

PRINCIPIO ACTIVO

Vesículas de la membrana externa (OMV)

1) INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 Caracterización

1.1.2 Elucidación de la Estructura y otras Características

Las Vesículas de la Membrana Externa (OMV) se extraen vía detergente de la membrana bacteriana de la cepa NZ98/254 del serogrupo B de *Neisseria meningitidis* (*N. meningitidis*). Los componentes inmunogénicos principales de las OMV son las proteínas de la membrana externa (OMP) y los lipopolisacáridos unidos a membranas (LPS). Dado que las OMV son mezclas complejas de lípidos, OMP, y componentes periplásmicos, las descripciones estructurales se limitarán a aquellas que estén probablemente relacionadas con el modo de acción, a saber, los antígenos OMP y los LPS principales. El granel de OMV se produce por fermentación de la cepa de *N. meningitidis*, luego se concentra por ultrafiltración. Las bacterias se inactivan y las vesículas y fragmentos se separan de la suspensión bacteriana y se purifican vía varios pasos de centrifugación. El granel bruto se procesa en forma adicional vía pasos de diafiltración, centrifugación, y sonicación seguido por filtración 0,2 µm para dar un granel concentrado estéril. El granel concentrado se almacena a 2-8°C durante hasta 36 meses.

Proteínas Principales de la Membrana Externa

Las proteínas principales de la membrana externa (OMPs) de *N. meningitidis* se han designado de Clase 1 (PorA, Serotipo P1.4) a Clase 5 (Opa) (Tsai et al., 1981). Las proteínas de Clase 1, 2, y 3 son porinas que muestran variación antigénica significativa. Todas las cepas meningocócicas portan proteínas de Clase 2 (PorB2) o Clase 3 (Por B3). Estas proteínas funcionan como porinas selectivas de anión y probablemente aparecen en la membrana externa como trímeros.


Una OMP de Clase 4, también denominada Rmp debido a su cambio en la movilidad en SDS-PAGE luego de la reducción, está estrechamente relacionada con la proteína III (PIII) de *N. gonorrhoeae*. La OMP de Clase 4/RmpM expresada en forma constitutiva, es antigénicamente invariable, y está estrechamente relacionada con las moléculas de porina, actuando como un estabilizador.

La proteína de Clase 5, Opc, es una proteína de superficie expuesta que forma trímeros o tetrámeros en la membrana externa. La estructura de cristal de Opc se ha determinado a una resolución de 2,0 Angstroms (Prince et al., 2002). En común con otras OMP meningocócicas, la Opc adopta una estructura α-β cilíndrica con una superficie exterior apolar que la ancla en la membrana.

Lipopolisacáridos

La membrana externa de *N. meningitidis* es una bicapa asimétrica que consiste en fosfolípidos sobre la valva interna y la región del ancla de lípidos de lipopolisacáridos (LPS) lípido A, sobre la valva


Novartis Argentina S.A.
Dr. Lucio Jeronico
Director Técnico
MN 14840


Novartis Argentina S.A.
Farm. Sergio Imirtzian
Gte. de Asuntos Regulatorios
Director Técnico - M.N. 11521
Apoderado

externa. El LPS meningocócico es estructuralmente distinto de aquellos de bacilos entéricos gram negativos. Carece de la repetición del antígeno O presente en las bacterias entéricas, pero la molécula de LPS nuclear es heterogénea tanto dentro como entre las cepas y se ha clasificado en 12 inmunotipos distintos (L1-L12) sobre la base de la reactividad del anticuerpo monoclonal. La vacuna OMV NZ contiene ambos inmunotipos L1 y L3 (Wedegé et al., 2007).

Propiedades generales

Las vacunas de las Vesículas de la Membrana Externa (OMV) son una mezcla compleja de lípidos, proteínas de la membrana externa (OMPs), componentes periplásmicos, así como también proteínas citoplásmicas (Vipond et al., 2006). Los componentes inmunogénicos principales de las OMV son las proteínas de la membrana externa (OMP, con PorA y PorB como los componentes principales), algunas proteínas menores, y liposacáridos unidos a membranas (LPS). Las OMPs principales de *N. meningitidis* se han designado Clase 1 (PorA) a Clase 5 (Opa).

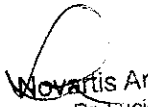
Si bien las vacunas OMV generalmente contienen una multitud de proteínas (> 40), una SDS-PAGE unidimensional de vacunas OMV generalmente revela entre 20-30 proteínas, con pesos moleculares estimados de 22,800 a 89,100 Da. Entre estas se encuentran las proteínas de porina altamente expresadas (PorA y PorB), los antígenos de Clase 4 y 5 y otros antígenos principales, que incluyen Omp85, FetA (Clase 1, previamente denominada FrpB), y NspA (Clase 3).

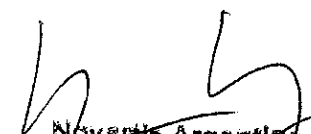
Propiedades de las Proteínas y Estructura

Las vesículas intactas tienen un diámetro en el rango de 50-200 nm y tienen una estructura compleja. Si bien los fragmentos de OMV varían en tamaño y estructura, la membrana está a grandes rasgos intacta dentro de los fragmentos. La inmunotinción de la superficie de la vesícula se llevó a cabo para adquirir información sobre la localización de antígenos, que incluyen LPS. Por el uso de anticuerpos anti-LPS (3, 7, 9) e inmunotinción con oro, se localizó el LPS sobre la superficie externa de OMV. Si bien las vacunas OMV generalmente contienen > 40 proteínas diferentes, una SDS-PAGE unidimensional de vacunas OMV generalmente revela entre 20-30 proteínas. Entre estas se encuentran las proteínas de porina altamente expresadas (PorA y PorB), los antígenos de Clase 4 y 5 y otros antígenos principales, que incluyen Omp85, FetA (Clase 1, previamente denominada FrpB), y NspA (Clase 3). La estructura, el rol, y la significancia de estos otros antígenos principales (Omp85, FetA, y NspA) no están bien definidos, pero estas proteínas se identifican en la cepa meningocócica y son inmunogénicas.

1.1.3 Impurezas

El principio activo de OMV se deriva de la fermentación de la cepa NZ98/254 del serogrupo B de *Neisseria meningitidis* (*N. meningitidis*). Los componentes activos son porciones de la membrana externa de las bacterias que son extraídas con el detergente, desoxicolato, en la forma de vesículas de 50-200 nm o fragmentos de vesículas. Las impurezas pueden consistir en los restos de otros componentes bacterianos, restos de materiales utilizados para el tratamiento del cultivo, o durante la purificación de las vesículas.


Novartis Argentina S.A.
Dr. Lucio Jeroncio
Director Técnico
MN 14840


Novartis Argentina S.A.
Farm. Sergio Imirtzian
Gte. de Asuntos Regulatorios
Codirector Técnico - M.N. 11521
Apoderado

Se llevan a cabo pruebas para la pureza bacteriana como controles durante el proceso en varios pasos durante el proceso de purificación. Además, la biocarga se determina antes de la filtración estéril y no se han detectado colonias en el pre granel concentrado de OMV producido.

El ambiente microbiológico en las instalaciones de elaboración se controla en forma exhaustiva y se llevan a cabo rellenos de medio para asegurar que no se introduzcan contaminantes durante la expansión bacteriana. La filtración estéril final también se ha validado. La esterilidad del granel concentrado de OMV se prueba de acuerdo con los requerimientos de Ph. Eur. Se toman las precauciones necesarias para minimizar el riesgo de introducción de agentes extraños.

Impurezas relacionadas con el Proceso

Impurezas relacionadas con el Proceso Endógeno


Las impurezas relacionadas con el proceso endógeno incluyen ADN y lipopolisacáridos LPS/ endotoxinas, que surgen del cultivo de la cepa de *N. meningitidis* utilizada en la elaboración de OMV. El granel de ADN residual de la cepa bacteriana de *N. meningitidis* se elimina durante el proceso de purificación. LPS es parte de las vesículas extraídas de las bacterias, y cumple un rol en la inmunogeneidad de la vacuna.

El granel purificado de OMV tiene cierta actividad de endotoxina, y la endotoxina también puede tener un efecto pirogénico. La toxicidad de LPS en las vacunas OMV se ha estudiado en forma exhaustiva, con evidencia de que la toxicidad de LPS se reduce cuando se une con firmeza a las proteínas de la membrana externa. Los estudios en conejos han demostrado que el efecto pirogénico de LPS en OMV fue únicamente del 2% del efecto de la misma cantidad de LPS purificado. Cuando se absorbieron las OMV sobre el hidróxido de aluminio, la pirogenicidad se redujo cuatro veces más. Un efecto similar se observó en la prueba LAL. Dado que la vacuna OMV fue bien tolerada, el efecto inmunogénico del LPS se utilizó para aumentar la inmunogeneidad general de la vacuna.

Impurezas relacionadas con el Proceso Exógeno

La impureza relacionada con el proceso endógeno, desoxicolato (DOC), se agrega durante el proceso de elaboración. Un rango de 0,1-0,4 µg/µg de proteína se justificó por el NIPH para los criterios de liberación, que corresponde a 2,5-10 µg/dosis en la vacuna formulada. Este nivel es similar al hallado en otras vacunas basadas en OMV. Una evaluación toxicológica (proporcionada a pedido), llevada a cabo para evaluar el riesgo de la exposición de infantes a DOC por vacunación, indicó que no existen cuestiones de seguridad asociadas con la dosis de 10 µg.


Novartis Argentina S.A.
Dr. Lucio Jeronic
Director Técnico
MN 14840


Novartis Argentina S.A.
Farm. Sergio Imirtzjan
Jefe de Asuntos Regulatorios
Director Técnico - M.N. 11521
Apoderado

2) PROCESO DE PRODUCCIÓN

2.1 Elaborador

Nombre y Domicilio	Responsabilidad
Novartis Vacunas y Diagnósticos S.r.l. Bellaria-Rosia 53018 Sovicille Italia (Rosia)	Elaboración, almacenamiento, y pruebas de control de calidad de las Semillas Maestra y de Trabajo Fermentación, cosecha, y purificación de OMV Filtración estéril de OMV Pruebas de control de calidad Liberación de lote del Principio Activo
Novartis Vacunas y Diagnósticos S.r.l. Via Fiorentina, 1 53100 Siena Italia (Siena)	Almacenamiento (copias y corto plazo) y pruebas de control de calidad de las Semillas Maestra y de Trabajo Fermentación, cosecha, y purificación de OMV Pruebas de control de calidad

2.2 Descripción del proceso de elaboración y controles del proceso

Proceso de Fermentación y Cosecha

La producción se basa en un sistema de lote de semillas. Se utilizan semillas de trabajo de del serogrupo B (cepa NZ 98/254) de *Neisseria meningitidis* (*N. meningitidis*) para preparar un inóculo. Durante el paso de fermentación, se expande el cultivo de *N. meningitidis* y se cosecha por centrifugación. Los sólidos celulares, que contienen las vesículas de la membrana externa (OMV), se inactivan por la adición de desoxicolato de sodio y se lavan. Luego, el cultivo se centrifuga y se recupera el sobrenadante. El lote de fermentación se define como el producto de una operación de fermentación simple a través de la recuperación del sobrenadante.

Proceso de Purificación

Una vez recuperado el sobrenadante, las OMV se purifican y se reducen sus tamaños por una serie de operaciones de concentración, diafiltración, filtración, y sonicación. Un lote de purificación es el producto de purificación de un lote de recuperación de sobrenadante.

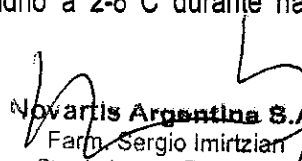
Filtración Estéril

El pre granel concentrado de OMV se filtra en forma estéril y se distribuye en botellas de vidrio de 10l.

Almacenamiento

El granel concentrado de OMV puede almacenarse en botellas de vidrio a 2-8°C durante hasta 36 meses.


Novartis Argentina S.A.
Dr. Lucio Jeroncio
Director Técnico
MN 14840


Novartis Argentina S.A.
Fam. Sergio Imirtzian
Gte. de Asuntos Regulatorios
Director Técnico - M.N. 11521
Apoderado

