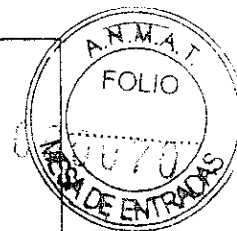
	<p align="center">Módulo 3. Calidad 3.2.S PRINCIPIO ACTIVO Mezclas monovalentes de la vacuna antipoliomielítica inactivada, Bilthoven Biologicals B.V.</p>	<p align="right">IPV/NC/AR/09-12</p> <p align="right">Página 6 de 13</p>
<p>3.2.S.2.2. Descripción del proceso de fabricación y de los controles del proceso</p>		



1.2 Descripción del proceso

1.2.1 Cultivo celular, fermentación y cosecha

Paso 1: preparación de la suspensión de células Vero

Para la preparación aséptica de la suspensión de células Vero, se descongelan ampollas del banco celular de trabajo del fabricante (BCTF) en un baño de agua a 37 °C, se agrega el medio de cultivo celular al contenido de las ampollas y se centrifuga la suspensión celular durante 5 minutos a 1000 rpm para eliminar el DMSO crioprotector. Tras la centrifugación, el sedimento celular se resuspende en medio de cultivo celular y se inoculara en el biorreactor.

Paso 2: primer pasaje de cultivo celular

Las células se cultivan asépticamente en el medio de cultivo celular en un biorreactor estéril de vidrio o de acero inoxidable, de hasta 40 litros. El biorreactor se llena con el medio de cultivo celular y microportadores Cytodex™ hasta 17,5 litros (± 2,5).

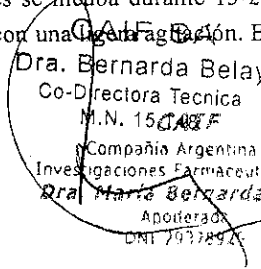
Las condiciones para el cultivo se mencionan en la tabla:

Parámetro	Puntos de consigna
Temperatura	37 °C
OD	50 %
pH	7,20
Flujo total	2 L/min
Agitador	40-100 rpm


Una vez hechos los controles pertinentes (o cuando se toman muestras para realizar los controles), la suspensión de células Vero se agrega al biorreactor. Durante el cultivo, se hacen los controles en proceso y se mide la concentración de glucosa. Cuando el resultado es < 5,5 mM, el cultivo celular se suplementa con 20 % de glucosa a esta concentración. Cuando el pH es < 7,2, se agrega bicarbonato de sodio. Durante el cultivo celular, el volumen se incrementa de manera gradual a 40 litros (días 5-7) o el cultivo se redistribuye en 15 a 25 litros de medio de cultivo celular. Las células se cultivan durante 5-7 días.

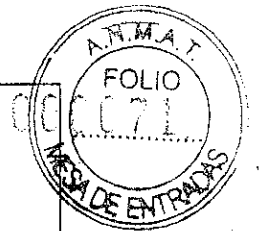
Paso 3: tripsinización del primer pasaje

Para la tripsinización del primer pasaje, se deja que el cultivo celular se asiente y luego se lava dos veces con 0,01 M de PBS, de pH 7,3. Luego, la suspensión de células/microportadores se incuba durante 15-25 minutos con solución de tripsina (0,25 %) en solución amortiguadora de citrato, con una ~~gran~~ agitación. El medio de cultivo celular se agrega a


Dra. Bernarda Belay
 Co-Directora Técnica
 M.N. 150487
 Compañía Argentina de
 Investigaciones Farmacéuticas S.A.
Dra. María Bernarda Belay
 Apotecaria
 DNI 7937892



	<p align="center">Módulo 3. Calidad 3.2.S PRINCIPIO ACTIVO Mezclas monovalentes de la vacuna antipoliomielítica inactivada, Biltoven Biologicals B.V.</p>	<p align="right">IPV/NC/AR/09-12</p> <p align="right">Página 7 de 13</p>
---	--	--



3.2.S.2.2. Descripción del proceso de fabricación y de los controles del proceso

aproximadamente 40 litros con medio de cultivo celular y aproximadamente 3,5 g/L de suspensión de microportadores Cytodex™.

Paso 4: segundo pasaje de cultivo celular

El cultivo celular empieza inmediatamente después de la tripsinización del primer pasaje. Las condiciones para el cultivo se mencionan en la tabla:

Parámetro	Puntos de consigna
Temperatura	37 °C
OD	50 %
pH	7,20
Flujo total	2 L/min
Agitador	40-100 rpm
Día 1 de redistribución	400 L/24 h
Día 2 de redistribución	600 L/24 h
Día 3 de redistribución hasta el final	800 L/24 h

Una vez hechos los controles pertinentes (o cuando se toman muestras para realizar los controles durante el proceso), la suspensión de células Vero se agrega al biorreactor. Durante el cultivo, se hacen los controles y se mide la concentración de glucosa. Cuando el resultado es < 5,5 mM, el cultivo celular se suplementa con 20 % de glucosa a esta concentración. Cuando el pH es < 7,2, se agrega bicarbonato de sodio. En el inicio del proceso de cultivo, el volumen es de aproximadamente 40 litros. En el día 1, comienza la redistribución con un volumen total de 120-160 litros. Durante el cultivo, la velocidad de redistribución se aumenta de manera gradual, de 400 L/24 h a 800 L/24 h. Las células se cultivan durante 4-7 días.

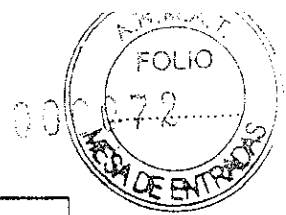
Paso 5: tripsinización del segundo pasaje y recolección de células de control


Para la tripsinización, se deja que el cultivo celular se asiente y luego se lava dos veces con 0,01 M de PBS, de pH 7,3. Luego, la suspensión de células/microportadores se incuba durante 15-25 minutos con solución de tripsina en solución amortiguadora de citrato, con una ligera agitación. El medio de cultivo celular se agrega a aproximadamente 7 litros con medio de cultivo celular y los microportadores (1,5-2,5 g/L) se agregan al cultivo. Durante la tripsinización, ± 200 ml de suspensión celular concentrada, con $1-2 \times 10^8$ células, se separan para preparar las células de control.

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





	Módulo 3. Calidad 3.2.S PRINCIPIO ACTIVO Mezclas monovalentes de la vacuna antipoliomielítica inactivada, Biiithoven Biologicals B.V.	IPV/NC/AR/09-12 Página 8 de 13
---	---	---------------------------------------

3.2.S.2.2. Descripción del proceso de fabricación y de los controles del proceso

Paso 6: tercer pasaje de cultivo celular

El cultivo celular empieza inmediatamente después de la tripsinización del segundo pasaje. Las células se cultivan en dos biorreactores estériles con un volumen de 350 o 750 litros (el volumen total es 700 o 1500 litros). Los biorreactores se llenan con medio de cultivo celular hasta el volumen máximo con adiciones, y a cada una de estas soluciones se agregan 1,5-2,5 g/L de microportadores.

Las condiciones para el cultivo se mencionan en la tabla:

Parámetro	Puntos de consigna
Temperatura	37 °C
OD	50 %
pH	7,20
Flujo total	2 L/min (escala de 350 L); 5 L/min (escala de 750 L)
Agitador	40-150 rpm (escala de 350 L); 25-80 rpm (escala de 750 L)

Una vez hechos los controles pertinentes (o cuando se toman muestras para realizar los controles), la suspensión de células Vero se agrega al biorreactor. Durante el cultivo, se hacen los controles en proceso y se mide la concentración de glucosa. Cuando el resultado es < 5,5 mM, el cultivo celular se suplementa con 20 % de glucosa a esta concentración. Cuando el pH es < 7,2, se agrega bicarbonato de sodio. Las células se cultivan durante 3-6 días.

Paso 7: lavado de microportadores con células Vero y adición del medio de cultivo del virus

Primero, se deja que los microportadores se asienten; luego, se elimina el medio de cultivo celular. Se agrega medio de cultivo del virus a cada biorreactor para enjuagar la suspensión de microportadores/células. El volumen de este medio depende del volumen de cultivo: se agrega aproximadamente 1/3 del volumen de cultivo. Esta suspensión se agita y se deja que los microportadores se asienten. Luego, se elimina el medio de cultivo del virus. A cada biorreactor, se agrega medio de cultivo del virus al volumen máximo.

Antes de agregar la semilla del virus al biorreactor, se descongela una ampolla de semilla del virus tipo 1, cepa Mahoney; o semilla del virus tipo 2, cepa MEF; o semilla del virus tipo 3, cepa Saukett.

Paso 8: inoculación del virus y cultivo


Las condiciones de cultivo se ajustan según las condiciones adecuadas para el cultivo del virus:

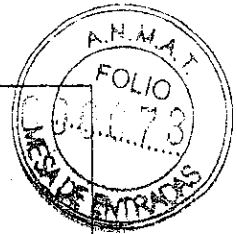
Parámetro	Puntos de consigna
Temperatura	36 °C
OD	25 %

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

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



	<p align="center">Módulo 3. Calidad 3.2.S PRINCIPIO ACTIVO Mezclas monovalentes de la vacuna antipoliomielítica inactivada, Bilthoven Biologicals B.V.</p>	<p align="right">IPV/NC/AR/09-12 Página 9 de 13</p>
<p align="center">3.2.S.2.2. Descripción del proceso de fabricación y de los controles del proceso</p>		



Parámetro	Puntos de consigna
pH	7,40
Flujo total	2 L/min
Agitador	50-150 rpm

Se agrega el virus poliomiéltico tipo 1, 2 o 3 a los cultivos. El volumen de virus que se debe agregar se calcula con la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen de virus} = \text{MOI} \times \text{cantidad de células/ml} \times \text{volumen del biorreactor (ml)} / \text{título viral (CCID50/ml)}$$

La MOI (multiplicidad de infección) depende del tipo de virus y oscila entre 0,01 y 0,1.

Una vez hechos los controles pertinentes (o cuando se toman muestras para realizar los controles), el virus se cultiva durante 3-4 días. Durante el cultivo, se hacen los controles pertinentes.

Paso 9: cosecha única del virus

Antes de la cosecha, se toman muestras de la suspensión en cada biorreactor para comprobar la esterilidad (prueba HPD), el contenido de antígeno D y la titulación del virus. Se deja que los microportadores se asienten. La suspensión del virus se cosecha vaciando los biorreactores. El contenido de los dos biorreactores utilizados se mezcla, y se toman muestras de dicha mezcla para realizar las pruebas de detección de agentes extraños.

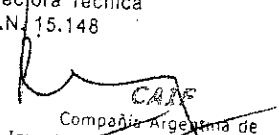
La cosecha única del virus no se almacena hasta conocer los resultados de las pruebas de liberación. El proceso de producción continúa una vez que se toman las muestras de referencia de los productos intermedios.

1.2.2 Purificación e inactivación

Paso 10: filtración


La cosecha del virus se clarifica por filtración con una unidad de filtro en línea de tres pasos que contiene filtros de 75 µm, 0,45 µm y 0,22 µm. El contenido de ambos biorreactores se filtra al mismo tiempo. En la sección sobre equipos e instalaciones, se incluye una descripción general del sistema de filtros.

Cada filtro de 75 µm se cubre con Celite 577 o equivalente. Para esto, se prensa una solución con Celite 577 (60 g/litro) o equivalente a través del filtro. El flujo de poliovirus empieza de inmediato (presión de 0,5 bar). Durante el proceso de filtración, la presión se aumenta de manera gradual hasta un máximo de 1,0 bar. A mitad del proceso de filtración, se toman muestras para los controles. El proceso termina una vez que se filtra todo material del virus.

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

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





	<p>Módulo 3. Calidad 3.2.S PRINCIPIO ACTIVO Mezclas monovalentes de la vacuna antipoliomielítica inactivada, Bilthoven Biologicals B.V.</p>	<p>IPV/NC/AR/09-12 Página 10 de 13</p>
<p>3.2.S.2.2. Descripción del proceso de fabricación y de los controles del proceso</p>		

Paso 11: concentración

La suspensión clarificada del virus se concentra por ultrafiltración mediante una unidad de filtros, con un umbral de corte de 100.000 daltones, a aproximadamente 1-2,5 litros. Esto se hace en dos pasos. Primero, la cosecha de virus se concentra a aproximadamente 0,25-1,0 litros. Segundo, el sistema se enjuaga reiteradamente con medio estéril de cultivo de virus. Los enjuagues se concentran y luego se agregan al concentrado original, lo que da un volumen total de concentrado de aproximadamente 1-2,5 litros. El sistema utilizado es completamente automático y controlado por computadoras. Se toman muestras del concentrado. El concentrado se almacena durante la noche a temperatura ambiente para continuar su procesamiento.

Paso 12: purificación

La cosecha concentrada del virus se purifica en dos pasos por filtración con gel (paso 12a) y por cromatografía de intercambio de aniones (paso 12b). Se utiliza una unidad de detección UV para monitorear el eluato de manera constante a 254 y 280 nm.

Paso 12a: filtración con gel

El paso cromatográfico de filtración con gel se realiza mediante cromatografía de exclusión por tamaño, utilizando una columna con una altura de lecho empacado de 80 a 88 cm. Como material de columna se utiliza sefarosa CL-6B o equivalente con 40 mM de solución amortiguadora de fosfato, de pH 7,0. En este paso del proceso de purificación, se pueden separar moléculas con un peso molecular entre 1×10^4 y 4×10^6 . Además, como resultado de la filtración con gel, la suspensión del virus se transfiere a una solución amortiguadora de fosfato con baja fuerza iónica (40 mM). Esto es necesario para el paso de la purificación por cromatografía de intercambio de aniones (paso 12b).


Antes de la aplicación del virus, el sistema se esteriliza con 0,1 M de NaOH. Antes de la filtración con gel, el sistema se equilibra con 40 mM de solución amortiguadora de fosfato, de pH 7,0. El pH del eluato debe ser de aproximadamente 7,0 al terminar el equilibrado.

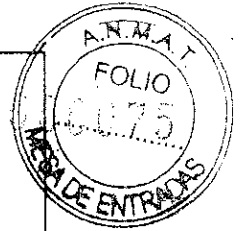
La suspensión concentrada del virus se aplica a la columna y la misma solución amortiguadora se hace correr por la columna con una velocidad de flujo lineal de aproximadamente 3,8 cm/h. La recolección y toma de muestras de las dos fracciones pico eluidas detectadas por absorción a 254 y 280 nm se hace por separado. La segunda fracción pico se utiliza para continuar la purificación.

Paso 12b: cromatografía de intercambio de aniones

El objetivo de este paso de purificación es adherir los componentes con carga negativa al material de la columna (DEAE sefarosa de flujo rápido o equivalente), mientras que el poliovirus fluye en una solución amortiguadora de fosfato de 40 mM y pH 7,0. Este paso de purificación se monitorea con una unidad de detección UV a 254 y 280 nm. Antes de su uso, la columna se llena con el material correspondiente hasta una altura de lecho empacado de 21 a 27 cm y luego se equilibra con 40 mM de solución amortiguadora de fosfato,

CAIF SA
Dra. Bernarda Belay
Co-Directora Técnica
M.N. 15.114
Compañía Argentina de
Investigaciones Farmacéuticas S.A.
Dra. María Bernarda Belay
Apoderada
DNI 29378925

	<p align="center">Módulo 3. Calidad 3.2.S PRINCIPIO ACTIVO Mezclas monovalentes de la vacuna antipoliomielítica inactivada, Bilthoven Biologicals B.V.</p>	<p align="right">IPV/NC/AR/09-12 Página 11 de 13</p>
<p align="center">3.2.S.2.2. Descripción del proceso de fabricación y de los controles del proceso</p>		



de pH 7,0. El eluato de la filtración con gel se aplica a esta columna. A continuación, la columna es eluida a una velocidad de flujo lineal de aproximadamente 12,7 cm/h con 40 mM de solución amortiguadora de fosfato, de pH 7,0. Se realiza la recolección y toma de muestras de la fracción pico (detectada por absorbancia a 254 y 280 nm). Se mide la absorción de esta muestra a 260 y 280 nm, y se calcula la proporción. A partir de esta proporción se calcula la concentración de antígeno D en la fracción pico, sobre la base del siguiente cálculo:

Tipo 1: concentración de antígeno D/ml = UA 260 x 8000

Tipo 2: concentración de antígeno D/ml = UA 260 x 2800

Tipo 3: concentración de antígeno D/ml = UA 260 x 7700

UA = Unidades de absorción

Paso 13: dilución

Debido a la inestabilidad del poliovirus en 40 mM de solución amortiguadora de fosfato, cuando se almacena durante un período más prolongado, el virus se diluye de inmediato en medio 199 y glicina. En general, el virus se diluye con medio 199 y glicina a concentraciones de antígeno D de 2000, 1000 y 1500 unidades de antígeno D por mililitro para los tipos 1, 2 y 3, respectivamente.

Paso 14: filtración estéril

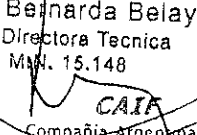
Antes de la inactivación, la mezcla purificada y concentrada de virus poliomiéltico se pasa por un filtro estéril de 0,22 µm y se coloca en frascos de tipo B10, B20 o B50. Después de la filtración, el volumen de la preparación del virus se puede ajustar al volumen final deseado con medio 199 sin fosfato y con solución de glicina.

Antes de su uso, el filtro se enjuaga con 0,5 litros de medio 199 con glicina. Se agrega 1 M de NaOH a la suspensión del virus para llegar aproximadamente a pH=7. Después de agregar NaOH, la suspensión del virus se filtra y se coloca en frascos. El filtro se enjuaga con medio 199 (37 °C) hasta alcanzar el volumen final calculado. Se toman muestras y se determina el pH. Cuando es necesario, el pH se ajusta a 7,0 ± 0,2 con 1 M de NaOH.


Paso 15: inactivación

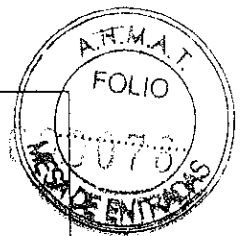
El proceso de inactivación empieza dentro de las 72 horas posteriores a la filtración estéril. El poliovirus se inactiva con formaldehído durante 13 días a 37 °C. Antes de empezar la inactivación y durante dicho proceso, los conglomerados se eliminan con un filtro estéril de 0,22 µm.

Antes de agregar el formaldehído, los frascos con la suspensión del virus se dejan a 37 °C durante 4 horas. El formaldehído en medio 199 se agrega y se mezcla en la suspensión del virus (concentración final de formaldehído = 0,003 M). Luego, se toman dos muestras de inmediato (una para controlar el pH y una muestra t=0 para la curva de inactivación que se describe a continuación). Después los frascos se trasladan a un incubador de 37 °C.

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



	<p align="center">Módulo 3. Calidad 3.2.S PRINCIPIO ACTIVO Mezclas monovalentes de la vacuna antipoliomielítica inactivada, Bilthoven Biologicals B.V.</p>	<p align="right">IPV/NC/AR/09-12 Página 12 de 13</p>
<p>3.2.S.2.2. Descripción del proceso de fabricación y de los controles del proceso</p>		



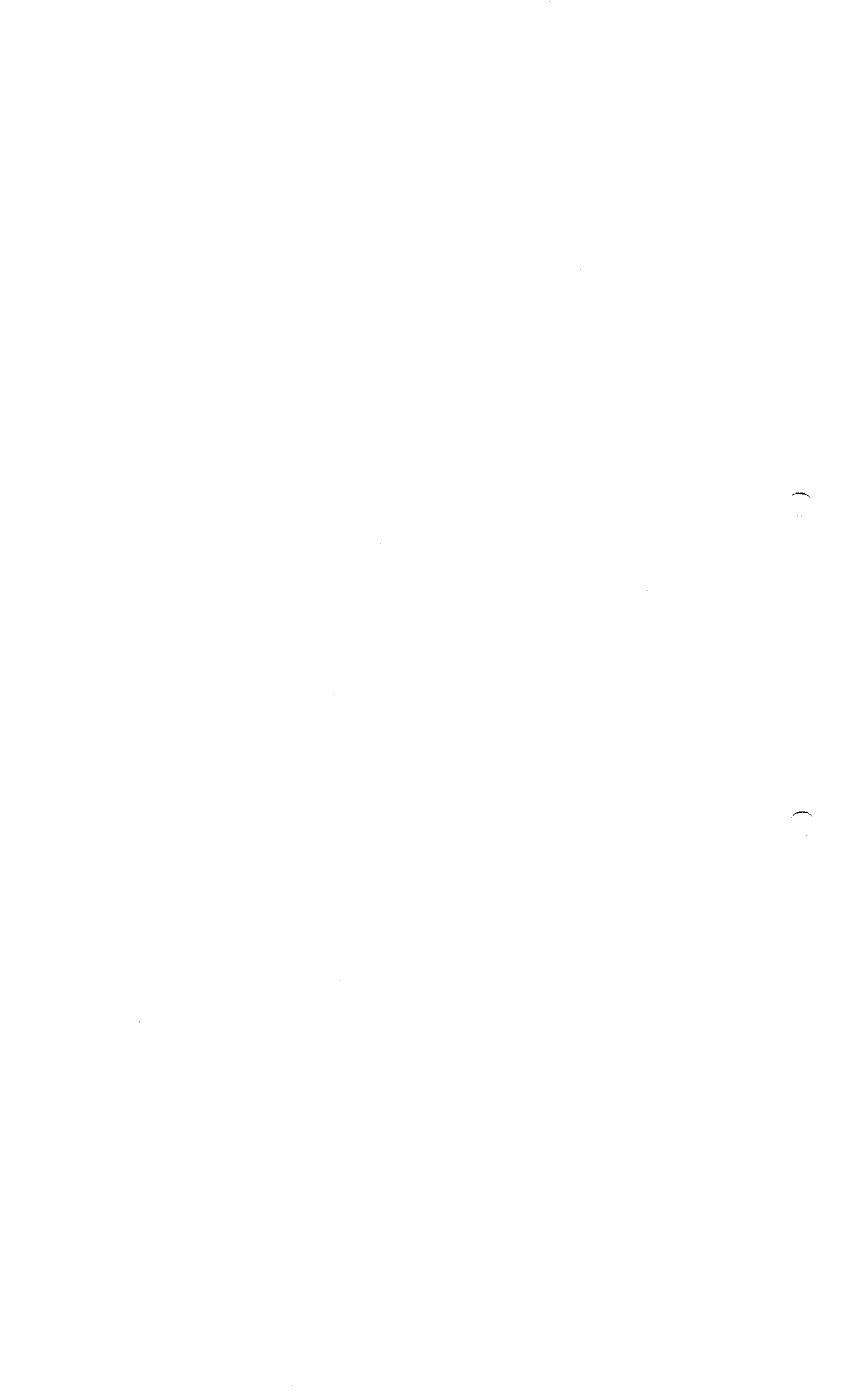
Para poder monitorear la inactivación (curva de inactivación), se tomarán muestras a distintas horas después de agregar formaldehído: t=0 (inmediatamente después de agregar formaldehído, como se describe más arriba), t=24, t=48, t=72, t=96 y t=120. En el día 6-8 de incubación, la suspensión del virus se pasa por un filtro estéril de membrana de 0,22 µm. Antes y después de la filtración se toman muestras para determinar el contenido de antígeno D y controlar el pH. La suspensión del virus se incuba en el incubador de 37 °C durante 6-8 días más (el tiempo total de incubación es de 13 días). En los días 10 y 13 del tiempo de incubación, se toman muestras para comprobar la efectividad de la inactivación. La incubación termina después de 13 días.

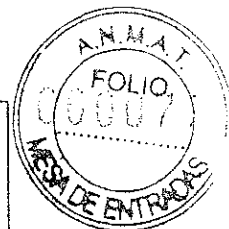
Paso 16: pruebas de liberación


Las pruebas de liberación se describen en el Módulo 3.2.S.4.1.

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





	<p>Módulo 3. Calidad 3.2.S PRINCIPIO ACTIVO Mezclas monovalentes de la vacuna antipoliomielítica inactivada, Bilthoven Biologicals B.V.</p>	<p>IPV/NC/AR/09-12 Página 13 de 13</p>
<p>3.2.S.2.2. Descripción del proceso de fabricación y de los controles del proceso</p>		

2 Almacenamiento

2.1 Cultivo celular, fermentación y cosecha

La cosecha se procesa de inmediato.

2.2 Purificación e inactivación

La fracción de virus purificada (después del paso 12b) se diluye de inmediato en medio 199, debido a la inestabilidad del poliovirus en 40 mM de solución amortiguadora de fosfato, de pH 7,0.

Las mezclas monovalentes de vacuna antipoliomielítica inactivada (después del paso 13) se almacenan a 2-8 °C, hasta que continúe el procesamiento.

2.3 Mezcla monovalente

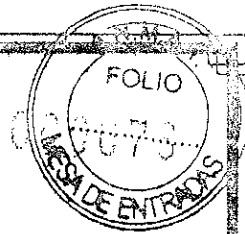
Las mezclas monovalentes se almacenan en frascos de vidrio de tipo B-20, cubiertos con placas de acoplamiento de acero inoxidable, a 2-8 °C, hasta que continúe el procesamiento.

Si el volumen de una mezcla monovalente es superior a 20 litros, la mezcla se divide en más frascos. Entonces se vuelve a comprobar la esterilidad.

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

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





10.1.4 *Método de elaboración del producto final*

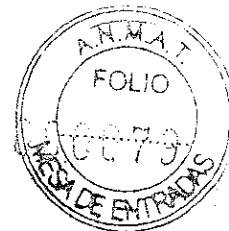
CAIF SA
Dra. Bernarda Belay
Co-Directora Técnica
M.N. 15.148


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



COMPANIA ARGENTINA DE INVESTIGACIONES FARMACEUTICAS S.A.





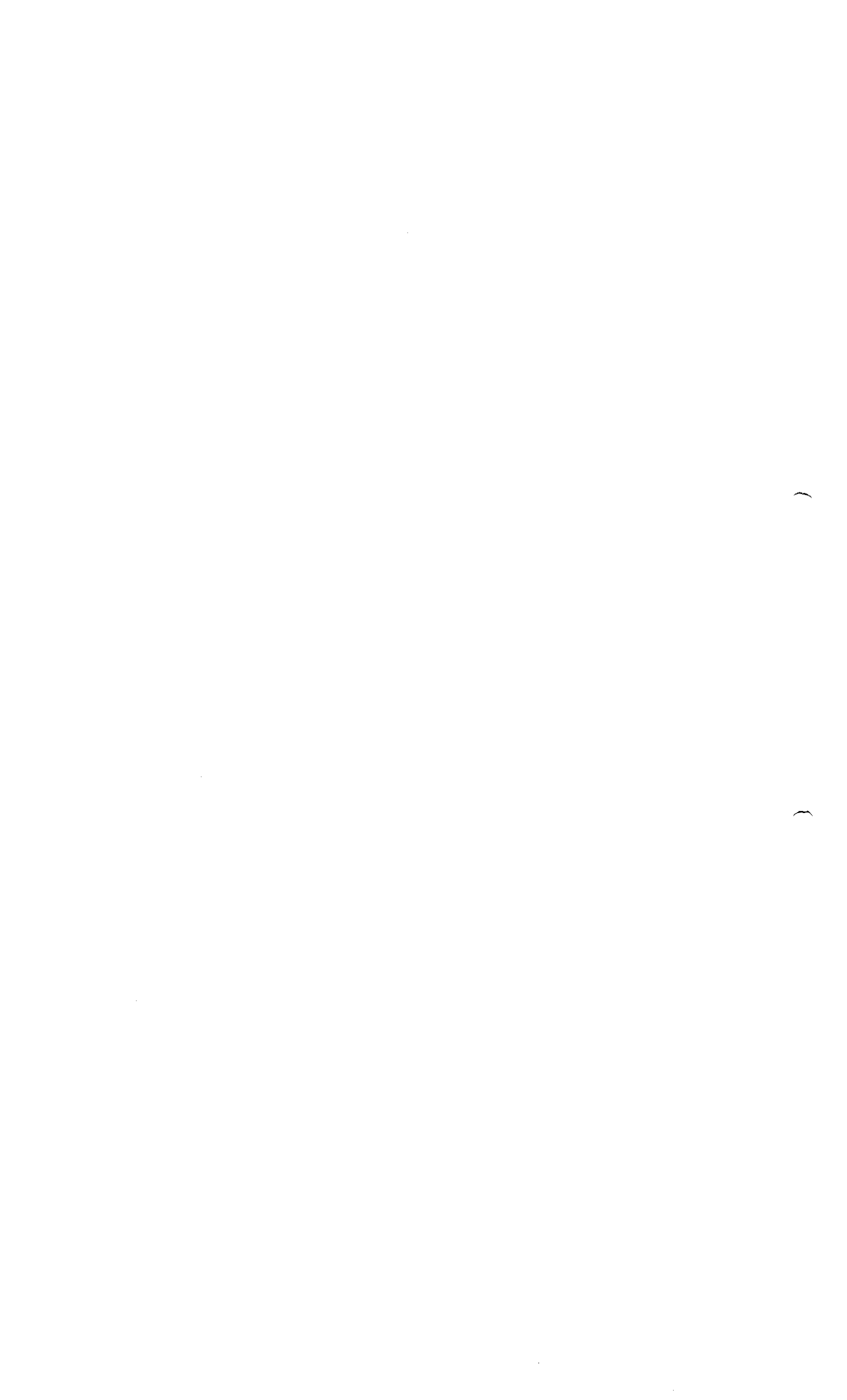
	Vacuna antipoliomielítica inactivada, suspensión inyectable, Bilthoven Biologicals B.V.	IPV/NC/AR/09-12 Página 1 de 10
Descripción técnica y analítica del proceso de fabricación		


Índice

1	Producción del granel trivalente de la vacuna antipoliomielítica inactivada (VPI)	2
1.1	<i>Organigrama de la producción del granel trivalente de la vacuna antipoliomielítica inactivada (VPI)</i>	2
1.2	<i>Descripción del proceso</i>	
2	Producción del granel final y de lotes finales de la VPI	4
2.1	<i>Organigrama del granel final de la vacuna antipoliomielítica inactivada</i>	4
2.2	<i>Descripción del proceso</i>	5
3.	Llenado (= producción del lote final)	8
3.1.	<i>Organigrama y controles durante del proceso</i>	8
4.	Almacenamiento y etiquetado	10

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

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



	Vacuna antipoliomielítica inactivada, suspensión inyectable, Bilthoven Biologicals B.V.	IPV/NC/AR/09-12 Página 2 de 10
Descripción técnica y analítica del proceso de fabricación		

1 Producción del granel trivalente de la vacuna antipoliomielítica inactivada (VPI)

1.1 Organigrama de la producción del granel trivalente de la vacuna antipoliomielítica inactivada (VPI)

Paso	Equipo técnico	Paso del proceso/producto	Agregado	Controles durante el proceso (*controles críticos durante el proceso)
1	Mezclador vibrador	Mezcla de graneles monovalentes	Poliovirus monovalente tipo 1, 2 o 3	
2		Dilución	Medio 199 + Tween 80 (25 mg/ml), pH 7,0	Antígeno D*, carga bacteriana*
3	Sistema de filtración	Filtración estéril		Inactivación*, antígeno D, formaldehído libre*, albúmina de suero bovino*, nitrógeno proteico*, endotoxina*
4		Llenado de envases tipo B10/B20		pH, osmolaridad, antígeno D*, esterilidad*
5		Verificación de especificaciones para el granel		


1.2 Descripción del proceso

Los pasos del proceso de producción se describen en los párrafos que siguen:

CAIF SA
 Dra. ~~Bernarda~~ **Belay**
 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 3 de 10
Descripción técnica y analítica del proceso de fabricación		

Paso 1: mezcla de graneles monovalentes

Sobre la base del contenido de antígeno D, determinada cantidad de las tres mezclas monovalentes se transfiere en condiciones asépticas a un recipiente estéril de vidrio para transporte. De acuerdo con la cantidad transferida, el granel trivalente tendrá la siguiente concentración:

- Virus poliomiélfítico inactivado tipo 1 400 UD/ml
- Virus poliomiélfítico inactivado tipo 2 80 UD/ml
- Virus poliomiélfítico inactivado tipo 3 320 UD/ml

Paso 2: dilución

A continuación, se agrega medio 199 hasta alcanzar el volumen necesario. El medio 199 (pH = 7,0) se suplementa con 25 mg/L de Tween 80. El granel trivalente se mezcla durante 30 minutos a temperatura ambiente con un mezclador vibrador, hasta lograr una suspensión homogénea. Se toma una muestra para determinar el contenido de antígeno D y la carga bacteriana.

Paso 3: filtración estéril

Se enjuaga un filtro estéril de 0,22 µm con medio 199 estéril suplementado con 25 mg/ml de Tween 80. El granel homogeneizado se pasa por el filtro.

Paso 4: llenado de envases tipo B10/B20

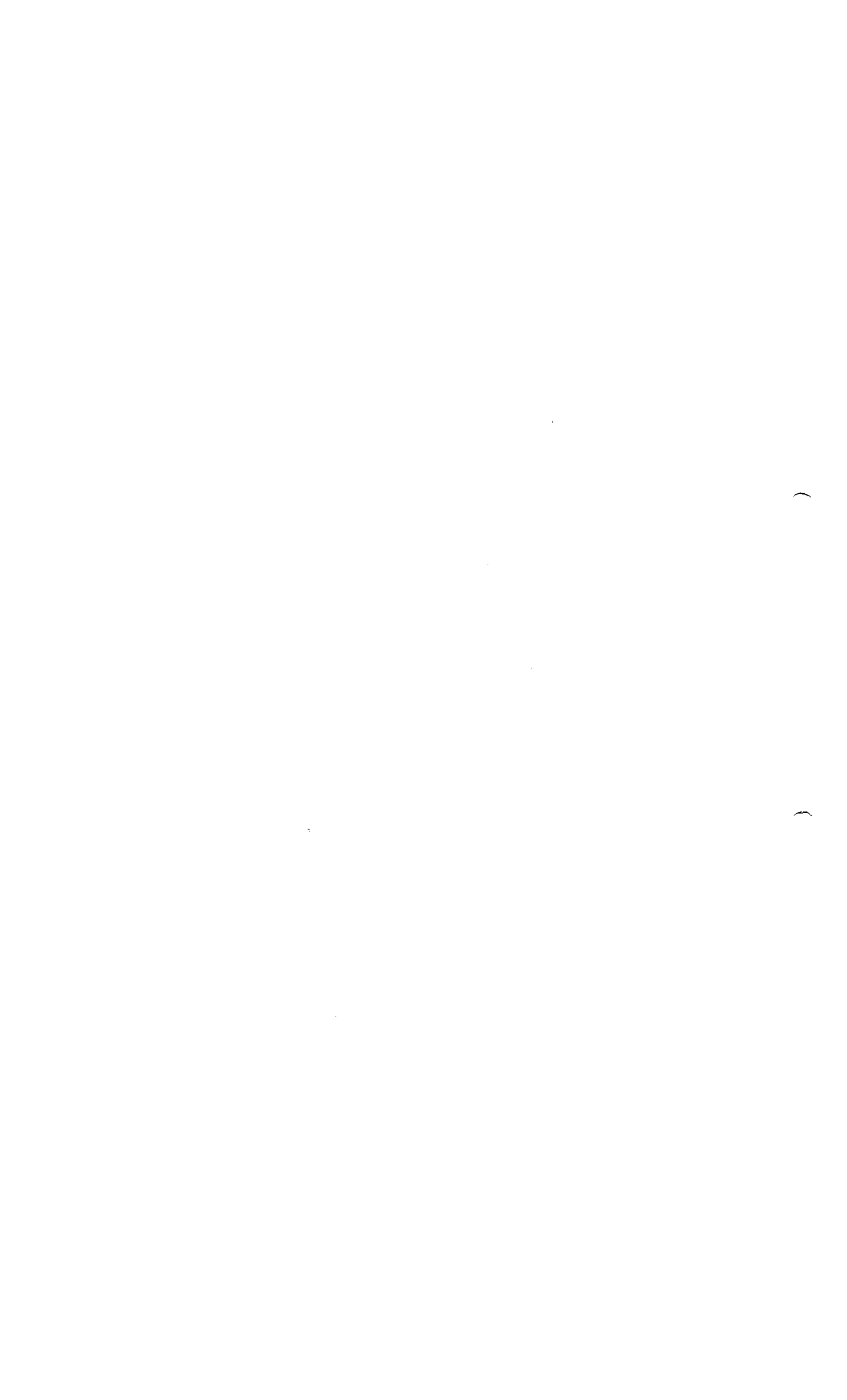
Inmediatamente después de la filtración estéril, el granel se coloca en frascos estériles de vidrio tipo B10 o B20 a temperatura ambiente. Se toman muestras para realizar las pruebas de control (consulte la sección 1.4 más adelante).

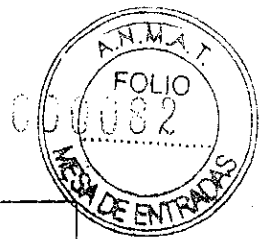
Paso 5: verificación de especificaciones para el granel trivalente final


Verificación de especificaciones para el granel trivalente final.

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

CAIF
Compañía Argentina de
Investigaciones Farmacéuticas S.A.
Dra. María Bernarda Belay
Aptoderada
DNI 39378925



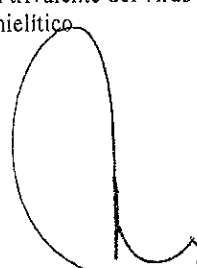


	Vacuna antipoliomielítica inactivada, suspensión inyectable, Bilthoven Biologicals B.V.	IPV/NC/AR/09-12 Página 4 de 10
Descripción técnica y analítica del proceso de fabricación		


2 Producción del granel final y de lotes finales de la VPI

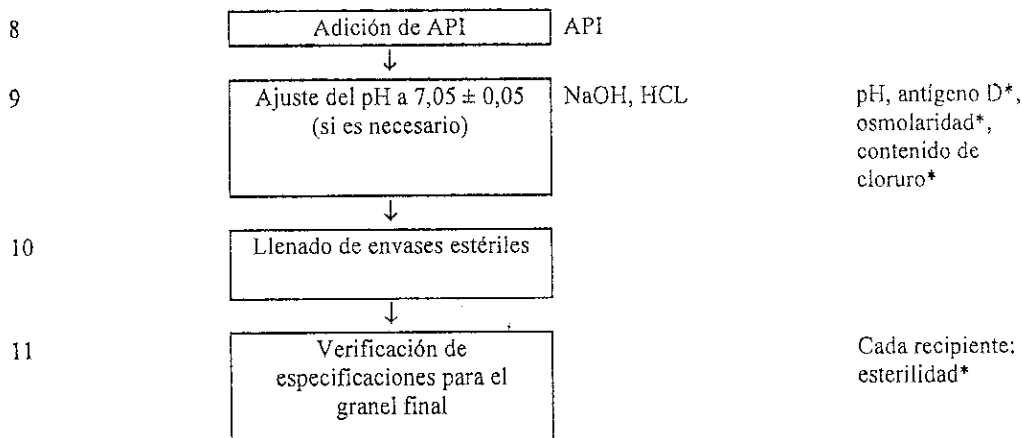
2.1 Organigrama del granel final de la vacuna antipoliomielítica inactivada

Paso	Equipo técnico	Paso del proceso/producto	Agregado	Controles durante el proceso (*controles críticos durante el proceso)
1	Recipiente, mezclador vibrador	Calibración e instalación del medidor de pH Llenado del recipiente con API	API	
2		Esterilización del recipiente		
3	Mezclador vibrador	Adición de solución amortiguadora concentrada de fosfato de sodio y líquido de dilución concentrado	Solución amortiguadora concentrada de fosfato de sodio y líquido de dilución concentrado	pH*, esterilidad
4		Ajuste del pH a 6,9 (si es necesario)	NaOH, HCL	
5	Mezclador vibrador	Adición de 2-fenoxietanol y mezcla	2-fenoxietanol	
6	Mezclador vibrador	Adición de formaldehído y mezcla	Solución de formaldehído	
7		Adición del granel trivalente	Granel trivalente del virus poliomielítico	


 CAIF
 Compañía Argentina de Investigaciones Farmacéuticas S.A.
 Dra. María Bernarda Belay
 Apoderada
 DNI 291.8925



	<p>Vacuna antipoliomielítica inactivada, suspensión inyectable, Bilthoven Biologicals B.V.</p>	<p>IPV/NC/AR/09-12 Página 5 de 10</p>
<p>Descripción técnica y analítica del proceso de fabricación</p>		



2.2 Descripción del proceso

Los pasos del proceso de producción se describen en los párrafos que siguen.

Paso 1: llenado del recipiente

El medidor de pH se calibra y se instala en el recipiente. El recipiente (recipiente de acero inoxidable de 200 o 500 litros) se arma y se llena con agua para inyectables (API), utilizando un filtro hidrofílico estéril de 0,22 μm (PALL).

Paso 2: esterilización del recipiente

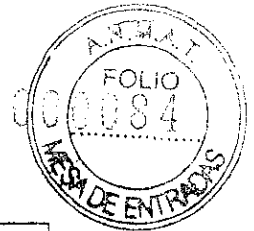
El recipiente y los sifones se esterilizan por circulación de vapor en la camisa del recipiente (15 min, 121 °C, 1,1 bar). Durante la esterilización, el contenido del recipiente se revuelve con un mezclador vibrador. Después de la esterilización, el contenido del recipiente se enfría a 2-8 °C y se saca el agua para inyectables hasta alcanzar el peso necesario. Asépticamente, se conecta un sistema de muestreo con el recipiente.


Paso 3: adición de solución amortiguadora concentrada de fosfato de sodio y líquido de dilución concentrado

La solución amortiguadora concentrada de fosfato de sodio y el líquido de dilución concentrado se agregan al agua para inyectables, y se revuelve de manera constante. Se toma

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 29378925



	Vacuna antipoliomielítica inactivada, suspensión inyectable, Bilthoven Biologicals B.V.	IPV/NC/AR/09-12 Página 6 de 10
Descripción técnica y analítica del proceso de fabricación		

una muestra para determinar el pH y realizar las pruebas de esterilidad. Consulte la sección P.4.1: Especificaciones para conocer la composición de la solución amortiguadora concentrada de fosfato de sodio y del líquido de dilución concentrado.

Paso 4: ajuste del pH (si es necesario)

Cuando es necesario, el pH se ajusta a 6,9 con una solución de hidróxido de sodio o ácido hidroclorehídrico.

Paso 5: adición del conservante, 2-fenoxietanol

Se agrega 2-fenoxietanol a través de un puerto de entrada esterilizado.

Paso 6: adición del conservante, formaldehído

Se agrega una solución de formaldehído a través de un puerto de entrada esterilizado. Se mezcla el contenido del recipiente.

Paso 7: adición del granel trivalente del virus poliomiélfítico

Se coloca en el recipiente el granel trivalente del virus poliomiélfítico.

Paso 8: adición de API

Se agrega la cantidad necesaria de agua para inyectables hasta alcanzar el peso final. Se toma una muestra para determinar el pH.


Paso 9: ajuste del pH (si es necesario)

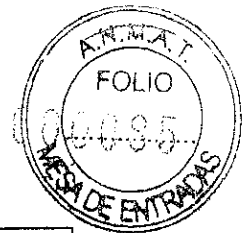
Cuando es necesario, el pH se ajusta a $7,05 \pm 0,05$ con una solución de hidróxido de sodio o ácido hidroclorehídrico.


Paso 10: toma de muestras y llenado de envases para el transporte

El granel final se transfiere asépticamente a recipientes estériles de acero inoxidable marcados o a frascos de vidrio.

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 29578925



	Vacuna antipoliomielítica inactivada, suspensión inyectable, Bilthoven Biologicals B.V.	IPV/NC/AR/09-12 Página 7 de 10
Descripción técnica y analítica del proceso de fabricación		


Paso 11: verificación

Nuevamente, se toman muestras de cada recipiente para realizar pruebas de esterilidad.
Hasta el momento del llenado, el producto se almacena a 2-8 °C.


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





	<p>Vacuna antipoliomielítica inactivada, suspensión inyectable, Bilthoven Biologicals B.V.</p>	<p>IPV/NC/AR/09-12 Página 8 de 10</p>
<p>Descripción técnica y analítica del proceso de fabricación</p>		

3. Llenado (= producción del lote final)

3.1. Organigrama y controles durante el proceso

Pasos de la producción		Controles durante el proceso (*controles críticos durante el proceso)
<p>1 Antes del llenado ↓</p>	<p>Esterilización de los envases Pregasificación de los envases con nitrógeno Ajuste del pH a $7,05 \pm 0,05$ (si es necesario)</p>	<p>pH, carga bacteriana*</p>
<p>2 Filtración del granel Proceso de llenado ↓</p>	<p>Al comienzo Al final Cada 30 minutos Al azar</p>	<p>Esterilidad, pH Esterilidad, pH Control del volumen*</p>
<p>3 Después del llenado</p>		<p>Inspección visual del envasado*</p>

Paso 1: antes del llenado

El llenado aséptico se hace en una habitación limpia de clase B con clase A en el área de llenado.


Los viales (después del enjuague con agua para API) se esterilizan por calor seco durante 1 hora a 180 °C en cartuchos cerrados y se pregasifican con nitrógeno esterilizado por filtración. Los tapones de goma se esterilizan por vapor durante 15 minutos a 121 °C.

Las ampollas se abren con quemadores de gas natural y se pregasifican con nitrógeno esterilizado por filtración.

Cuando es necesario, el pH se ajusta a $7,05 \pm 0,05$.

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



	Vacuna antipoliomielítica inactivada, suspensión inyectable, Bilthoven Biologicals B.V.	IPV/NC/AR/09-12 Página 9 de 10
Descripción técnica y analítica del proceso de fabricación		

Paso 2: proceso de llenado

La vacuna se pasa por un filtro de 0,22 μ m. El volumen de llenado se controla cada 30 minutos y, si es necesario, se ajusta.

Los viales se llenan con el granel final, se cierran con tapones de goma y se sellan con tapas de aluminio a presión. El volumen de llenado de los viales es de 0,6-0,7 ml (pérdida de volumen durante la extracción: 0,07 \pm 0,03 ml).

Las ampollas se llenan con el granel final y se sellan de inmediato. El volumen de llenado de las ampollas es de 0,6-0,7 ml.

Se toman muestras al comienzo, en la mitad y al final del proceso de llenado para realizar pruebas de control. Para comprobar la esterilidad, también se toman muestras al azar durante dicho proceso.

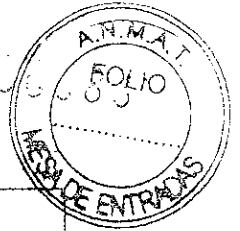
Paso 3: después del llenado


Cada vial y ampolla llenos se revisan visualmente. Se hace una inspección visual completa. Se desechan los viales y las ampollas defectuosos. La inspección visual se lleva a cabo en un área específica, que está separada del resto de las áreas de producción. Tras la inspección, el producto se almacena en cartuchos numerados y sellados, a 2-8 °C. Los viales y las ampollas se etiquetan de acuerdo con las especificaciones y se almacenan a 2-8 °C.

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

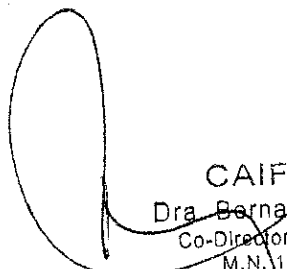


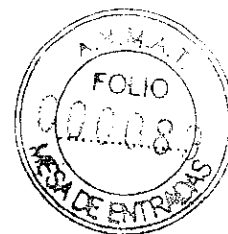



	Vacuna antipoliomielítica inactivada, suspensión inyectable, Bilthoven Biologicals B.V.	IPV/NC/AR/09-12 Página 10 de 10
Descripción técnica y analítica del proceso de fabricación		

4. Almacenamiento y etiquetado

El lote final compuesto por viales y ampollas se etiqueta, se embala y se almacena a 2-8 °C.


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



	<p align="center">Módulo 3. Calidad</p> <p align="center">3.2.S PRINCIPIO ACTIVO</p> <p align="center">Mezclas monovalentes de la vacuna antipoliomielítica inactivada, Bilthoven Biologicals B.V.</p>	<p align="center">IPV/NC/AR/09-12</p> <p align="center">Página 1 de 1</p>
<p>3.2.S.3.2. Impurezas</p>		

1 Impurezas

Las posibles impurezas relacionadas con el proceso de fabricación del principio activo son el ADN residual procedente de células huésped, impurezas de proteínas de células huésped o el medio de cultivo celular y el poliovirus vivo.

El ADN residual de células huésped está limitado por la especificación para el principio activo de menos de 100 pg/dosis para humanos. La prueba de control para el ADN residual de células huésped se describe en el Módulo 3.2.S.4.2: Procedimientos analíticos.

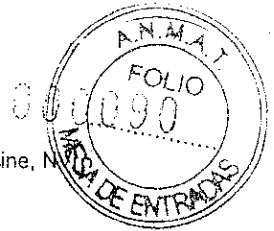
La albúmina residual de suero bovino derivada del medio de cultivo celular se mantiene controlada durante la producción a un máximo de 50 ng/dosis. Se hace una prueba de control en el granel trivalente de la VPI, que se describe en el Módulo 3.2.P.3.4: Control de pasos críticos y productos intermedios.

Se ha desarrollado una prueba para detectar proteínas residuales de células huésped. Esta prueba se basa en un ensayo de transferencia de puntos teñidos con anticuerpos de PCH Vero. Las muestras de mezclas monovalentes antes y después de la purificación demuestran que la eliminación de PCH es eficaz y constante durante el proceso de purificación de la VPI. La eliminación de PCH después de la cromatografía de exclusión por tamaño y la cromatografía de intercambio iónico fue superior al 99,9 % en todos los lotes analizados. La cantidad de PCH residual en las mezclas monovalentes analizadas es de menos de 0,5 µg/ml. No se observaron diferencias de importancia para las producciones de los tres tipos de poliovirus. Los resultados se incluyen en el informe de determinación y eliminación de PCH en los apéndices de IPV3.2.S.3.2.

La presencia de poliovirus vivo después de la inactivación de las mezclas monovalentes típicamente se controla mediante la especificación de liberación para la inactivación efectiva del principio activo. Los requisitos no admiten sospechas de efectos citopatológicos que indiquen la presencia de virus vivos.

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 29378925



NVI

nederlands vaccin instituut

Rapport

RAP-21890

Versie: 1

Determination of host cell proteins during production of
monovalent pools IPV

Blad 1 van 17

Algemene gegevens

Oude code

Expiratietermijn 15 jaar

Beheer Documentenbeheer

Trefwoorden HCP, poliomyelitis vaccine

Autorisatie

Dit document is geautoriseerd met het documentbeheersysteem Quality On-line. Het autorisatieproces is uitgevoerd volgens procedure SOP-20091.

Dit document is opgesteld door Bert Zomer in de functie van onderzoeker.

Functie	Naam	Handtekening	Datum
Voor akkoord	Documentbeheerder		

Goedgekeurd door

Distributie

Fysieke kopie aan: nvt

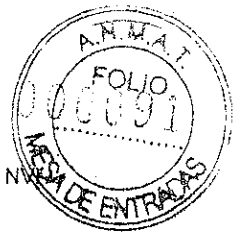
Wijzigingshistorie

Versie	Datum	Gewijzigd
1		Nieuw document

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

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





NVI
nederlands vaccin instituut

Rapport

RAP-21890

Versie: 1

Determination of host cell proteins during production of monovalent pools IPV

Blad 2 van 17

Table of contents

1.	Summary	3
2.	Introduction	4
3.	Materials and methods	5
3.1.	Production of HCP mix and polyclonal anti HCP-mix antibodies	5
3.2.	Sample materials	5
3.3.	Dot Blotting	6
3.3.1.	Reagents	6
3.3.2.	Sample dilutions	6
3.3.3.	Preparation of calibration standards	7
3.3.4.	Dot-blot procedure	7
3.3.5.	Data analysis	7
3.4.	SDS page and Western Blotting (used as control test)	8
3.4.1.	Reagents	8
3.4.2.	SDS page and Western blot procedure	8
4.	Results and Discussion	9
4.1.	Qualification of dot blot test	9
4.1.1.	Specificity of polyclonal antibodies	9
4.1.2.	Linearity and range	10
4.1.3.	Reproducibility and accuracy	14
4.1.4.	Conclusion qualification of dot blot analysis	14
4.2.	HCP determination in IPV production fraction 2.1, 3.1 and 5.1.	14
4.2.1.	IPV production fraction 2.1	14
4.2.2.	IPV production fraction 3.1	14
4.2.3.	IPV production fraction 5.1	15
4.3.	Clearance of HCP during production	15
5.	Conclusions	17
6.	Archive location raw data	17

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





NVI

nederlands vaccin instituut



Rapport

RAP-21890

Versie: 1

Determination of host cell proteins during production of
monovalent pools IPV

Blad 3 van 17

1. Summary

A dot blot method has been developed for quantitative determination of host cell proteins (HCP,s) during the production of inactivated poliomyelitis vaccine (IPV).

The method has been qualified as follows:

- quantification range of 0.19-3.8 µg/mL
- accuracy is 80-120%
- Reproducibility as CV <30%

HCPs were measured in poliomyelitis virus culture samples of 9 production fractions 2.1 (after clarification and concentration), 9 production fractions 3.1 (after size exclusion chromatography) and 9 production fractions 5.1 (after ion exchange chromatography and sterile filtration). Three batches of each type of poliomyelitis vaccine were used.

On average production fraction 2.1 samples contain 13 mg/mL HCP, production fraction 3.1 samples contain 0.27 mg/mL HCP, while samples of production fraction 5.1 contain less than 0.5 µg/mL HCP. Since the volume in fraction 5.1 is comparable to the volume in fraction 6.1, we conclude that monovalent pools of IPV contain less than 0.5 µg/mL HCP. No significant differences could be observed for the three different types of poliovirus productions.

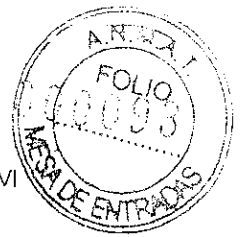
Clearance of HCP after size exclusion chromatography and ion exchange chromatography was higher than 99.9% in all tested batches.

It can be concluded that during IPV production HCP is cleared efficiently by the combination of size exclusion chromatography and ion exchange chromatography. The removal of HCP is consistent for all three types of poliovirus.

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





Rapport

RAP-21890

Versie: 1

Determination of host cell proteins during production of
monovalent pools IPV

Blad 4 van 17

2. Introduction

During poliovirus cultivation the vero host cells lyse. Proteins are released into the medium and cell fragments detach from the micro carriers. Cell fragments and host cell proteins are removed during down stream processing (DSP). DSP consists of filtration and chromatographic purification steps (Table 1). Traces of host cell proteins (HCP's) however will remain in the monovalent pools. We investigate the amount of residual host cell proteins and the effect of the filtration and purification steps on the removal of the host cell proteins.

In order to do so it was decided to use the technique of dot blot. Shortly, dot blotting consists of the following steps:

1. Sample or standard materials are spotted on a nitrocellulose membrane
2. The membrane is incubated with anti-HCP antibody
3. The membrane is washed to remove non-specifically bound materials
4. The membrane is incubated with second antibody labeled with horseradish peroxidase (HRP)
5. The membrane is washed to remove non-specifically bound materials
6. As an HRP signal reagent a chemiluminogenic reaction based on GZ-11 is used (Quantitative western blotting using a GZ-11 based chemiluminogenic signal reagent. G Zomer *et al* in Proceedings of the 14th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence. Ed AA Szalay, PJ Hill LJ Kricka PE Stanley 2006: 171-4)
7. After addition of the signal reagent the glowing membrane is imaged and the resulting image of the blots is quantified

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





nederlands vaccin instituut

Rapport

RAP-21890

Versie: 1

Determination of host cell proteins during production of
monovalent pools IPV

Blad 5 van 17

Table 1. Production stages of IPV monovalent pools

Code	Stage
Fraction 0.1	After cultivation
Fraction 1.1	After clarification (0.22 µm)
Fraction 2.1	After concentration 100 kD
Fraction 3.1	After size exclusion chromatography
Fraction 4.1	After ion exchange chromatography
Fraction 5.1	After sterile filtration (0.22 µm)
Fraction 6.1	After inactivation

3. Materials and methods

3.1. Production of HCP mix and polyclonal anti HCP-mix antibodies

The polyclonal rabbit anti-HCP serum was obtained by a cascade immunization of rabbits with a HCP mix from Vero cells. Three days before immunization blood was obtained from the rabbits. This pooled serum serves as pre-immune rabbit serum (NKS)

- The HCP mix, a blank culture of Vero cells is 3 times frozen and thawed to induce cell lysis. The culture supernatant was pooled and filtered. The pore size of the filters was comparable with these used during the IPV Vero production process. The HCP mix was aliquot, rapid frozen using dry ice and stored at -70°C until use.
- Rabbit anti-HCP serum: 3 rabbits were immunized with the HCP-mix and received a booster with the same HCP mix after 28 days. On day 42 blood samples were collected. Using the antibodies as an affinity column the immunodominant proteins have been removed from the HCP-mix. The treated HCP-mix is used to immunize the 3 rabbits again on day 56. The same procedure was performed with serum of day 77 to immunize at day 85. The rabbits were given a booster on day 121 followed by collection blood on day 135. The pooled serum of day 135 is used in this study as anti-HCP serum.

3.2. Sample materials

The poliomyelitis virus culture samples that were studied are presented in table 1. Fraction 2.1 is the fraction obtained after clarification (filtration through a three-step in-line filter unit containing 75 µm, 0.45 µm and 0.22 µm filters) and concentration (over a 100kD cut off filter), fraction 3.1 is the fraction obtained after purification (using gel filtration and anion exchange chromatography), fraction 5.1 is the fraction after addition of medium 199 and sterile filtration). Fraction 5.1 was used instead of 6.1 because the latter is formaldehyde treated. The reactivity of the antiserum may be different with formaldehyde treated material. Because the HCP content will not change from 5.1 to 6.1, it was decided to test upstream, i.e. in fraction 5.1.

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

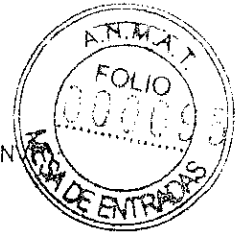
5

6



NVI

nederlands vaccin instituut



Rapport

RAP-21890

Versie: 1

**Determination of host cell proteins during production of
monovalent pools IPV**

Blad 6 van 17

Table 2: IPV sample materials used during this study

batch number	Monovalent pool IPV	Polio type	Production fraction	Production fraction	Production fraction
PV07	131	1	2.1	3.1	5.1
PV07	132	1	2.1	3.1	5.1
PV07	133	1	2.1	3.1	5.1
PV07	216	2	2.1	3.1	5.1
PV07	217	2	2.1	3.1	5.1
PV07	218	2	2.1	3.1	5.1
PV07	325	3	2.1	3.1	5.1
PV07	326	3	2.1	3.1	5.1
PV07	327	3	2.1	3.1	5.1

3.3. Dot Blotting

3.3.1. Reagents

- Wash buffer: Phosphate buffered saline 10mM, pH 7.3 (PBS) containing 0.1% Tween20, pH 7.3 (PBST)
- Assay buffer: Wash buffer containing 0.5% (w/v) of Protifar
- Polyclonal anti-HCP (see 2.1)
- 2ndAb.HRP (monoclonal anti rabbit IgG (γ -chain specific) HRP conjugate

3.3.2. Sample dilutions

- IPV production fraction 2.1 samples (see table 1) are initially diluted about 5000x using weight of samples and diluents. From this stock, four independent dilutions are prepared using calibrated pipettes as follows (table 3):

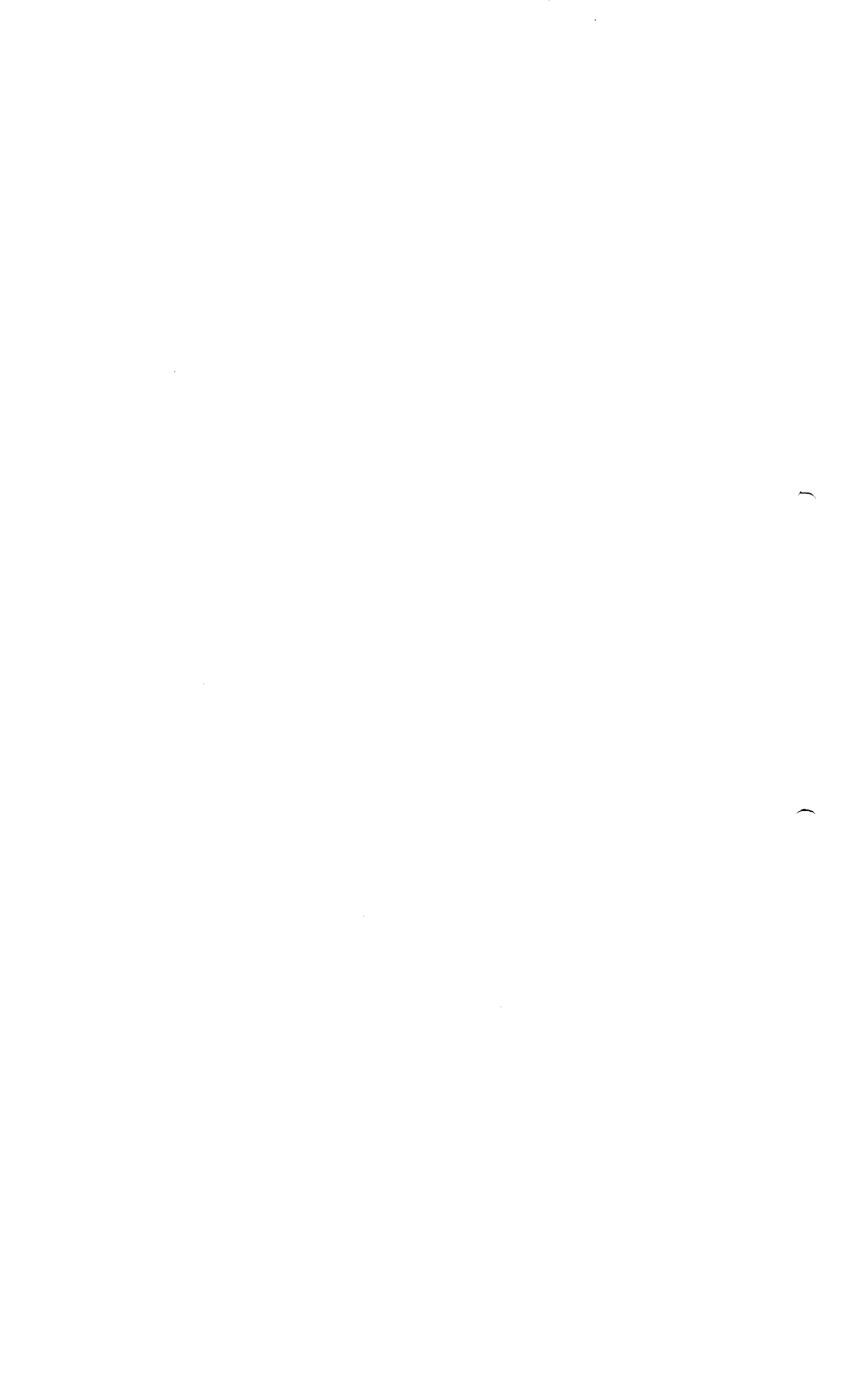
Table 3: preparation of 2.1 sample dilutions

μ l of sample	μ l of PBS
50	450
150	350
250	250
350	150

- IPV production fraction 3.1 samples (see table 2) are initially diluted about 100x using weight of samples and diluents. From this stock, four independent dilutions are prepared using calibrated pipettes as follows (table 3).
- IPV production fraction 5.1 samples are used undiluted, and after pretreatment with 0.015% hydrogen peroxide (final volume) in order to pre-oxidize possibly interfering anti-oxidants that were present in the samples

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

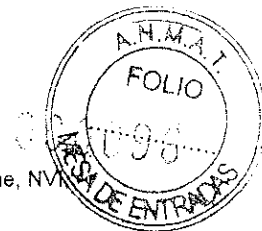
LABA
Compañía Argentina de
Investigaciones Farmacéuticas S.A.
Dra. ~~Maria Bernarda Belay~~
Apoderada
DNI 29378925





NVI

nederlands vaccin instituut



Rapport

RAP-21890

Versie: 1

**Determination of host cell proteins during production of
monovalent pools IPV**

Blad 7 van 17

3.3.3. Preparation of calibration standards

- HCP-mix (concentration 0.76 mg/mL, determined by a biocinchonic acid assay) is initially diluted about 100x using weights of standard and diluent. From this stock, seven independent dilutions and a blank are prepared using calibrated pipettes as follows (table 4).

Table 4: preparation of HCP calibration standards

µl of stock	µl of PBS
500	500
400	600
300	700
200	800
100	900
50	950
25	975
0	1000

3.3.4. Dot-blot procedure

- Suitably diluted (in PBS) samples (see 2.3.1 and 2.3.2) or standards (see 2.3.3, 50µL) were applied to a nitrocellulose membrane using an ELIFA Unit.
- After washing with 200 µL of PBS buffer, the membrane was incubated with polyclonal anti-HCP (see 2.1, 1:300 in assay buffer) during one hour with gentle shaking.
- After washing with wash buffer, the membrane was incubated with 2ndAb.HRP (1:100,000 in assay buffer) during one hour with gentle shaking.
- The membrane was washed (4 x) with wash buffer.
- Signal reagent was prepared by adding 4-phenylphenol (5 mg/mL, 40µL) and GZ-11 (7 mg/mL, 50 µL) to 5 mL of PBS containing 0.1 mM EDTA and 0.1 % Triton-X-100. To the signal reagent was added 5 mL of Na-acetate buffer, 160 mM, pH 6, containing 0.015% of hydrogen peroxide. The resulting mix was added to the membrane, and after incubating for 5 minutes, decanted. The glowing membrane was measured in a chemiluminescent imager. Resulting images were stored as TIF-files.

3.3.5. Data analysis

- Image files are loaded into Image J software.
- The image is inverted giving dark dots against a light background
- Rectangular row selections are made and converted to profiles
- From the profiles peak areas are measured
- Peak areas are exported to MS-Excel
- MS-Excel routines are used for regression, 4 parameter fits, and further calculations. Sample concentrations were calculated from 5 out of the 8 available data points per sample. The three data points that differed most from the average were excluded from the calculation. Because of the low HCP-concentrations in 5.1 samples, a limited number of calibration standards ranging from 0.16-0.64 µg/mL were used. In this concentration range a linear calibration curve could be used.

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

CAIF
 Compañía Argentina de
 Investigaciones Farmaceuticas S.A.
 Dra. Maria Bernarda Belay
 Apoderada
 DNI 24.378925





NVI
nederlands vaccin instituut

Rapport

RAP-21890

Versie: 1

Determination of host cell proteins during production of
monovalent pools IPV

Blad 8 van 17

3.4. SDS page and Western Blotting (used as control test)

3.4.1. Reagents

- Electrophoresis buffer: Tris 25mM, Glycine, 192 mM, SDS, 0.1% ((w/v), pH 8.3.
- SDS-gels: 12% Tris-HCl precast
- Molecular weight markers ranging from 31-200kD
- Western Blot buffer Tris 25mM, Glycine 192 mM, Methanol (20%, v/v), pH 8.3
- Nitrocellulose membrane
- Wash buffer: Phosphate buffered saline 10mM, pH 7.3 (PBS) containing 0.1% Tween20, pH 7.3 (PBST)
- Assay buffer: Wash buffer containing 0.5% (w/v) of Protifar
- Polyclonal anti-HCP (see 2.1)
- 2ndAb.HRP (monoclonal anti rabbit IgG(γ-chain specific) HRP conjugate

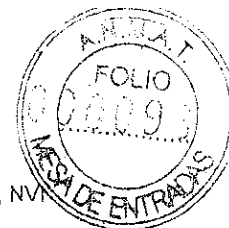
3.4.2. SDS page and Western blot procedure

- A suitable amount of sample was first precipitated using a 72% w/w trichloroacetate (TCA)-solution. The final concentration of TCA after mixing with sample is 7.2%.
- The samples were thoroughly vortexed followed by centrifugation
- The supernatant was carefully removed and 15 µL of reducing buffer was added.
- The samples were thoroughly vortexed and placed in a thermostat at 100°C during 5 minutes. After this the samples were centrifuged for a few seconds, only to let the liquid in the top of the sample container to be spun down.
- The slots of the precast gel were loaded with 15 µL of sample. Molecular weight markers used as a reference were loaded with 7 µL .
- After electrophoresis the gel was washed with water and either coloured with a coomassie blue staining or the western blot procedure as follows was started.
- The gel was washed again with blot buffer
- Via a cold tank transfer in blotting buffer a Western Blotting was performed
- After washing with µLPBS buffer, the membrane was incubated with polyclonal anti-HCP (see 2.1, 1:100 in assay buffer) during one hour with gentle shaking.
- After washing with wash buffer, the membrane was incubated with 2ndAb.HRP (1:100,000 in assay buffer) during one hour with gentle shaking.
- The membrane was washed (4 x) with wash buffer.
- Signal reagent was prepared by adding 4-phenylphenol (5 mg/mL, 40µL) and GZ-11 (7 mg/mL, 50 µL) to 5 mL of PBS containing 0.1 mM EDTA and 0.1 % Triton-X-100. To the signal reagent was added 5 mL of Na-acetate buffer, 160 mM, pH 6, containing 0.015% of hydrogen peroxide. The resulting mix was added to the membrane, and after incubating for 5 minutes, decanted. The glowing membrane was measured in a chemiluminescent imager.
- The resulting image was saved as a TIF-file and analyzed using Image-J software.

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





NVI

nederlands vaccin instituut

Rapport

RAP-21890

Versie: 1

Determination of host cell proteins during production of
monovalent pools IPV

Blad 9 van 17

4. Results and Discussion

4.1. Qualification of dot blot test

4.1.1. Specificity of polyclonal antibodies

From Western blots (figure 1) and SDS-PAGE gel (figure 2) it is clear that the polyclonal anti-HCP antibodies recognize vero host-cell proteins. In the western blot the HCP mix shows two main bands at about 35-38 kD together with minor bands e.g. at about 50 kD after staining with polyclonal anti-HCP antibodies. The production fraction 2.1 (figure 1, lane 2) and production fraction 3.1 (figure 1, lane 3) samples show almost super imposable bands, most of which are also present in the HCP-mix (figure 1, lane 4). Differences can probably be attributed to matrix effects (the HCP-mix was isolated from vero cells which had not been exposed to virus). The production fraction 5.1 sample (figure 1, lane 5) shows no HCP-related bands. The inverted bands indicated by VP1-3 are virus related proteins (see also figure 2), two of which are also visible in the 3,1 fraction (figure 1, lane 3). Lane 6 in figure 1 (normal rabbit serum) shows no response, indicating the absence of HCP in normal rabbit serum.

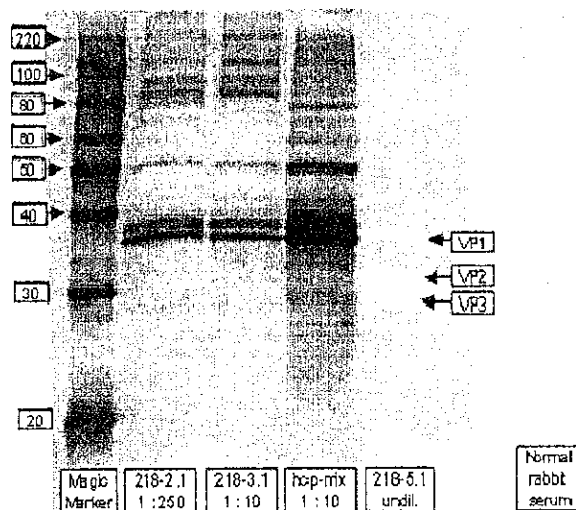
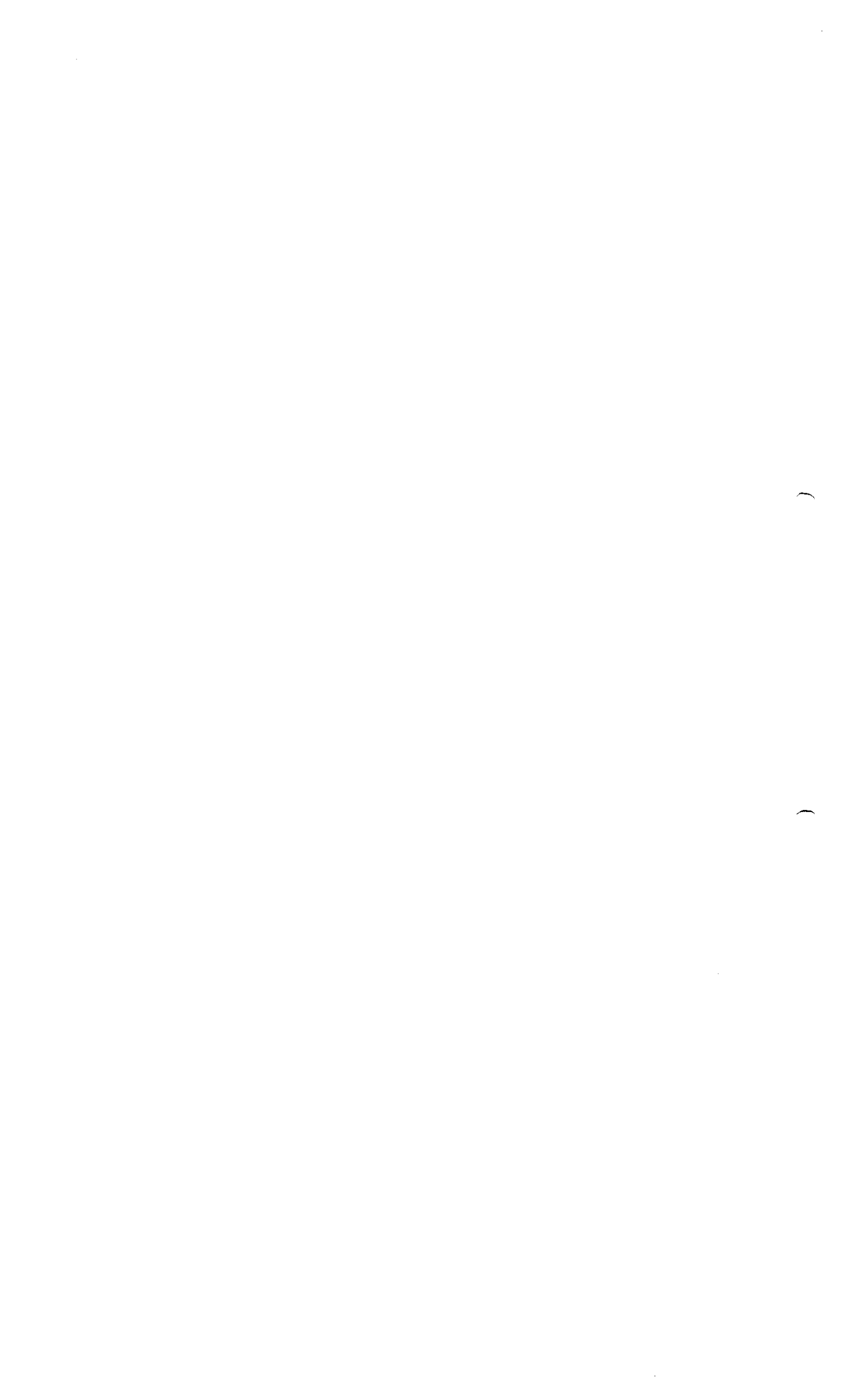


Figure 1: Western blot stained with HCP polyclonal antibodies.

Lane 1 contains mw markers, lane 2 is a sample of production fraction 2.1 (PV07.218) diluted 250 times, lane 3 contains a sample of production fraction 3.1 (PV07.218) diluted 10 times, lane 4 contains the HCP-mix diluted 10 times, lane 5 contains an undiluted sample of production fraction 5.1 (PV07.218). Lane 6 is empty and lane 7 contains normal rabbit serum as a negative control. Lane 8 is empty

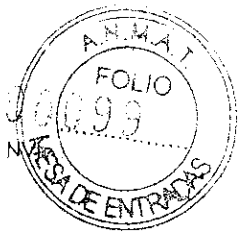
CAIF SA
Dra. Bernarda Belay
Co-Directora Técnica
M.N. 15.148
CAIF
Compañía Argentina de
Investigaciones Farmacéuticas S.A.
Dra. María Bernarda Belay
Apoderada
DNI 29378925





NVI

nederlands vaccin instituut



Rapport

RAP-21890

Versie: 1

Determination of host cell proteins during production of
monovalent pools IPV

Blad 10 van 17

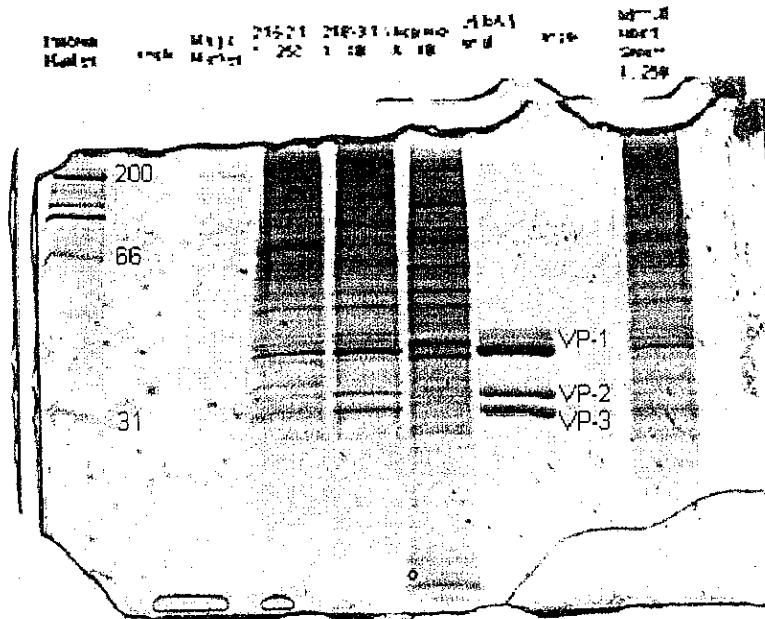


Figure 2: SDS-Page electrophoresis gel of Figure 1 after residual protein staining. Lane 1 protein markers, lane 2: empty, lane 3: magic marker (corresponds with lane 1 of figure 1), lanes 4-8 correspond with lanes 2-6 of figure 1. lane 4 is a sample of production fraction 2.1 (PV07.218) diluted 250 times, lane 5 contains a sample of production fraction 3.1 (PV07.218) diluted 10 times, lane 6 contains the HCP-mix diluted 10 times, lane 7 contains an undiluted sample of production fraction 5.1 (PV07.218). Lane 8 is empty while lane 9 contains normal rabbit serum as a negative control. Lane 10 is empty

When comparing figures 1 and 2 it is clear that during the purification process HCP's are cleared from the product: while virus proteins VP1-3 are faintly visible in production fraction sample 2.1 (Figure 2, lane 4), these proteins become increasingly abundant in production fraction sample 3.1 (figure 2, lane 5) and production fraction sample 5.1 (figure 2, lane 7) at the expense of host cell proteins.

4.1.2. Linearity and range

The dot blot in figure 3 shows dilution ranges of HCP mix and 2.1 and 3.1 IPV production fraction samples stained with HCP polyclonal antibodies.
The dot blot shows visible blots in a HCP mix range of 3.8-0.19 µg/mL.

CAIF SA
Dra. Bernarda Belay
Co-Directora Técnica
M.N. 15.124

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





NVI
nederlands vaccin instituut

Rapport

RAP-21890

Versie: 1

Determination of host cell proteins during production of monovalent pools IPV

Blad 11 van 17

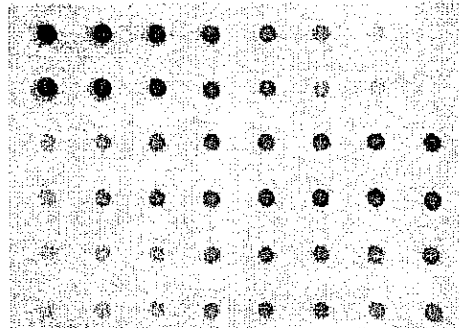


Figure 3: Dot blot stained with HCP polyclonal antibodies.

The top two rows are calibration standards of HCP mix in duplicate (7 dilutions from 3.8-0.19 µg/mL plus blank, from left to right). The third and fourth rows are 8 dilutions in duplicate (48,000-6,000, left to right) of a 2.1 IPV production fraction sample (PV-07.218), while the fifth and sixth rows are 8 dilutions in duplicate (2,000-250, left to right) of a 3.1 IPV production fraction sample (PV07.218).

Using ImageJ software the intensity of the dots can be quantified. In this example the dots in each row are converted to profile data as indicated in figure 4:

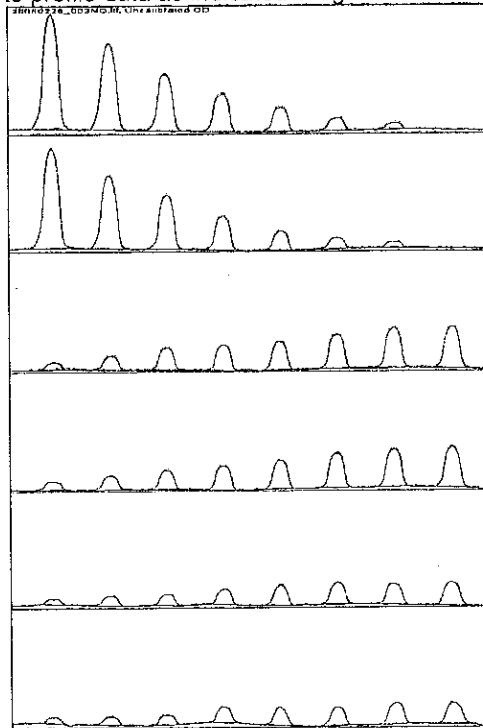
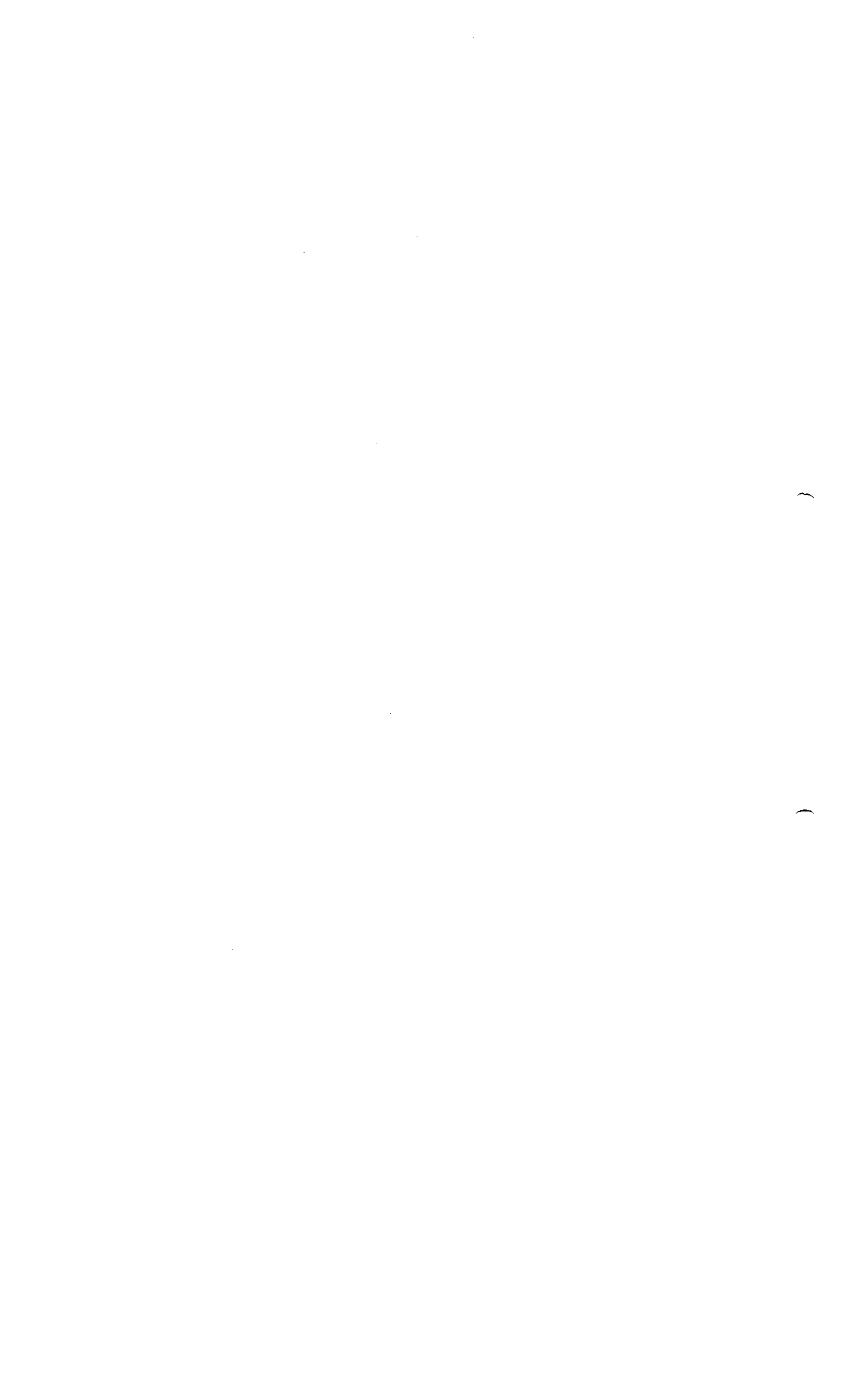
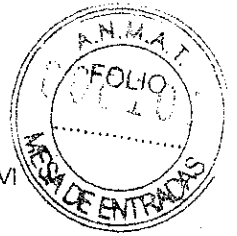


Figure 4: profile data of dot blot from figure 3.

From these profiles the areas of the peaks can be measured. The top two rows are calibration standards in duplicate (7 dilutions from 3.8-0.19 µg/mL plus blank, from left to right). The third and fourth rows are 8 dilutions in duplicate (48,000-6,000, left to right) of a 2.1 production fraction sample (PV-07.218), while the fifth and sixth rows are 8 dilutions in duplicate (2,000-250, left to right) of a production fraction 3.1 sample (PV07.218).

Dra. Bernarda Belay
Co-Directora Técnica
M.N. 15.148
C.A.F.P.
Compañía Argentina de
Investigaciones Farmacéuticas S.A.
Dra. María Bernarda Belay
ApoDERada
DNI 29378925





NVI
nederlands vaccin instituut

Rapport

RAP-21890

Versie: 1

Determination of host cell proteins during production of
monovalent pools IPV

Blad 12 van 17

From the profile data peak areas can be measured for each peak. The data are shown in table 5:

Table 5: peak areas (in arbitrary units (AU)) as obtained from the profile data of figure 4. The top two rows are calibration standards in duplicate (7 dilutions from 3.8-0.19 µg/mL plus blank, from left to right). The third and fourth rows are 8 dilutions in duplicate (48,000-6,000, left to right) of a 2.1 production fraction sample (PV-07.218), while the fifth and sixth rows are 8 dilutions in duplicate (2,000-250, left to right) of a production fraction 3.1 sample (PV07.218).

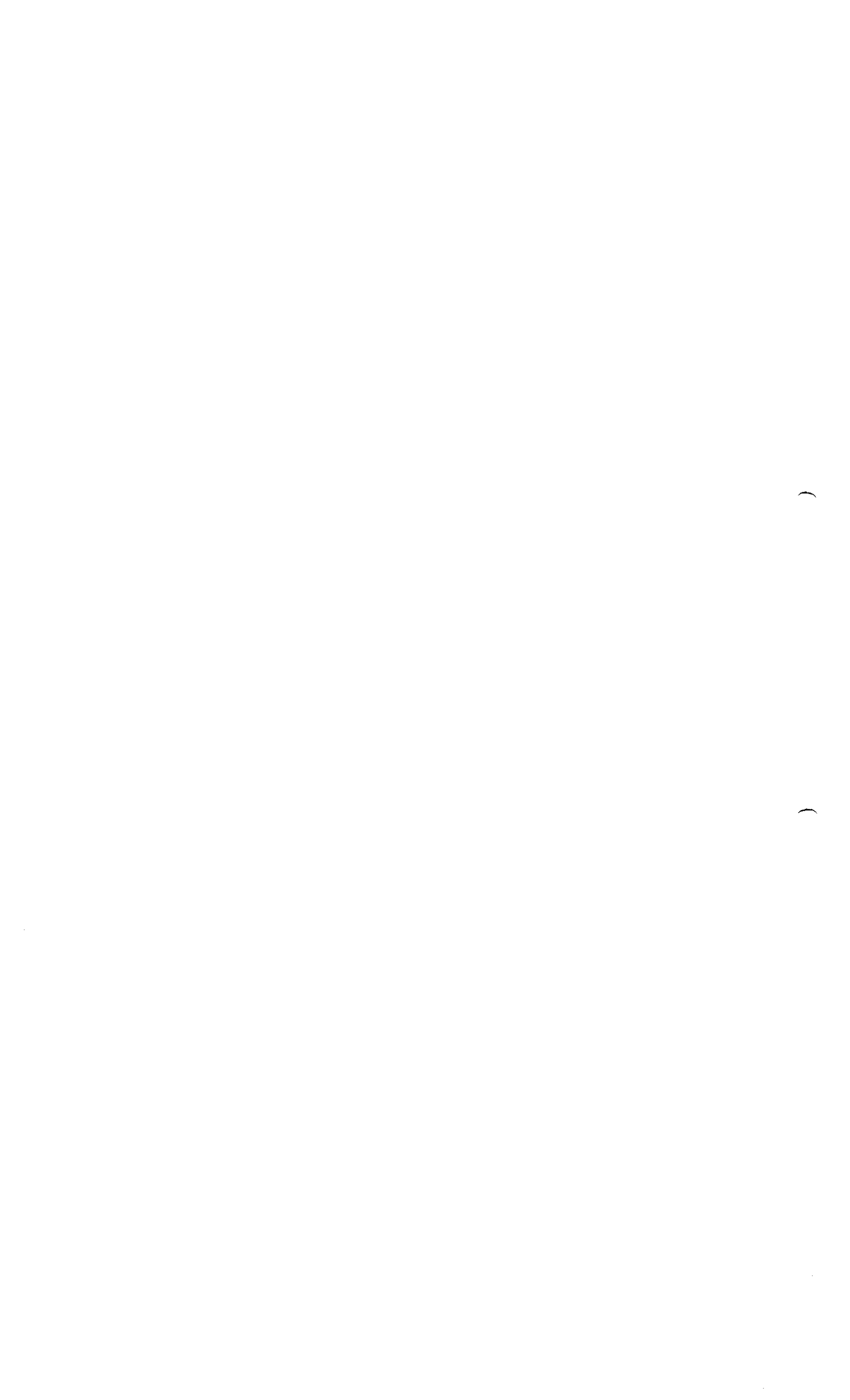
Cal.	4296	3255	2135	1464	929	483	231	0
Cal.	3852	2792	1969	1237	664	414	242	0
2.1	342	546	710	898	1042	1281	1418	1529
2.1	251	487	834	920	1011	1251	1497	1544
3.1	193	381	405	518	677	777	815	922
3.1	215	303	353	544	588	648	793	811

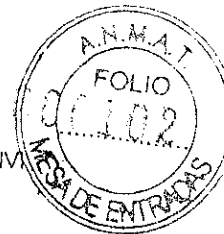
A calibration curve can be constructed by plotting the peak areas of the calibration standards against their concentrations (see table 6 for HCP calibration concentrations and sample dilution factors).

Table 6: Concentrations of HCP calibration standards in duplicate (rows 1-2), together with dilution factors of samples PV07.218 production fraction 2.1 in duplicate (rows 3-4) and production fraction PV07.218 3.1 in duplicate (rows 5-6), respectively

3.8	3.04	2.28	1.52	0.76	0.38	0.19	0	HCP mix dilutions µg/mL
3.8	3.04	2.28	1.52	0.76	0.38	0.19	0	HCP mix dilutions µg/mL
48228	24114	16076	12057	9646	8038	6890	6028	Fraction 2.1 dilutions
48228	24114	16076	12057	9646	8038	6890	6028	Fraction 2.1 dilutions
2034	1017	678	508	407	339	291	254	Fraction 3.1 dilutions
2034	1017	678	508	407	339	291	254	Fraction 3.1 dilutions

CAIF SA
Dra. Bernarda Belay
Co-Directora Técnica
M.N. 15.100.17
Compañía Argentina de
Investigaciones Farmacéuticas S.A.
Dra. María Bernarda Belay
Apoderada
DNI 29378925





Determination of host cell proteins during production of monovalent pools IPV

The calibration curve is shown in figure 5:

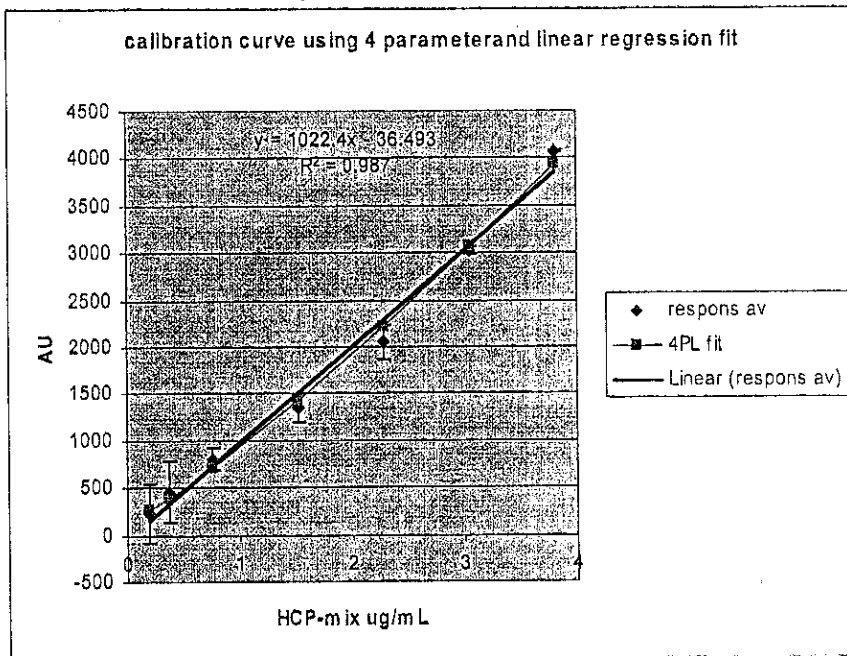


Figure 5: HCP calibration curves using linear regression and 4 parameter fit

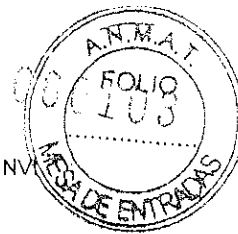
The linear range of the calibration line extends from 0.19 to 3.8 µg/mL. From this calibration curves sample concentrations can be calculated from their responses (see table 5), taking into account their dilution factors (see table 6). In this example the concentration HCP in each of the two samples can be calculated from 16 data points (eight dilutions in duplicate) using either linear or four parameter calibration. Results are shown in table 7:

Table 7: sample concentration using linear or four parameter fit using all data (n=16) or data without outliers (n=10)

n=16	linear calibration		4 parameter calibration	
	218 fraction 2.1	218 fraction 3.1	218 fraction 2.1	218 fraction 3.1
sample				
conc (µg/mL)	11741	310	11546	259
%CV	21%	31%	15%	18%

n=10	linear calibration		4 parameter calibration	
	218 fraction 2.1	218 fraction 3.1	218 fraction 2.1	218 fraction 3.1
sample				
conc (µg/mL)	10366	262	10834	252
%CV	8%	9%	7%	6%

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



NVI

nederlands vaccin instituut

Rapport

RAP-21890

Versie: 1

Determination of host cell proteins during production of
monovalent pools IPV

Blad 14 van 17

4.1.3. Reproducibility and accuracy

Reproducibility was deduced from repeating the analysis (data not shown). Variation coefficient is <30%. Accuracy was assessed from back-calculated concentrations of the standard line (data not shown). The accuracy is 80-120%.

4.1.4. Conclusion qualification of dot blot analysis

The dot blot analysis provides a test method with adequate sensitivity (0.19 µg/mL), linear range (0.19-3.8 µg/mL), reproducibility (CV<30%), and accuracy (80-120%) to allow quantification of HCP's in production samples 2.1, 3.1, and 5.1.

4.2. HCP determination in IPV production fraction 2.1, 3.1 and 5.1.

4.2.1. IPV production fraction 2.1

HCP concentrations in 9 IPV production fraction 2.1 samples are determined and presented in Table 8. The HCP concentrations are in the order of 10-20 mg/mL. No significant differences in HCP amount are observed between the different types of poliovirus. Protein concentrations as determined using a biocinchonic acid assay are in the same range (data not shown) Fraction 2.1 contains thus almost exclusively HCP.

Table 8: Results of HCP dot blot assay in IPV production fraction 2.1 samples.
The average of two dot blot assays is calculated

batch number	Polio type	HCP conc. in µg/mL (average)
PV07-131	1	7475*
PV07-132	1	10039
PV07-133	1	16449
PV07-216	2	13829
PV07-217	2	12185
PV07-218	2	11475
PV07-325	3	11504
PV07-326	3	13980
PV07-327	3	18677

* Sample is only tested once. An average could not be determined

4.2.2. IPV production fraction 3.1

HCP concentrations in 9 IPV production fraction 3.1 samples are determined and presented in Table 9. HCP concentrations range from about 0.19 – 0.35 mg/mL. No significant differences in HCP amount are observed between the different types of poliovirus. From the reduction of HCP concentration in fraction 3.1 compared to the HCP concentration in fraction 2.1, the conclusion can be drawn that size exclusion chromatography removes HCP (see also table 10). However still a remaining amount of HCP is present in fraction 3.1.

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





nederlands vaccin instituut

Rapport

RAP-21890

Versie: 1

Determination of host cell proteins during production of
monovalent pools IPV

Blad 15 van 17

Table 9: Results of the HCP dot blot assay in IPV production fraction 3.1 samples.
The average of two dot blot assays is calculated

batch number	Polio type	HCP conc. in µg/mL (average)
PV07-131	1	301
PV07-132	1	198
PV07-133	1	283
PV07-216	2	289
PV07-217	2	276
PV07-218	2	187
PV07-325	3	258
PV07-326	3	244
PV07-327	3	357

4.2.3. IPV production fraction 5.1

HCP concentrations in 9 IPV production fraction 5.1 samples are determined and presented in Table 10. HCP-concentrations in 5.1 samples are below 0.5 µg/mL in all 9 tested samples. HCP concentration is independent of poliovirus type. The results show that the ion exchange chromatography contributes to a good clearance of HCP (see also table 11).

Table 10: Results of the HCP dot blot assay in IPV production fraction 5.1 samples.

batch number	Polio type	HCP conc. µg/mL
PV07-131	1	0.11
PV07-132	1	0.07
PV07-133	1	0.10
PV07-216	2	0.32
PV07-217	2	0.14
PV07-218	2	0.44
PV07-325	3	0.14
PV07-326	3	0.12
PV07-327	3	0.19

4.3. Clearance of HCP during production

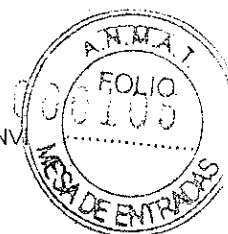
Table 11 gives an overview of the measured HCP-concentrations in IPV production fractions 2.1, 3.1, and 5.1. From this table it can be concluded that during production HCP is cleared efficiently by the combination of size exclusion chromatography and ion exchange chromatography. The removal of HCP is consistent for all three types of poliovirus.

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





NVI
nederlands vaccin instituut



Rapport

RAP-21890

Versie: 1

Determination of host cell proteins during production of
monovalent pools IPV

Blad 16 van 17

Table 11: Overview of HCP-concentrations in production fraction 2.1, 3.1, and 5.1

Batch number	Polio type	HCP concentrations (µg/mL)		
		Fraction 2.1	Fraction 3.1	Fraction 5.1
PV07-131	1	7475	301	0.11
PV07-132	1	10039	198	0.07
PV07-133	1	16449	283	0.10
PV07-216	2	13829	289	0.32
PV07-217	2	12185	276	0.14
PV07-218	2	11475	187	0.44
PV07-325	3	11504	258	0.14
PV07-326	3	13980	244	0.12
PV07-327	3	18677	357	0.19
average		12800	266	0.18
SD		2410	52	0.12

D antigen concentration are determined as in process controles during production. HCP clearance can be determined when the HCP amount is calculated in relation to the D antigen amount. Results for the process step going from 3.1 to 5.1 are shown in table 12.

Table 12: HCP clearance after ion exchange chromatography.
Clearance is calculated as $(1 - (\text{HCP}_{5.1}/\text{D-antigen}_{5.1} - \text{HCP}_{3.1}/\text{D-antigen}_{3.1})) * 100\%$

	3.1 D antigen /mL	3.1 HCP (µg /mL)	5.1 D antigen /mL	5.1 HCP (µg /mL)	clearance 3.1->5.1
PV07-131	7836	301	2548	0.11	99.9%
PV07-132	7690	198	2636	0.07	99.9%
PV07-133	na	283	na	0.10	na
PV07-216	2838	289	849	0.32	99.6%
PV07-217	2536	276	1090	0.14	99.9%
PV07-218	1745	187	937	0.44	99.6%
PV07-325	5647	258	1440	0.14	99.8%
PV07-326	5127	244	1243	0.12	99.8%
PV07-327	4416	357	1302	0.19	99.8%

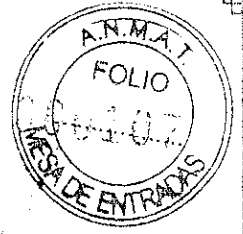
na=not available

HCP clearance after ion exchange chromatography was higher than 99.6% in all tested batches. No significant differences in clearance could be observed for the three different types of poliovirus productions.

HCP clearance after two purification steps (after size exclusion chromatography and ion exchange chromatography) can be calculated in the same way using the data of table 13. As can be seen from table 13 HCP is removed efficiently >99.9% after size exclusion and ion exchange chromatography. No significant differences in clearance could be observed for the three different types of poliovirus productions.

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



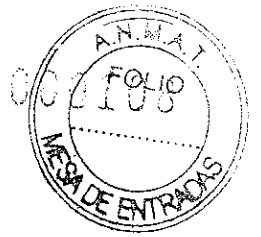



10.1.4.1 Identificación de pasos Críticos



COMPANIA ARGENTINA DE INVESTIGACIONES FARMACEUTICAS S.A.



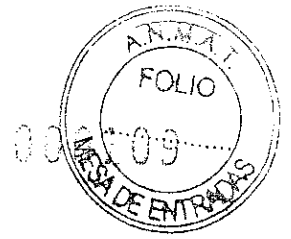



	<p>Módulo 3. Calidad</p> <p>3.2.S PRINCIPIO ACTIVO</p> <p>Mezclas monovalentes de la vacuna antipoliomielítica inactivada, Bilthoven Biologicals B.V.</p>	<p>IPV/NC/AR/09-12</p> <p>Página 1 de 7</p>
<p>3.2.S.2.4. Control de pasos críticos y productos intermedios</p>		

Índice	
Control de pasos críticos	2
Controles de productos intermedios	4
Métodos	6

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





	Módulo 3. Calidad 3.2.S PRINCIPIO ACTIVO Mezclas monovalentes de la vacuna antipoliomielítica inactivada, Bilthoven Biologicals B.V.	TPV/NC/AR/09-12 Página 2 de 7
3.2.S.2.4. Control de pasos críticos y productos intermedios		

1 **Control de pasos críticos**

El desarrollo del proceso de fabricación de mezclas monovalentes del virus poliomiélfico inactivado ha demostrado que los siguientes pasos son críticos.


Los productos intermedios no se almacenan hasta que se conocen los resultados de las pruebas de liberación. El proceso de producción continúa una vez que se toman las muestras de referencia de los productos intermedios.

Tabla 1: *Controles críticos durante la fabricación de mezclas monovalentes de la VPI*

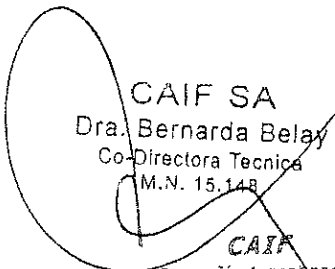
Control	Método	Requisito
(con hipervínculo a la descripción del método)		
<i>Cultivo celular</i>		
Agentes extraños	Agentes extraños en cultivos celulares	pasa la prueba
Identidad de las células	Análisis de isoenzimas	pasa la prueba
Micoplasmas	Prueba de micoplasmas	pasa la prueba
Esterilidad	Esterilidad	pasa la prueba
Cálculo de divisiones celulares	Recuento de núcleos celulares	Máx. 15
<i>Cosecha única (directamente después de la cosecha)</i>		
Agentes extraños	Agentes extraños en cosecha única	pasa la prueba

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

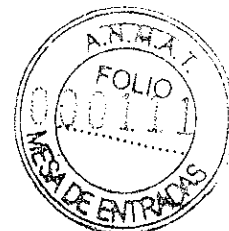



	Módulo 3. Calidad 3.2.S PRINCIPIO ACTIVO Mezclas monovalentes de la vacuna antipoliomielítica inactivada, Bilthoven Biologicals B.V.	IPV/NC/AR/09-12 Página 3 de 7
	3.2.S.2.4. Control de pasos críticos y productos intermedios	

Control	Método	Requisito
(con hipervínculo a la descripción del método)		
<i>Cosecha única, concentrada y purificada (después de cromatografía de intercambio de aniones)</i>		
Actividad específica	División de la prueba de antígeno D por la prueba de nitrógeno proteico	Tipo 1 ≥ 300.000 UD/mg PN Tipo 2 ≥ 100.000 UD/mg PN Tipo 3 ≥ 250.000 UD/mg PN
Pureza de proteínas	<u>Espectrometría E₂₆₀/E₂₈₀</u>	1,60-1,80
<i>Mezcla de virus, concentrada y purificada (tras la filtración, antes de la inactivación)</i>		
Título viral	<u>Concentración viral</u>	$10^7 - \leq 10^{11}$ CCID ₅₀ /ml
Identidad del virus	<u>Tipo de virus (identidad)</u>	
- mezcla tipo 1		tipo 1
- mezcla tipo 2		tipo 2
- mezcla tipo 3		tipo 3
Esterilidad	<u>Esterilidad</u>	pasa la prueba
<i>Mezcla de virus, durante la inactivación</i>		
Curva de inactivación	<u>Curva de inactivación</u>	Ausencia de poliovirus vivo residual 120 horas después de agregar formaldehído
Inactivación	<u>Inactivación</u>	Ninguna señal de multiplicación del poliovirus


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





	Módulo 3. Calidad 3.2.S PRINCIPIO ACTIVO Mezclas monovalentes de la vacuna antipoliomielítica inactivada, Biltoven Biologicals B.V.	IPV/NC/AR/09-12 Página 4 de 7
3.2.S.2.4. Control de pasos críticos y productos intermedios		

2 Controles de productos intermedios

Las especificaciones para los productos intermedios que se forman durante el proceso de producción de la mezcla monovalente de la vacuna antipoliomielítica inactivada (VPI) se incluyen en la tabla a continuación. Las especificaciones cumplen con la Farmacopea Europea.

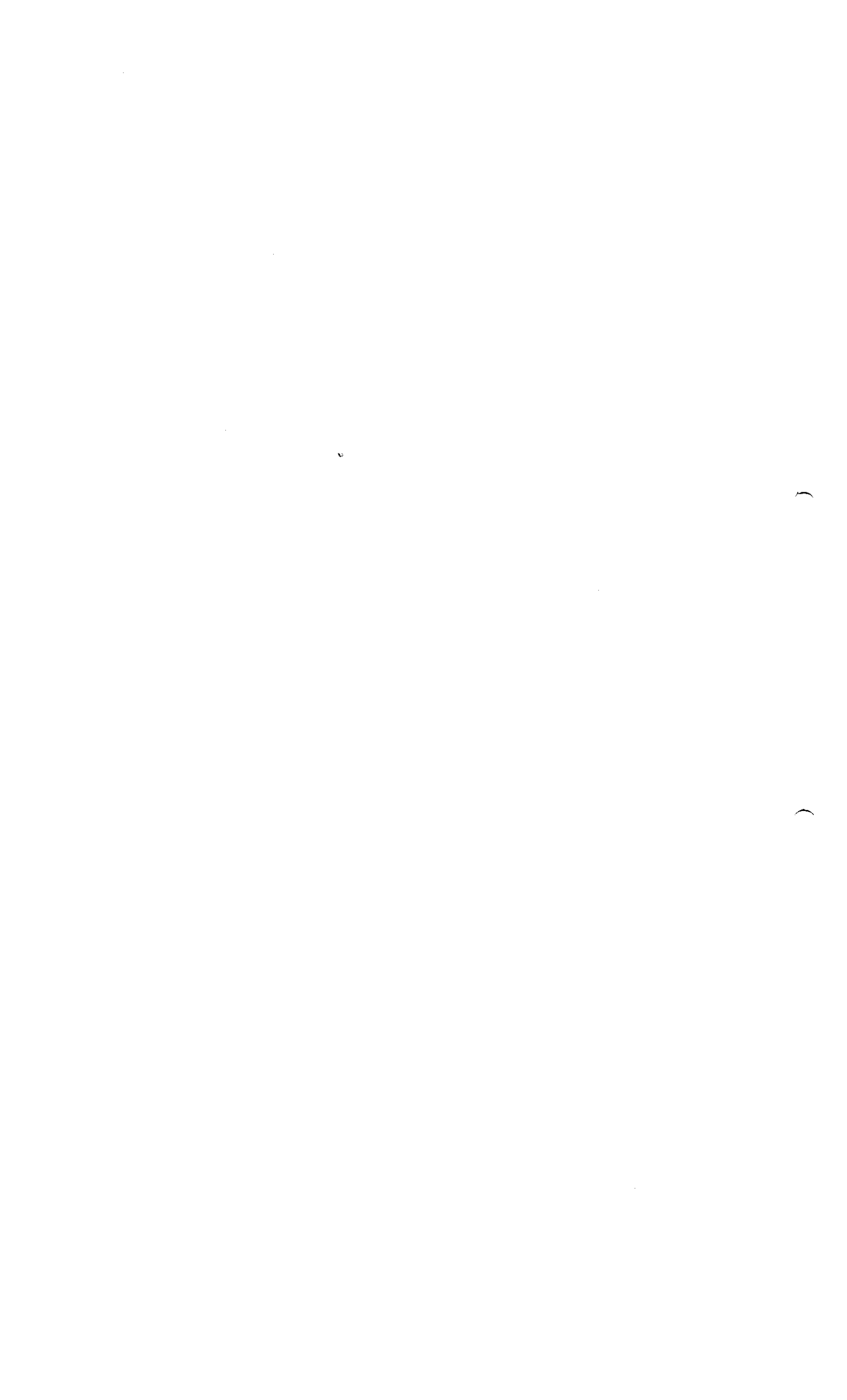
Los productos intermedios no se almacenan hasta que se conocen los resultados de las pruebas de liberación. El proceso de producción continúa una vez que se toman las muestras de referencia de los productos intermedios.

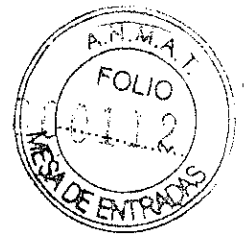
Tabla 2: Especificaciones para los productos intermedios de las mezclas monovalentes de la VPI


Especificación	Método (con hipervínculo a la descripción del método)	Requisito
<i>Cultivo celular</i>		
Agentes extraños	Agentes extraños en cultivos celulares	pasa la prueba
Identidad de las células	Análisis de isoenzimas	pasa la prueba
Micoplasmas*	Prueba de micoplasmas	pasa la prueba
<i>Cosecha única</i>		
Agentes extraños	Agentes extraños en la cosecha única	pasa la prueba

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



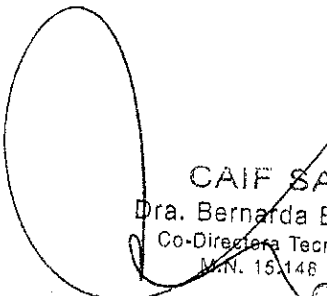


	Módulo 3. Calidad 3.2.S PRINCIPIO ACTIVO Mezclas monovalentes de la vacuna antipoliomielítica inactivada, Bilthoven Biologicals B.V.	IPV/NC/AR/09-12 Página 5 de 7
3.2.S.2.4. Control de pasos críticos y productos intermedios		

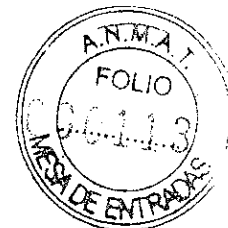
Especificación	Método (con hipervínculo a la descripción del método)	Requisito
<i>Cosecha única, concentrada y purificada</i>		
Identidad del virus	Tipo de virus (identidad)	
- mezcla tipo 1		tipo 1
- mezcla tipo 2		tipo 2
- mezcla tipo 3		tipo 3
Título viral	Concentración viral	$0^2 \cdot \leq 10^{11}$ CCID ₅₀ /ml
Esterilidad	Esterilidad	pasa la prueba
Actividad específica	División de resultados de la prueba de antígeno D por resultados de la prueba de nitrógeno proteico	Tipo 1 ≥ 300.000 UD/mg PN Tipo 2 ≥ 100.000 UD/mg PN Tipo 3 ≥ 250.000 UD/mg PN


* De acuerdo con los requisitos de la Farmacopea Europea, la prueba de detección de micoplasmas se debe realizar en la cosecha única. Por razones de contención, en su lugar las autoridades holandesas han aceptado realizar la prueba en el cultivo celular.

Los análisis de lotes de productos intermedios se incluyen en el Módulo 3.2.S.2.5: Validación o evaluación del proceso.


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





	Módulo 3. Calidad 3.2.S PRINCIPIO ACTIVO Mezclas monovalentes de la vacuna antipoliomielítica inactivada, Bilthoven Biologicals B.V.	IPV/NC/AR/09-12 Página 6 de 7
3.2.S.2.4. Control de pasos críticos y productos intermedios		

3 Métodos

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

documentos: Absorbancia

[IPVV.3.2.S.2.4. extinction E260 and E280.01.pdf](#)

Agentes extraños en cultivos celulares

[IPVV.3.2.S.2.4. extraneous agents on cell cultures.01.pdf](#)

Agentes extraños en cosecha única

[IPVV.3.2.S.2.4. extraneous agents single harvest.01.pdf](#)

Células de control de identidad

[IPVV.3.2.S.2.4. identity control cells.01.pdf](#)

Micoplasmas

[IPVV.3.2.S.2.4. mycoplasma.01.pdf](#)

Nitrógeno proteico

[IPVV.3.2.S.2.4. protein nitrogen.01.pdf](#)

Esterilidad

[IPVV.3.2.S.2.4. sterility.01.pdf](#)

Tipo de virus (identidad)

[IPVV.3.2.S.2.4. type of virus \(identity\).01.pdf](#)

Concentración viral

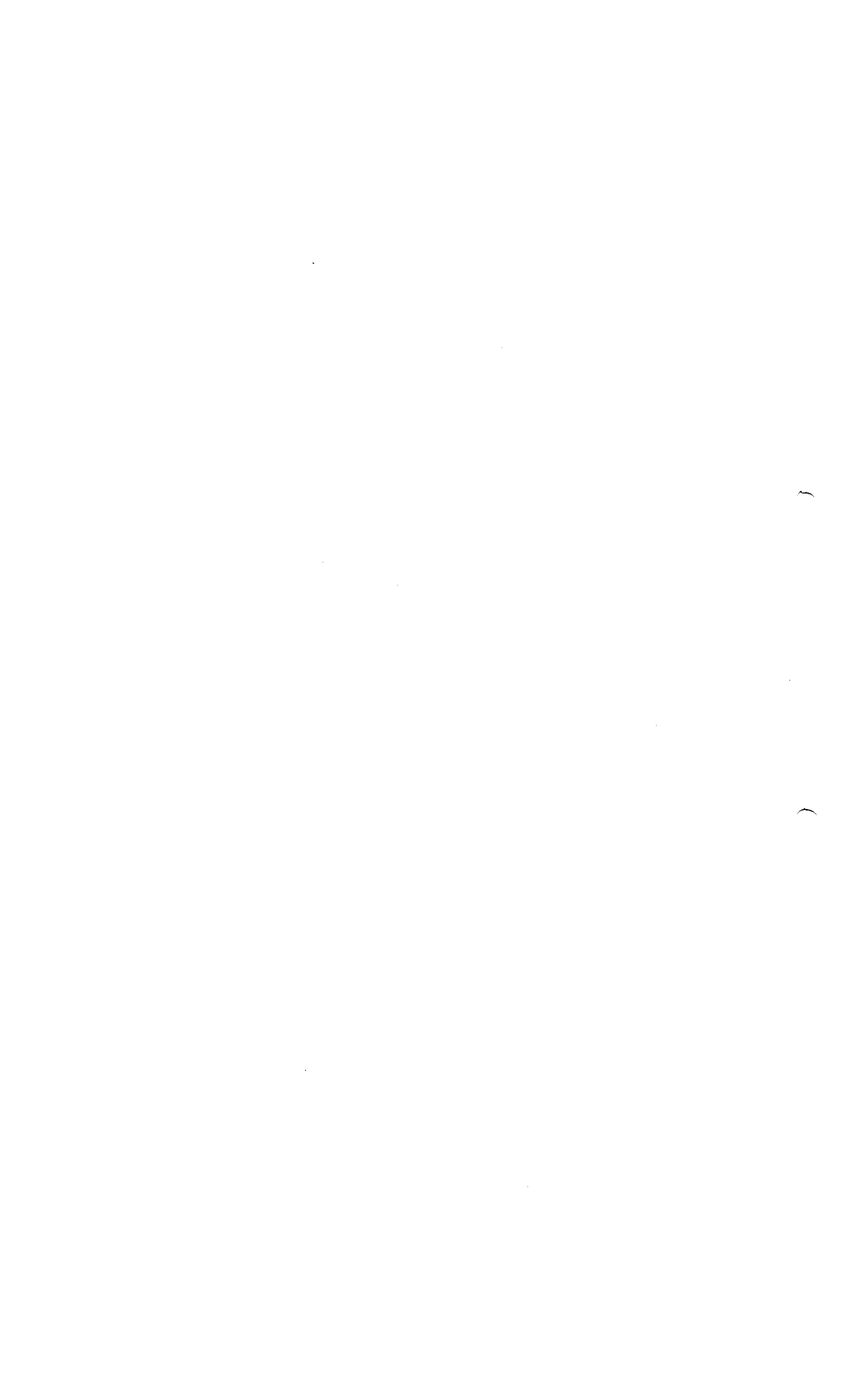
[IPVV.3.2.S.2.4. virus concentration.01.pdf](#)

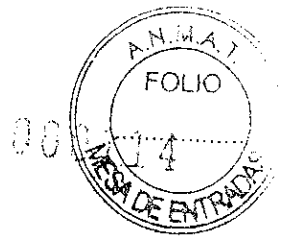
Curva de inactivación


[IPVV.3.2.S.2.4.inactivation curve.01.pdf](#)

CAIF SA
Dra. Bernarda Belay
Cd. Directora Técnica
M.N. 15.140

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





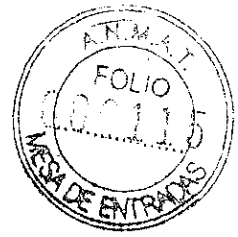
	<p>Módulo 3. Calidad</p> <p>3.2.S PRINCIPIO ACTIVO</p> <p>Mezclas monovalentes de la vacuna antipoliomielítica inactivada, Bilthoven Biologicals B.V.</p>	<p>IPV/NC/AR/09-12</p> <p>Página 7 de 7</p>
<p>3.2.S.2.4. Control de pasos críticos y productos intermedios</p>		


Inactivación
[IPVV.3.2.S.4.2.inactivation.01.pdf](#)

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





	<p>Módulo 3. Calidad 3.2.S PRINCIPIO ACTIVO Mezclas monovalentes de la vacuna antipoliomielítica inactivada, Bilthoven Biologicals B.V.</p>	<p>IPV/NC/AR/09-12 Página 1 de 1</p>
<p>3.2.S.2.4 - Controls of Critical Steps and Intermediates</p>		

3 Métodos de pruebas de control

Absorbancia E_{260} y E_{280} nm

Las absorbancias se miden con un espectrofotómetro.

La absorción de E_{260} de la suspensión de poliovirus concentrada y purificada es un valor estimado para el contenido de antígeno D.

El contenido de antígeno D se calcula de la siguiente manera:

Poliovirus tipo 1 : $E_{260} \times 1000 \times 8,0 = \dots$ UD/ml

Poliovirus tipo 2 : $E_{260} \times 1000 \times 2,8 = \dots$ UD/ml

Poliovirus tipo 3 : $E_{260} \times 1000 \times 7,7 = \dots$ UD/ml

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

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



	Módulo 3. Calidad 3.2.S PRINCIPIO ACTIVO Mezclas monovalentes de la vacuna antipoliomielítica inactivada, Biltoven Biologicals B.V.	IPV/NC/AR/09-12 Página 1 de 3
3.2.S.2.4. Control de pasos críticos y productos intermedios		

Agentes extraños en cultivos celulares

La prueba se lleva a cabo de acuerdo con las instrucciones de la Farmacopea Europea: Pruebas de detección de agentes extraños en vacunas virales de uso humano.

Introducción

La prueba de detección de agentes extraños en los cultivos celulares de producción se lleva a cabo analizando la presencia de virus externos que causan un efecto citopatogénico (ECP) en los cultivos celulares de control. En algunos cultivos también se hacen pruebas para detectar la presencia del virus de hemadsorción. Los sobrenadantes de los cultivos celulares de control que se cosechan después de 14 días (y, opcionalmente, también tras 28 días) se someten a pruebas para detectar la presencia de virus externos que causan ECP en los cultivos de células de riñón de *Cercopithecus*, MRC-5 y células Vero.

Las pruebas se llevan a cabo de acuerdo con instrucciones que cumplen los requisitos de la Farmacopea Europea y los requisitos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) acerca de sustancias biológicas.

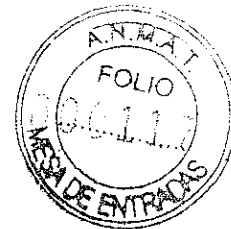
Procedimiento de prueba para la detección de agentes citopatogénicos

- Prepare cinco frascos de cultivo de tejidos de 150 cm² y 48 tubos Leighton con células Vero.
- Coloque los frascos y los tubos en el incubador a 37 °C.
- Decante el sobrenadante después de 3-5 días y renueve con medio de mantenimiento.
- En el día 7, revise los cultivos con microscopio en busca de ECP.
- Mezcle los sobrenadantes cosechados en tubos 2 x 50 ml.
- Pegue etiquetas en los tubos e indique la primera cosecha, el número de mezcla y la fecha.
- Se debe almacenar a -70 °C.
- Vierta el resto de los sobrenadantes y agregue medio de mantenimiento.
- En el día 14, revise los frascos de tejidos de 150 cm² con microscopio en busca de ECP.
- Revise los frascos de tejidos para detectar la presencia de agentes hemadsorbentes (consulte el Módulo 3.2.S.2.3: Control de materiales [banco celular maestro]).
- Observe la monocapa de los frascos de cultivo de tejidos. Si todavía están en buen estado 14 días después de la búsqueda del virus de hemadsorción, entonces agregue cierta cantidad de medio de mantenimiento (esto es opcional).

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





	<p align="center">Módulo 3. Calidad 3.2.S PRINCIPIO ACTIVO Mezclas monovalentes de la vacuna antipoliomielítica inactivada, Bilthoven Biologicals B.V.</p>	<p align="center">IPV/NC/AR/09-12 Página 2 de 3</p>
<p>3.2.S.2.4. Control de pasos críticos y productos intermedios</p>		

- En el día 21, renueve el cultivo de tejidos con medio de mantenimiento.
- Examine las monocapas con microscopio en busca de ECP.
- Fije 10 tubos Leighton en los días 7, 14, 21 y 28. Revíselos con microscopio después del teñido con HF.
- Renueve los tubos restantes con medio de mantenimiento.
- Fije cuatro de los tubos Leighton con 96 % de alcohol enfriado a -70 °C.
- Envíe cuatro de los tubos Leighton para la realización de pruebas de inmunofluorescencia.

Procedimiento de prueba para la detección del virus de hemadsorción

- En el día 14, examine los cinco frascos de cultivo de tejidos de 150 cm² con microscopio en busca de ECP.
- Lave los frascos dos veces con 50 ml de solución amortiguadora de Hank.
- Agregue 2 ml de suspensión de eritrocitos de conejillos de indias al 1 % en los cuatro frascos de cultivo de tejidos de 150 cm².
- Use uno de los frascos de 150 cm² como control.
- Agite los frascos varias veces con movimientos circulares y almacénelos a +4 °C durante 30 minutos.
- Examine los frascos con el microscopio en busca de hemadsorción.
- Repita este procedimiento a temperatura ambiente y a +37 °C.
- Si se produce una reacción de hemadsorción positiva, envíe uno para prueba de la presencia de virus.
- Luego enjuague los frascos de 150 cm² dos veces con solución amortiguadora de Hank, agregue medio de mantenimiento y, si el estado de las células lo permite, deje los frascos en observación a aproximadamente 37 °C durante dos semanas.

Procedimiento de prueba de sobrenadantes cosechados

- Tome 10 ml del sobrenadante cosechado en el día 14 y divídalo en partes iguales en 20 tubos Leighton con una monocapa de células Vero.
- Además, guarde cuatro tubos de control con células Vero.
- Llene los tubos hasta 2,0 ml con medio de mantenimiento.
- Incube los tubos 14 días a aproximadamente 37 °C.

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

