



Tabla 10: (Continuación) Ensayo de liberación en Semilla Madre Lote 21902

Productos intermedios y Ensayo	Especificación	Procedimiento de control	Semilla Madre Lote 21902
<b>Fluido de control</b>			
Contenido de virus	No debe observarse un efecto citopático	9110.551	No se observó crecimiento citopático
Esterilidad	No debe haber crecimiento	9110.001	Sin crecimiento
<b>Células de control</b>			
Identidad cariológica	Humana, macho	9110.744	Humana, macho
Hemadsorción	No debe detectarse ninguna	9110.527	No se detectó ninguna
<b>Fuente de control</b>			
Esterilidad	No debe haber crecimiento	9110.001	No hubo crecimiento
Micoplasma, Caldo/Agar	No debe haber crecimiento	9110.113	No hubo crecimiento
Cultivo de células Vero	No debe observarse un efecto citopático	9110.668	No se observó un efecto citopático
Cultivo de células MRC-5	No debe observarse un efecto citopático	9110.668	No se observó un efecto citopático
Cultivo de células HeLa	No debe observarse un efecto citopático	9110.668	No se observó un efecto citopático
<b>Placebo clarificado y sonicado</b>			
Esterilidad	No debe haber crecimiento	9110.001	No hubo crecimiento
Neurovirulencia en mono	No debe haber evidencia de neurovirulencia	9110.526	No hubo evidencia de neurovirulencia

\*UFP: Unidades formadoras de placa

†La especificación ha sido actualizada a lo siguiente: no hay muertes de huevos o anomalías gruesas, negativo para la transmisión de agentes extraños, sin hemaglutinación.

‡La especificación ha sido actualizada a lo siguiente: no hay muertes de huevos o anomalías gruesas, negativo para agentes extraños transmisibles.

2.3.3.2.2 Semilla Madre Lote 2061149

Las células MRC-5 se expandieron en matraces en T y después en botellas "Roller" para obtener la masa celular deseada para la infección por virus. El Pasaje 25 de Semilla Pre-Madre de la División de Manufactura de Merck (MMD) Lote 93575 se expandió al Pasaje 26 de Semilla Pre-Madre MMD Lote 2039964 y después al Pasaje 27 de Semilla Pre-Madre MMD Lote 2061149. Las células MRC-5 se infectaron con el Pasaje 27 de semilla pre-madre MMD para generar el Pasaje 28 de semilla madre MMD. Después de la incubación, el virus se recolectó y congeló como el Pasaje 28 de Semilla Madre Lote 2061149.

MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.

Fam. MARIA CECILIA CAMPOS  
DIRECTORA TÉCNICA  
MATRICULA NACIONAL 12374

MERCK SHARP & DOHME ARGENTINA INC.

Dr. SANTIAGO RODRIGUE  
DIRECTOR APODERADO PARA  
ASUNTOS MEDICOS Y REGULATORIOS  
MAT. NAC. 61.528





2.3.3.2.2.1 Historial del pasaje

Merck recibió un frasco de células infectadas congeladas en HEL<sub>11</sub> GPE<sub>12</sub> WI-38<sub>1</sub> (Pasaje 24) del Dr. M. Takahashi, del Instituto de Investigación para Enfermedades Microbianas (Biken), Universidad de Osaka, Japón.

El historial del pasaje de la Semilla Madre Lote 2061149 se resume en la [Tabla 11].

Tabla 11: Historial de Pasaje - Semilla Madre Lote 2061149

Nivel de Pasaje	Fecha de Infección	Fecha de Recolección	Comentarios
HEL <sub>11</sub> GPE <sub>12</sub> WI-38 <sub>1</sub> MRC-5 <sub>1</sub>	03-Julio-1986	08-Julio-1986	Pasaje 25 Semilla Madre MRL (Pasaje 25 Semilla Madre MMD) (93575) <sup>a</sup>
HEL <sub>11</sub> GPE <sub>12</sub> WI-38 <sub>1</sub> MRC-5 <sub>2</sub>	14-Julio-1996	16-Julio-1996	Pasaje 26 Semilla Pre-Madre MMD (2039964)
HEL <sub>11</sub> GPE <sub>12</sub> WI-38 <sub>1</sub> MRC-5 <sub>3</sub>	14-Dic-1998	16-Dic-1998	Pasaje 27 Semilla Pre-Madre MMD (2061149) <sup>b</sup>
HEL <sub>11</sub> GPE <sub>12</sub> WI-38 <sub>1</sub> MRC-5 <sub>4</sub>	08-Feb-1999	10-Feb-1999	Pasaje 28 Semilla Madre MMD (2061149) <sup>b</sup>

<sup>a</sup>La nomenclatura empleada en el dossier para los sistemas de lotificación de semilla difiere de la existente en la *Ph. Eur. Capítulo 5.2.1*. Sin embargo, el sistema de lotificación de semilla actual cumple con los requerimientos de la *Ph. Eur.* que se describen en la *Ph. Eur.*  
<sup>b</sup>El Pasaje 27 y el Pasaje 28 tienen el mismo número de lote debido a que ambas fases de la manufactura quedaron contenidas en un mismo documento de proceso.

Todos los pasajes de Merck se hicieron en cultivos celulares de fibroblastos diploides MRC-5.

2.3.3.2.2.2 Diagrama de Flujo del Proceso

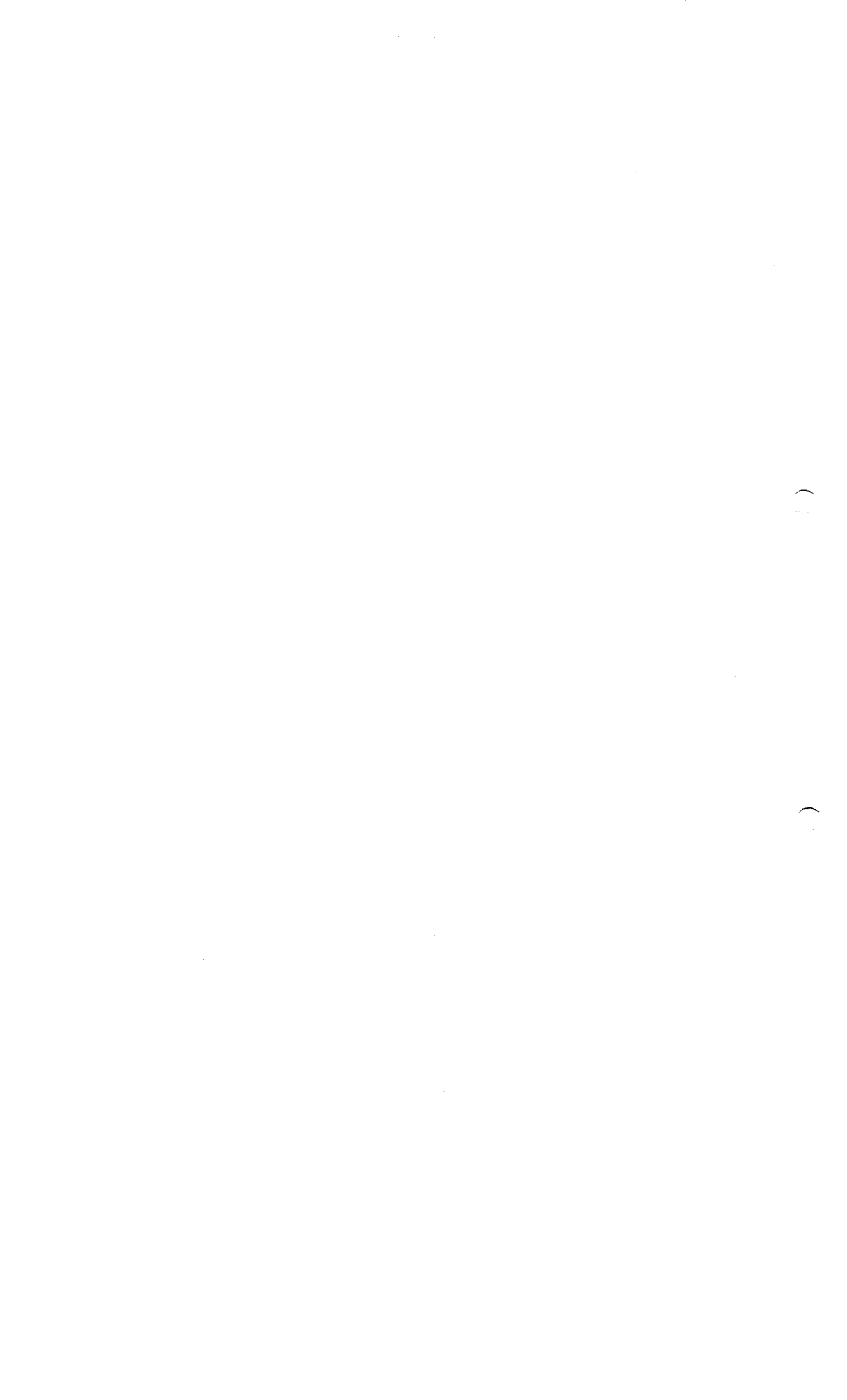
En la [Figura 4] se resumen los pasos del proceso de manufactura y la Ensayo de liberación para la Semilla Madre Lote 2061149.

MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.

Fam. MARIA CECILIA CAMPOS  
DIRECTORA TÉCNICA  
MATRICULA NACIONAL 2374

MERCK SHARP & DOHME ARGENTINA INC.

Dr. SANTIAGO RODRIGUE  
DIRECTOR APODERADO PARA  
ASUNTOS MEDICOS Y REGULATORIOS  
MAT. NAC. 51.525









### 2.3.3.2.2.3 Preparación de la Semilla Madre Lote 2061149

La Semilla Madre Lote 2061149 se manufacturó siguiendo esencialmente el mismo proceso que la Semilla Madre Lote 21002 (es decir, tres pasajes en células MRC-5, comenzando con el Pasaje 25 de Semilla Madre MRL Lote 93575). Para asegurar la consistencia de la infección, cada pasaje usó material asociado a células recolectadas y tituladas. Al final de cada pasaje, la capa de células infectadas se recolectó por tripsinización, se resuspendió en un medio que contenía DMSO al 10% (v/v) y se congeló y almacenó a  $\leq -120^{\circ}\text{C}$ .

La Semilla Madre Lote 2061149 se hizo a partir de aproximadamente 130 botellas roller y generó aproximadamente 270 frascos, con virus suficiente para infectar 29 semillas de almacenamiento del Pasaje 12-18.

### 2.3.3.2.2.4 Ensayos de control analítico para la Semilla Madre Lote 2061149

Las descripciones de los procedimientos de control analítico efectuados en la Semilla Madre Lote 21902 se incluyen en punto 4.2; excepto por tuberculosis in vivo que se describe en el punto 2.3.3.2.1.4.1 neurovirulencia que se describe en el punto 2.3.3.2.1.4.2, embrión de huevo (ruta alantoica) que se describe en el punto 2.3.2.1.2.3, embrión de huevo (ruta de saco de yema) que se describe en el punto 2.3.2.1.2.4, Ensayo para bacteriófagos que se describe en la 2.3.2.1.2.5.

### 2.3.3.2.2.5 Ensayo de liberación en la Semilla Madre Lote 2061149

Los resultados de la Ensayo de liberación efectuada en la Semilla Madre Lote 2061149 se proporcionan en la [Tabla 12]. Las Ensayos en los controles de semilla se muestran en la [Tabla 13].

Así mismo, se realizaron análisis de secuencia y restricción de sitio para confirmar la consistencia del virus de vacuna del Pasaje 32 a partir de la Semilla Madre Lote 2061149 y el virus de vacuna del Pasaje 31 a partir de la Semilla Madre Lote 21902. Los resultados de este estudio fueron consistentes con los de un estudio previo que comparó la vacuna a granel del Pasaje 31 fabricada mediante versiones previas del proceso de fabricación de la vacuna a granel. La secuencia del consenso no mostró diferencia en el material generado a partir de semillas madres viejas y nuevas derivadas de Semilla Madre Lotes 21902 y 2061149.

MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.

Farm. MARIA REGINA CAMPOS  
DIRECTORA TÉCNICA  
MATRICULA NACIONAL 12374

MERCK SHARP & DOHME ARGENTINA INC.

Dr. SANTIAGO RODRIGUE  
DIRECTOR APODERADO PARA  
ASUNTOS MEDICOS Y REGULATORIOS  
MAT. NAC. 51.525





Tabla 12: Ensayos de Liberación en Semilla Madre Lote 2061149

Productos Intermedios y Ensayo	Especificación	Procedimiento de control	Resultados Semilla Madre Lote 2061149
<b>Semilla asociada a célula</b>			
Esterilidad	No debe haber crecimiento	9110.001	Sin crecimiento
Titulación de la infectividad	Para información	9110.551	4.19 x 10 <sup>6</sup> UFP/ml
Identidad	Reducción ≥90% en el efecto citopático típico con antisuero homólogo	9110.551	Reducción ≥90% en el efecto citopático típico con antisuero homólogo
<b>Semilla recolectada-perla</b>			
Esterilidad	No debe haber crecimiento	9110.001	No hubo crecimiento
Mycoplasma, Caido/Agar	No debe haber crecimiento	9110.113	No hubo crecimiento
Mycoplasma, Hoechst	No debe haber fluorescencia extranuclear	9110.339	No hubo fluorescencia extranuclear
<b>Semilla recolectada-perla, clarificada y sonicada</b>			
Esterilidad	No debe haber crecimiento	9110.001	No hubo crecimiento
Titulación Infectividad	Para información	9110.551	4.92 x 10 <sup>4</sup> UFP/ml
Neurovirulencia mono	No debe haber evidencia de neurovirulencia	9110.526	Sin evidencia de neurovirulencia
<b>Suspensión de semilla recolectada-tripsina</b>			
Esterilidad	No debe haber crecimiento	9110.001	No hubo crecimiento
<i>M. tuberculosis</i> in vitro	No debe haber crecimiento	9110.117	No hubo crecimiento
<i>M. tuberculosis</i> in vivo	No debe haber crecimiento	9110.355	No hubo crecimiento
Ratones adultos	Supervivencia de ratones ≥80%	9110.115	≥80% de los ratones sobrevivieron
Ratones lactantes	Supervivencia de ratones ≥80%	9110.115	≥80% de los ratones sobrevivieron

MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.

EMILIA MARIA DE GUZMÁN CAMPOS  
DIRECTORA TÉCNICA  
MATRICULA NACIONAL 12374

MERCK SHARP & DOHME ARGENTINA INC.

Dr. SANTIAGO RODRIGUE  
DIRECTOR APODERADO PARA  
ASUNTOS MEDICOS Y REGULATORIOS  
MAT. NAC. 51.525





Tabla 12 (Cont.) : Ensayos de Liberación en Semilla Madre Lote 2061149

Productos intermedios y Ensayo	Especificación	Procedimiento de control	Resultados Semilla Madre Lote 2061149
<b>Suspensión de semilla recolectada-tripsina (Cont.)</b>			
Cultivo de células Vero	No debe observarse un efecto citopático	9110.668	No se observó un efecto citopático
Cultivo de células MRC-5	No debe observarse un efecto citopático	9110.668	No se observó un efecto citopático
Cultivo de células HeLa	No debe observarse un efecto citopático	9110.668	No se observó un efecto citopático
Cultivo de células LLC-MK <sub>2</sub>	No debe observarse un efecto citopático	9110.668	No se observó un efecto citopático
Embrión de huevo - Ruta alantoica	No debe haber muertes de huevo o anomalidades gruesas/ni hemaglutinación <sup>b</sup>	9110.409	No hubo muerte de huevos o anomalidades gruesas/ni hemaglutinación <sup>b</sup>
Embrión de huevo - Vía saco de yema	No debe haber muertes de huevos o anomalidades gruesas <sup>c</sup>	9110.410	No hubo muertes de huevos o anomalidades gruesas <sup>c</sup>
Bacteriófagos	No se deben detectar bacteriófagos	9110.220	No se detectaron bacteriófagos
<b>Medio ya utilizado de la Semilla Pasaje 28</b>			
Esterilidad	No debe haber crecimiento	9110.001	No hubo crecimiento
Micoplasma, Caldo/Agar	No debe haber crecimiento	9110.113	No hubo crecimiento
Micoplasma, Hoechst	No debe haber fluorescencia extranuclear	9110.339	No hubo fluorescencia extranuclear
Cultivo celular Vero	No debe observarse un efecto citopático	9110.668	No se observó un efecto citopático
Cultivo celular MRC-5	No debe observarse un efecto citopático	9110.668	No se observó un efecto citopático
Cultivo celular HeLa	No debe observarse un efecto citopático	9110.668	No se observó un efecto citopático
Cultivo Celular LLC-MK <sub>2</sub>	No debe observarse un efecto citopático	9110.668	No se observó un efecto citopático

<sup>a</sup>UFP: Unidades formadoras de placa

<sup>b</sup>La especificación ha sido actualizada a lo siguiente: no hay muertes de huevos o anomalidades gruesas, negativo para la transmisión de agentes extraños, sin hemaglutinación.

<sup>c</sup>La especificación ha sido actualizada a lo siguiente: no hay muertes de huevos o anomalidades gruesas, negativo para agentes extraños transmisibles.

MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.

Fam. MARIA DECILIA CAMPOS  
DIRECTORA TÉCNICA  
MATRICULA NACIONAL 12374

MERCK SHARP & DOHME ARGENTINA INC.

Dr. SANTIAGO RODRIGUE  
DIRECTOR APODERADO PARA  
ASUNTOS MEDICOS Y REGULATORIOS  
MAT. NAC. 51.525





Tabla 13: Ensayos de Liberación en Controles de la Semilla Madre Lote 2061149

Productos intermedios y Ensayo	Especificación	Procedimiento de control	Resultados Semilla Madre Lote 2061149
<b>Células de control</b>			
Identidad cariológica	Humana, macho	9110.744	Humana, macho
Hemadsorción	No debe detectarse ninguna	9110.527	No se detectó ninguna
<b>Fluidos de control recolección final</b>			
Esterilidad	No debe haber crecimiento	9110.001	No hubo crecimiento
Micoplasma, Caldo/Agar	No debe haber crecimiento	9110.113	No hubo crecimiento
Micoplasma, Hoechst	No debe observarse fluorescencia extranuclear	9110.339	No se observó fluorescencia extranuclear
Cultivo de células Vero	No debe observarse un efecto citopático	9110.668	No se observó un efecto citopático
Cultivo de células MRC-5	No debe observarse un efecto citopático	9110.668	No se observó un efecto citopático
Cultivo de células HeLa	No debe observarse un efecto citopático	9110.668	No se observó un efecto citopático
Cultivo de células LLC-MK <sub>2</sub>	No debe observarse un efecto citopático	9110.668	No se observó un efecto citopático
<b>Células de control recolectadas-perla</b>			
Esterilidad	No debe haber crecimiento	9110.001	No hubo crecimiento
Micoplasma, Caldo/Agar	No debe haber crecimiento	9110.113	No hubo crecimiento
Micoplasma, Hoechst	No debe haber fluorescencia extranuclear	9110.339	No hubo fluorescencia extranuclear
<b>Células de control recolectadas-perla, sonicadas y clarificadas (Placebo neurovirulencia)</b>			
Esterilidad	No debe haber crecimiento	9110.001	No hubo crecimiento
Titulación Infectividad	Para información	9110.551	Ninguna disponible

2.3.3.3 Semilla de almacenamiento Pasaje 29

La semilla de almacenamiento del Pasaje 29 se hace al infectar células MRC-5 con semilla madre.

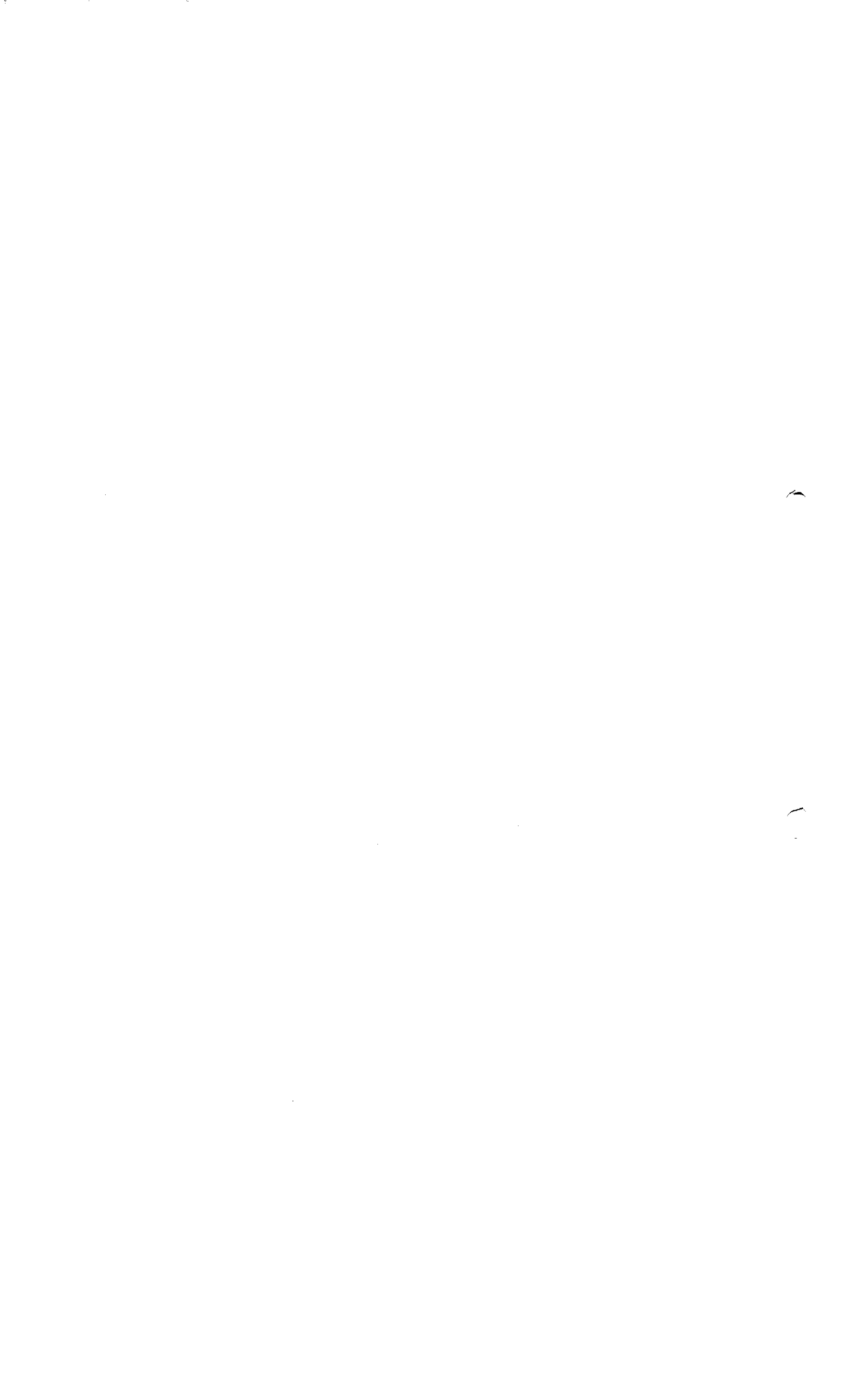
El tamaño de lote de semilla madre típicamente ha sido de 300-400 botellas "roller", generando un mínimo de 300 frascos. Un lote de vacuna típico consume aproximadamente ocho frascos de semilla de almacenamiento; en consecuencia, una semilla de almacenamiento produce aproximadamente 40 lotes de vacuna.

MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.

Firm: MARIA CECILIA CAMPOS  
DIRECTORA TÉCNICA  
MATRICULA NACIONAL 12374

MERCK SHARP & DOHME ARGENTINA INC.

Dr. SANTIAGO RODRIGUE  
DIRECTOR APODERADO PARA  
ASUNTOS MEDICOS Y REGULATORIOS  
MAT. NAC. 51.625





2.3.3.3.1 Diagrama de flujo del proceso

En la [Figura 5] se resumen los pasos del proceso de manufactura para la producción de semilla de almacenaje del Pasaje 29. Las Ensayos de liberación se indican en los pasos correspondientes del proceso.

MERCK SHARP & DOHME ARG. INC

Farm. MARIA CECILIA CAMPOS  
DIRECTORA TÉCNICA  
MATRICULA NACIONAL 12374

MERCK SHARP & DOHME ARGENTINA INC.

Dr. SANTIAGO RODRIGUE  
DIRECTOR APODERADO PARA  
ASUNTOS MEDICOS Y REGULATORIOS  
MAT. NAC. 51525

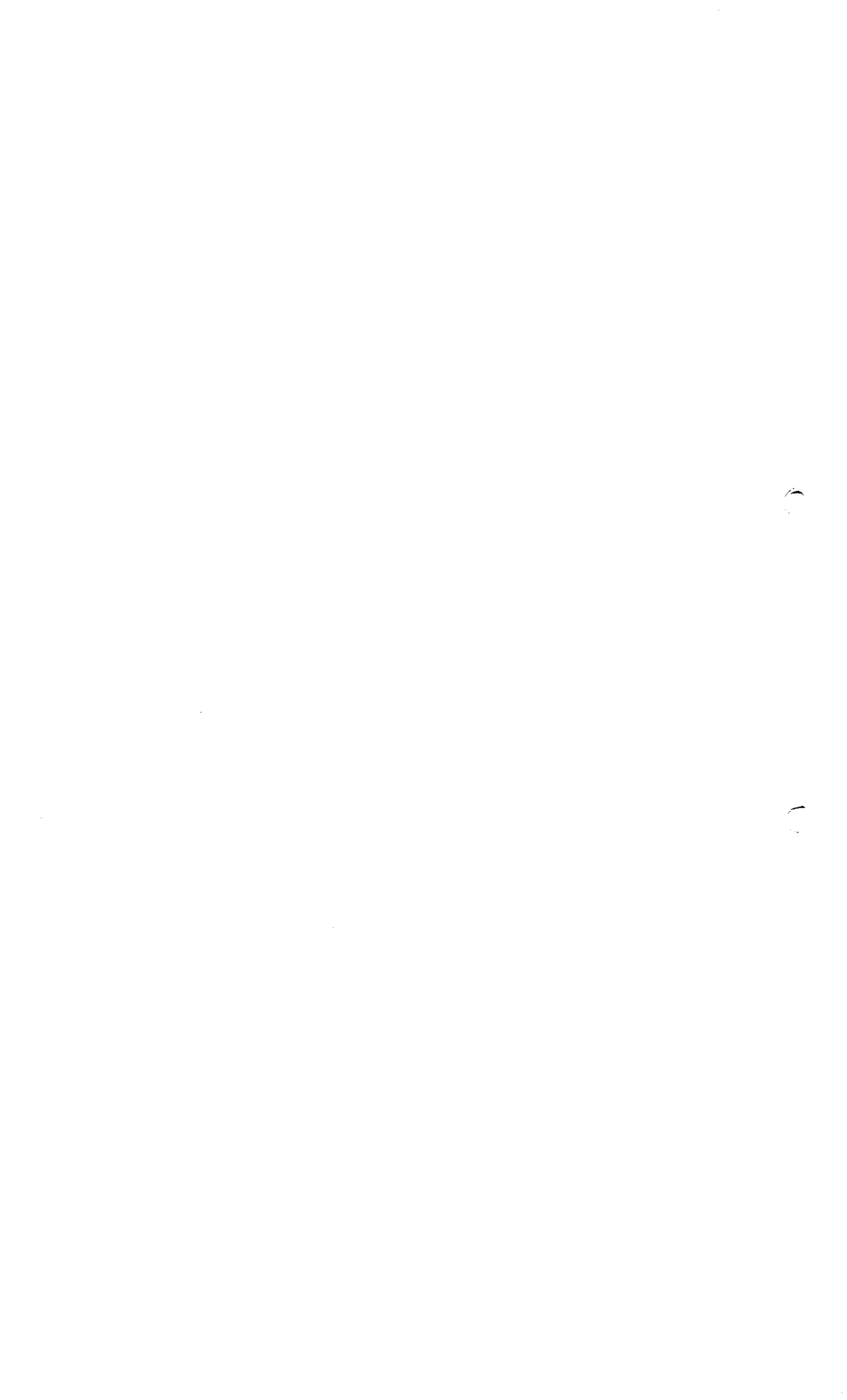
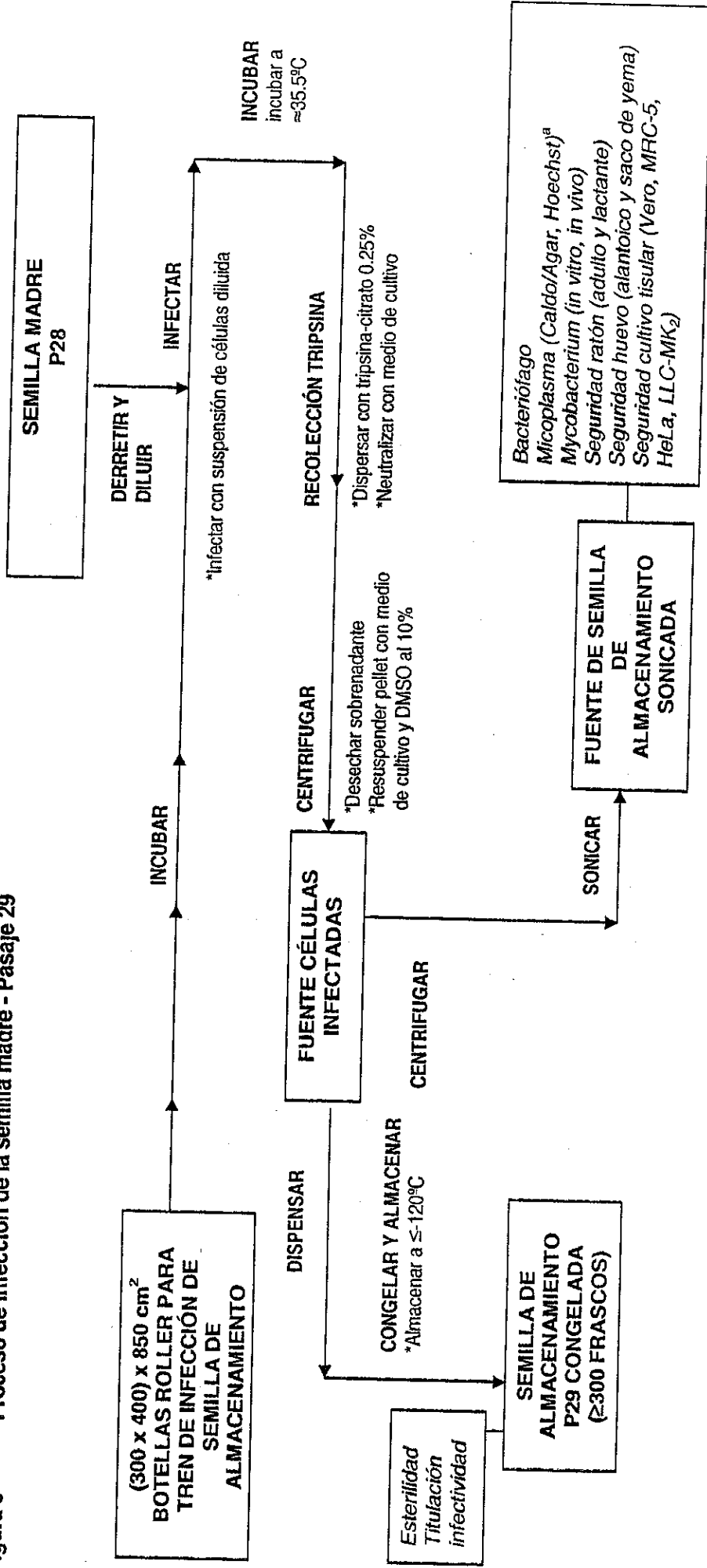


Figura 5 Proceso de infección de la semilla madre - Pasaje 29



<sup>a</sup> Esta Ensayo se realizará en la fuente de células infectadas en futuras semillas de almacenamiento para aumentar la sensibilidad a la Ensayo

Cursivas: Ensayos de Control de Calidad

MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.

Faith. MARIA CECILIA CAMPOS  
DIRECTORA TÉCNICA  
MATRÍCULA NACIONAL 12374

MERCK SHARP & DOHME ARGENTINA INC.

DR. SANTIAGO RODRIGUEZ  
DIRECTOR APODERADO PARA  
ASUNTOS MEDICOS Y REGULATORIOS  
MAT. NAC. 51.525



