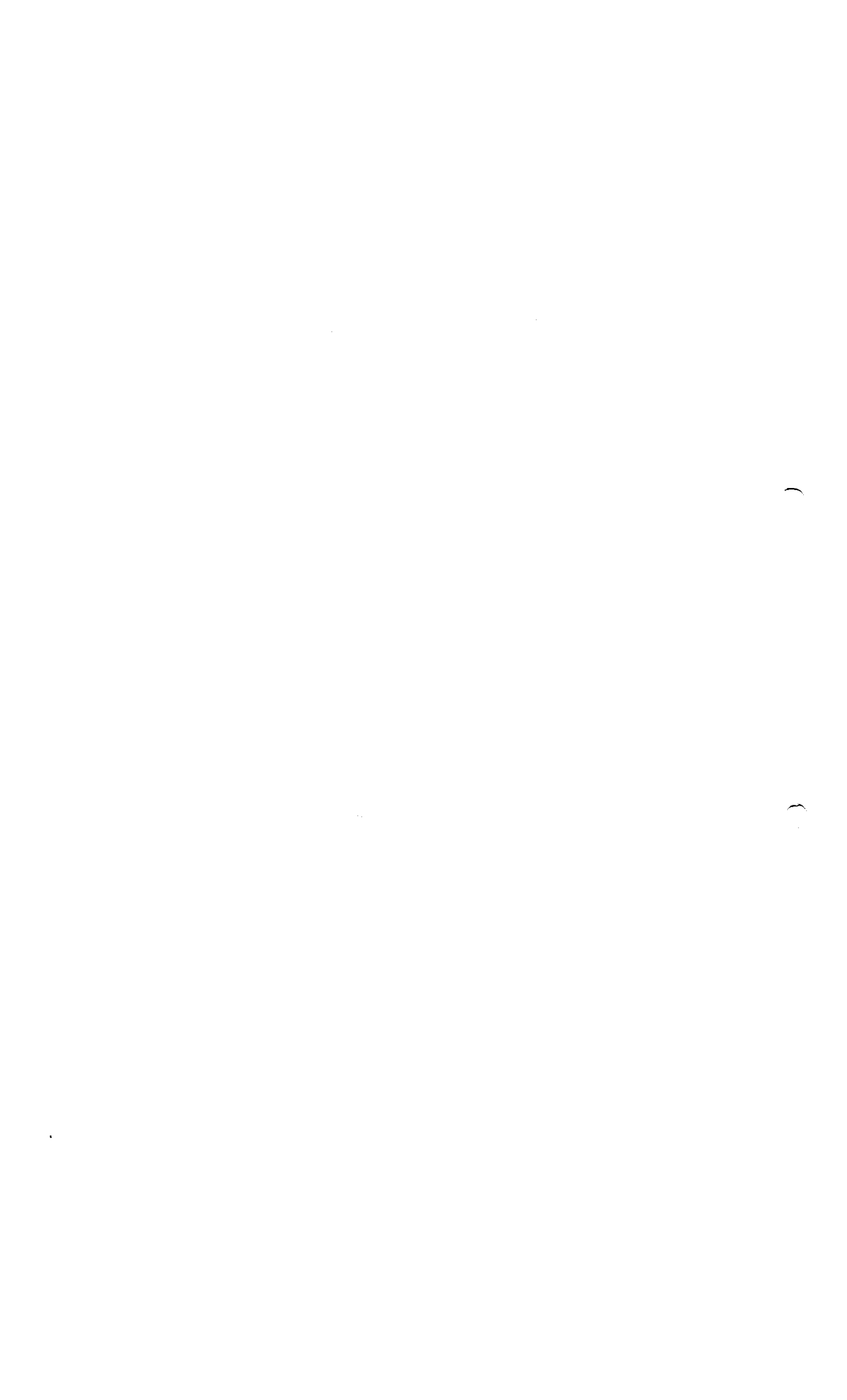


**a. Cultivo del Virus (centro de Siena)**


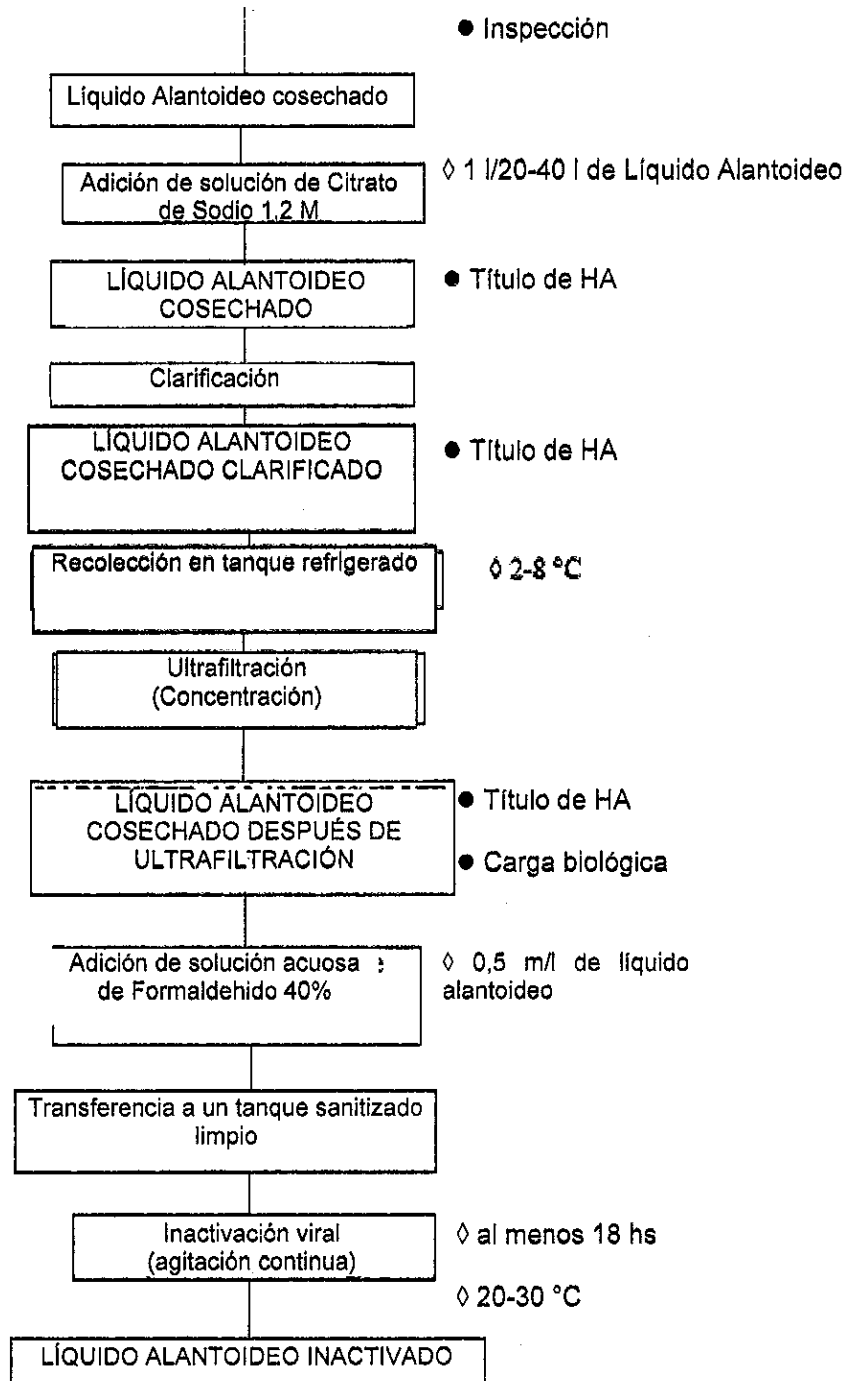

Novartis Argentina S.A.  
 Farm. Elsa Orosa  
 Co-Directora Técnica - M.N. 15.575  
 Gte. de Asuntos Regulatorios  
 Apoderada



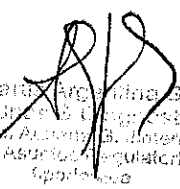
NOVARTIS ARGENTINA S.A.  
 Vaccines & Biologics  
 Farm. Elsa Orosa, J. Jiménez  
 Gte. Asuntos Regulatorios  
 Apoderada



**b. Cosecha de líquido alantoideo e Inactivación (centro de Siena) (continuación)**



  
 novartis Argentina S.A.  
 Farm. Elsa Orosa  
 Co-Directora Tecnología - M.N. 15.575  
 Gte. de Asuntos Regulatorios  
 Apoderada

  
 Novartis Argentina S.A.  
 Vaccines & Ophthalmics  
 Farm. Elsa Orosa  
 Gte. Asuntos Regulatorios  
 Apoderada

