

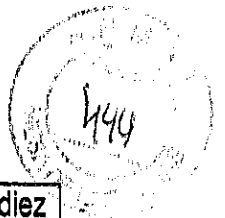
	<p>del peso molecular y estándares de referencia se agregan a los pocillos adecuados del gel SDS y se someten a electroforesis.</p> <p>Para la evaluación de las tres proteínas recombinantes, tres cantidades de estándar de referencia compuesto por acervos de proteínas recombinantes de fusión NHBA, NadA, y de fusión fHbp se operan, junto con antígeno de Estándar de Vesículas de la membrana externa (OMV) correspondiente a 10% de vacuna no absorbida, sobrenadante de vacuna no enriquecido, sobrenadante de vacuna enriquecido con una cantidad correspondiente a 5% de vacuna no absorbida de acervos de proteínas recombinantes, y el marcador de PM. Para la evaluación del antígeno de Vesículas de la membrana externa (OMV), tres cantidades de estándar de referencia compuestas por antígeno de Vesículas de la membrana externa (OMV) se operaron, junto con 10% de acervo de proteína recombinante, sobrenadante de vacuna no enriquecido, sobrenadante de vacuna enriquecido con antígeno de Estándar de Vesículas de la membrana externa (OMV) correspondiente a 5% de vacuna no absorbida, y el marcador de PM. Para visualizar las bandas, el gel se tiñe con azul de coomassie y se destiñe. El gel se barre. Se verifican los criterios adecuados de idoneidad del sistema para confirmar la validez de la corrida analítica.</p>
--	---

Tabla 17 Prueba para Hidróxido de Aluminio – Título, Homogeneidad, & Uniformidad de Contenido

Muestras de Prueba	<p>Granel Final (sólo título)</p> <p>Producto llenado (título, uniformidad de contenido, y homogeneidad)</p>
Estándares y Controles de Referencia	<p>Solución Estándar de Aluminio, certificada</p> <p>Blanco: Agua, titulada como para el procedimiento</p>
Descripción de la Valoración	<p>Las muestras deben utilizarse 0,5-4 horas después de ser retiradas del medio de refrigeración y deben homogeneizarse antes del procesamiento. Cada blanco (agua), control positivo, y muestra se digiere en una mezcla de ácido sulfúrico y ácido nítrico, se calienta hasta que la solución esté clara, y se enfría a temperatura ambiente. Los tubos se colocan en el titulador automático. El pH se ajusta en forma automática y se agregan cantidades definidas de EDTA y sulfato de cobre y se lleva a cabo la titulación.</p>


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


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



	<p>La uniformidad de contenido se lleva a cabo sobre diez recipientes diferentes del mismo lote y se promedia; el rango formado por el promedio debería ser $\pm 15\%$. La homogeneidad se lleva a cabo por duplicado sobre un acervo obtenido de un mínimo de diez recipientes recolectados en fases diferentes de llenado (comienzo, mitad y fin del llenado). La Homogeneidad Porcentual se calcula como $(\text{valor máximo} - \text{valor mínimo}) + \text{por concentración teórica} \times 100$. El título se determina por duplicado a partir de cada muestra de granel final y los resultados se promedian. El título del producto llenado se determina por el cálculo del promedio de los tres valores de homogeneidad.</p> <p>Los controles positivos y los blancos se analizan a lo largo de la secuencia analítica. Los controles positivos al comienzo de la secuencia sirven como controles de adecuación del sistema. Se verifican los criterios adecuados de idoneidad del sistema para confirmar la validez de la corrida analítica.</p>
--	---

Tabla 18 Prueba de Identidad de Antígenos

Muestras de Prueba	Producto llenado Producto Empacado
Descripción de la Valoración	<p>Muestras de vacunas se separan del adsorbente vía un tampón de extracción que contiene SDS y Ditiotreitól (DTT), se calientan, y luego se centrifugan; las proteínas extraídas se ubican en el sobrenadante luego del paso de centrifugación. Para cada uno de los cuatro antígenos, el marcador de PM, 1 μg de estándar de referencia aplicable, y el extracto de vacuna (en una cantidad comparable al estándar) se cargan sobre el gel de poliácridamida. Además, para la proteína recombinante NadA únicamente, 1 μg de estándar de referencia, estresado a 37°C durante dos meses, también se aplica al gel para la evaluación de resultados de estabilidad.</p> <p>Las proteínas se separan por electroforesis (separación en un campo eléctrico). Luego de la electroforesis, cada gel se transfiere sobre una membrana de transferencia, transfiriendo las proteínas separadas. Los <i>blots</i> se pretratan con una solución de bloqueo que contiene detergente durante 30 minutos a temperatura ambiente (TA) para evitar la unión no específica. Luego, las membranas se sondean con anticuerpos específicos a cada antígeno a TA. El anticuerpo</p>


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

[Signature]
 Novartis Argentina S.A.
 Farm. Sergio Imirzian
 Gte. de Asuntos Regulatorios
 Codirector Técnico - M.N. 11521
 Apoderado

445

secundario se agrega a TA, seguido por una serie de pasos de lavado y la solución de desarrollo (que contiene el sustrato para la tinción basada en enzimas de las bandas de proteína específicas).

Los Western Blots se evalúan en forma cualitativa por la comparación visual de bandas de muestra al estándar. La identidad de cada proteína se confirma cuando una banda de reacción (que puede ser de intensidad leve) para cada muestra se alinea con este estándar de referencia correspondiente. Para la proteína recombinante NadA, una banda también debería alinearse con el estándar de referencia de proteína recombinante NadA que se estresó a 37°C, y, de haber bandas, si bien leves, deberían estar alineadas con el estándar o entre los dos estándares (estresado a 37°C y no estresado). Se verifican los criterios adecuados de idoneidad del sistema para confirmar la validez de la corrida analítica.


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

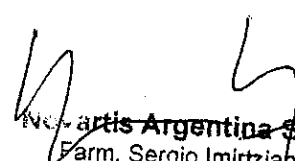

Novartis Argentina S.A.
Farm. Sergio Imirtzian
Gte. de Asuntos Regulatorios
Codirector Técnico - M.N. 11521
Apoderado


Tabla 19 Aspecto

Muestras de Prueba	Producto llenado
Descripción de la Valoración	Los contenidos de un mínimo de tres jeringas se examinan contra un fondo negro para evaluar la transparencia o claridad, y contra un fondo blanco para evaluar la coloración; ambas exámenes se llevan a cabo bajo condiciones de luz difusa. La prueba es satisfactoria si el líquido es opalescente, con suspensión blanca.

Tabla 20 Biocarga

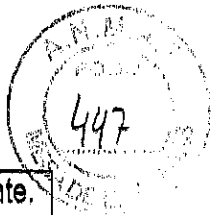
Muestras de Prueba	Granel Final Prefiltrado Agua de Enjuague (WFI)
Descripción de la Valoración	Un volumen especificado de muestra de prueba se filtra a través de un filtro de membrana estéril de 0,45 µm. Luego, el filtro se enjuaga 3 veces con 100 ml de Solución de Enjuague (Tampón peptona), y se transfiere en forma aséptica a placas TSA y SDA. La solución de enjuague filtrada de la misma manera que las muestras de prueba sirve como el control negativo. Se lleva a cabo incubación a 30-35°C durante 3-5 días para las placas TSA y a 20-25°C durante 5-7 días para las placas SDA. Al final del período de incubación, se recuentan las colonias formadas sobre las placas. Si se detecta crecimiento microbiano, los contaminantes se identifican e investigan. La prueba se considera válida si el control negativo no muestra crecimiento.
Consistencia a Farmacopeas	Ph. Eur. Capítulo 2.6.12 Examinación Microbiológica de Productos No Estériles: Pruebas de Enumeración Microbiana USP Capítulo <61> Examinación Microbiológica de Productos No Estériles: Pruebas de Enumeración Microbiana

Tabla 21 Endotoxina


Muestras de Prueba	Producto llenado
Descripción de la Valoración	Para generar la curva estándar de tres puntos, se llevan a cabo diluciones seriales en diez veces de la Endotoxina Estándar de Referencia (RSE, USP o equivalente) en agua reactivo para LAL, comenzando en una concentración de RSE de 50 IU/ml. Nótese que cada dilución debe agitarse en mezclador de vórtice durante

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



	<p>aproximadamente 1 minuto antes de preparar la dilución siguiente. Se genera una curva estándar separada para cada operación.</p> <p>Se pretratan muestras de prueba según su método validado respectivo. Las muestras de prueba de la vacuna Bexsero se prueban en duplicado en tres sesiones analíticas separadas, que dan lugar a seis determinaciones individuales por muestra.</p> <p>Las muestras se diluyen 1/10000 en agua reactivo para LAL; las muestras utilizadas para la primera dilución se agitan en mezclador de vórtice durante 15 segundos y durante dos segundos para cada dilución posterior. El pH de la solución de prueba debe caer dentro del rango de 7,0-8,0. Para verificar la presencia de factores interferentes, en cada determinación, la muestra se adiciona con 10 µl de solución RSE (0,05IU/ml). Las muestras enriquecidas sirven como controles positivos y se prueban contra las muestras de prueba no enriquecidas. El agua reactivo para LAL libre de pirógenos utilizada para la preparación de muestras sirve como el blanco o control negativo.</p> <p>Todas las diluciones de la endotoxina estándar de control, las muestras de prueba, las muestras enriquecidas, y los controles negativos se operan por duplicado en una placa de microtitulación, y se preincuban antes de la adición del reactivo LAL (lisado) a cada pocillo durante 10 minutos a $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Luego de la adición del reactivo lisado LAL, las placas se agitan durante 30 segundos a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ antes de la medición.</p> <p>La absorbancia se lee a una longitud de onda de 405 nm y las concentraciones de muestra se calculan a partir de los tiempos de reacción respectivos contra una curva estándar. La cantidad de Endotoxina se calcula a partir de la media geométrica de los puntos válidos de las seis determinaciones. Se verifican los criterios adecuados de idoneidad del sistema para confirmar la validez de la corrida analítica.</p>
<p>Consistencia a Farmacopeas</p>	<p>Ph. Eur. Capítulo 2.6.14 Endotoxinas Bacterianas USP-NF <85> Prueba de Endotoxinas Bacterianas</p>


Novartis Argentina S.A.
 Dr. Lucio Jeronimo
 Director Técnico
 M.N. 14840



Novartis Argentina S.A.
 Dr. Sergio Imirtzian
 Director Técnico
 Director Técnico - M.N. 11521
 Apoderado

Tabla 22
**Inmunización de Ratón – Valoración de Potencia Relativa de Dilución
Múltiple de CD1**

Muestras de Prueba	Producto llenado
Líneas Celulares y Animales de Prueba	Cepa de Ratón CD-1, 5-8 semanas de edad al momento de la inoculación, de una granja de cría calificada
Estándares y Controles de Referencia	Estándar de Referencia: Lote Tetravalente de MenB Calificado
Descripción de la Valoración	<p>La inmunización de ratones se lleva a cabo después que finaliza un período de cuarentena y aclimatación. Se utilizan ocho ratones para cada dilución de la muestra y la vacuna de referencia a inyectar. Además, cinco ratones se tratan con solución salina como control negativo en la prueba. Cada ratón se inyecta por vía intraperitoneal (IP) con un volumen de dosis de 0,5 ml de muestra, estándar o control negativo según el grupo definido. Se preparan seis (6), diluciones seriadas de cuatro veces de la vacuna de referencia y de prueba mediante dilución en solución salina o diluyente de Bexsero. Sólo las diluciones 3, 4, 5 y 6 de las vacunas de referencia y de muestra se utilizan para la inmunización de ratones; las diluciones 1 y 2 se desechan. Los ratones se inmunizan en los días 0, 21 y el sangrado final se lleva a cabo en el día 34-36. El sangrado final y la preparación de sueros se realizaron de acuerdo con el procedimiento. Un segundo curso de inmunización se lleva a cabo siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente. Todos los sueros derivados de la primera y segunda corrida se analizan usando un enzimoimmunoensayo (ELISA) de acuerdo con los procedimientos. Todos los animales deben ser mantenidos en buen estado de salud durante toda la duración de la prueba.</p>



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



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

