



Tabla 23
Valoración de Potencia Relativa de Dilución Múltiple de CD1 para OMV-NZ por ELISA

Muestras de Prueba	Suero de ratones inmunizados
Líneas Celulares y Animales de Prueba	No aplicable
Estándares y Controles de Referencia	<p>Sueros de Estándar de Referencia: Combinado de suero de ratones inmunizados con la vacuna Bexsero en títulos elevados de anticuerpos anti-OMV-NZ</p> <p>Sueros de Control Positivo: Combinado de suero de ratones inmunizado con Bexsero en títulos medios y bajos de anticuerpos anti-OMV-NZ</p>
Descripción de la Valoración	<p>Placas de microtitulación se recubren con el antígeno purificado (OMV-NZ), se incuban durante 2,5 horas a $30 \pm 1^\circ\text{C}$, y se lavan tres veces. Se agrega polivinilpirrolidona (PVP) a cada pocillo como una solución de bloqueo para evitar la unión no específica, se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente ($20-25^\circ\text{C}$), se lavan tres veces y se almacenan a $2-8^\circ\text{C}$ hasta su uso.</p> <p>Se obtiene suero de prueba por inmunización de ratones en forma intraperitoneal con vacuna, seguido por sangrado y preparación de suero, según el procedimiento. Se diluyen estándar de referencia, controles positivos, y suero de prueba en tampón de dilución suplementado con seroalbúmina bovina (BSA) y se agrega a los pocillos adecuados. Los pocillos libres de suero sirven como blancos de valoración. Las placas se incuban durante 2 horas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ y se lavan tres veces. Los anticuerpos secundarios de cabra anti-ratón conjugados con fosfatasa alcalina se añaden a cada pocillo, se incuban durante 2 horas a $30 \pm 1^\circ\text{C}$, luego se lavan tres veces. El sustrato, pNPP, se agrega a todos los pocillos y las placas se incuban durante 25-30 minutos a temperatura ambiente. La reacción se termina por la adición de una solución quelante a todos los pocillos. La absorbancia de cada pocillo se lee en una longitud de onda doble de $405/620-650 \text{ nm}$.</p> <p>Las densidades ópticas (OD) para cada estándar de referencia se utilizan para construir una curva estándar, por el uso de un ajuste logístico de 4 parámetros. La absorbancia de las muestras de prueba se interpola de la curva estándar.</p>

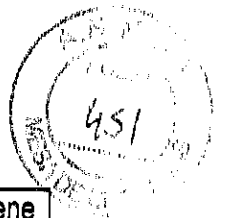

Novartis Argentina S.A.
 Dr. Lucio Jeroncio
 Director Técnico
 MN 14840


Novartis Argentina S.A.
 Farré, Sergio Imirtzian
 Gte. de Asuntos Regulatorios
 Codirector Técnico - M.N. 11521
 Apellido@E

	<p>La potencia relativa de la vacuna de prueba contra la vacuna de referencia para OMV se calcula mediante la aplicación del Análisis de Línea paralela con rango de Deslazamiento (PLAS) de la curva dosis-respuesta (como se describe en Ph. Eur. <5.3> Análisis Estadístico de los Resultados de Pruebas y Valoraciones Biológicas) utilizando software validado.</p>
--	--

Tabla 24 Valoración de Potencia Relativa de Dilución Múltiple de rp-CD1 por ELISA

Muestras de Prueba	Suero de inmunización de ratones
Estándares de Referencia y Controles	<p>Suero Estándar de Referencia: sueros combinados de ratones inmunizados con la vacuna Bexsero en altos títulos de anticuerpos anti- proteína recombinante de fusión NHBA</p> <p>Suero Control Positivo: mezcla de sueros de ratones inmunizados con Bexsero a títulos medios y bajos de anticuerpos anti- proteína recombinante de fusión NHBA</p>
Descripción del Ensayo	<p>Las placas de microtitulación se recubren con antígeno purificado (una placa de microtitulación por antígeno: proteína recombinante NadA , proteína recombinante de fusión fHbp o proteína recombinante de fusión NHBA). Las placas se incuban durante 14 - 18 horas a 2-8° C, y se lavan tres veces. Se añade polivinilpirrolidona (PVP) a cada pocillo como una solución de bloqueo para evitar unión no específica, se incuban durante 2 horas a 37 ± 1° C, se lavan tres veces y después se almacenan a 2-8°C hasta su uso.</p> <p>El suero de prueba se obtiene por inmunización de ratones por vía intraperitoneal con la vacuna, seguido de sangrado y la preparación de suero de acuerdo con el procedimiento. El estándar de referencia, control positivo y los sueros de prueba se diluyen en tampón de dilución suplementado con seroalbúmina bovina (BSA) y se añade a los pocillos adecuados. Los pocillos libres de suero sirven como blanco de ensayo. Las placas se incuban durante 2 horas a 37 ± 1°C, y se lavan tres veces. Los anticuerpos secundarios anti-ratón de cabra conjugados con fosfatasa alcalina se añaden a cada pocillo, se incuban durante 1,5 horas a 37 ± 1°C, y luego se lavan tres veces. El sustrato, pNPP, se añade a todos los pocillos y las placas se incuban durante</p>



	<p>30 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detiene mediante la adición de una solución de parada en todos los pocillos. La absorbancia de cada pocillo se lee a una longitud de onda dual de 405/620-650 nm.</p> <p>La determinación cuantitativa de las muestras de suero en la prueba de ELISA se basa en la comparación de la curva obtenida para cada muestra en relación con la curva de suero estándar. El título de anticuerpos de cada muestra (expresado en Unidades ELISA por mililitro, EU / ml) se calcula utilizando el método de Ensayo de Línea de Referencia. En el cálculo, se seleccionan al menos cuatro puntos consecutivos de la parte lineal de las curvas de suero estándar y sueros de muestras; la pendiente y los parámetros de intersección se calculan de acuerdo a la porción lineal seleccionada de las curvas de dilución.</p> <p>La Potencia Relativa de la vacuna de prueba en comparación con la vacuna de referencia, para cada proteína recombinante, se calcula utilizando el Análisis de Línea Paralela con Rango de Desplazamiento (PLAS) de la curva de dosis-respuesta (como se describe en Ph. Eur. < 5.3 > <i>Análisis Estadístico de los Resultados de los Ensayos y Pruebas Biológicas</i>) utilizando software validado.</p>
--	--


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



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

Tabla 25 Osmolaridad

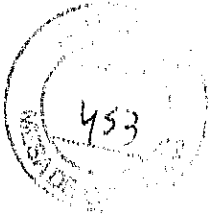
Muestras de Prueba	Producto llenado
Descripción de la Valoración	Se seleccionan dos estándares de calibración y se utilizan para la de calibración del instrumento. Se miden cuatro viales del control positivo y muestras de ensayo adecuados; la primera medición para cada conjunto se utiliza para enjuagar la máquina y no se incluye en los cálculos. Los resultados se presentan como el promedio de los las tres últimas mediciones. El análisis es válido si el positivo de control está dentro de ± 4 mOsm / kg del rango del título teórico.
Consistencia a Farmacopeas	Ph. Eur. Capítulo 2.2.35 Osmolaridad USP <785> Osmolalidad y Osmolaridad

Tabla 26 pH

Muestras de Prueba	Producto llenado
Consistencia a Farmacopeas	Ph. Eur. Capítulo 2.2.3 Determinación potenciométrica de pH USP <791> pH


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

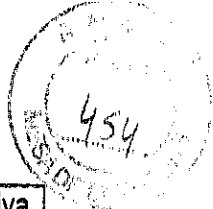

Novartis Argentina S.A.
 Sr. Sergio Imirtzian
 Director Técnico - M.N. 11521
 Apoderado


Tabla 27 Pirógeno

Muestras de Prueba	Producto llenado
Líneas Celulares y Animales de Prueba	<p>Conejo blanco Nueva Zelanda, adulto macho o hembra, libre de patógenos específicos, de criaderos calificados.</p> <p>Al menos de 1,5 kg de peso, sometido a una cuarentena de al menos 8 días, y debe ser naive (sin tratamiento previo)</p>
Descripción de la Valoración	<p><u>Pruebas Preliminares para Conejos Nuevos</u></p> <p>Se realizan dos pruebas preliminares (de selección), utilizando solución salina estéril no pirogénica, 1-7 días antes del producto de prueba para conejos nuevos. Antes del inicio de la prueba preliminar, se mide la temperatura rectal de todos los animales a intervalos de 15 minutos durante un período de 105 minutos para establecer las condiciones iniciales; la temperatura al inicio se determina mediante el promedio de las lecturas a los 75 y 105 minutos. Todos los animales que exhiben temperaturas que oscilan entre $\geq 38^{\circ}\text{C}$ y $\leq 39,8^{\circ}\text{C}$ pueden utilizarse en la prueba.</p> <p>Para las dos pruebas preliminares, se administra salina estéril no pirogénica en forma intravenosa a cada animal, a 10 ml/kg. La temperatura se controla en intervalos de 30 minutos durante tres horas, y se determina la temperatura máxima de cada conejo durante el intervalo de tiempo. La diferencia (aumento de la temperatura) entre la temperatura máxima y la temperatura de inicio debe ser $\leq 0,6^{\circ}\text{C}$ para el mismo animal a fin de utilizar el animal para la prueba de la muestra del producto.</p> <p><u>Prueba del Producto</u></p> <p>Todos los animales nuevos que cumplen los criterios para la prueba preliminar deben utilizarse dentro de los siete días de la prueba satisfactoria. Los conejos no se alimentan durante el período de prueba. Para la prueba final, los conejos se dividen en grupos de tres, y se inocula un producto en cada grupo. Para determinar la temperatura de inicio, se mide la temperatura rectal de todos los animales a intervalos de 15 minutos durante un período de 105 minutos; la temperatura de inicio se determina por el promedio de las lecturas a 75 y 105 minutos. Todos los animales que exhiben temperaturas que oscilan entre $\geq 38^{\circ}\text{C}$ y $\leq 39,8^{\circ}\text{C}$, y cuyas temperaturas en cada grupo de prueba no difieren entre sí en $> 1,0^{\circ}\text{C}$, pueden utilizarse en la prueba.</p> <p>La muestra de prueba se diluye 1:700 en solución salina, se calienta a $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$, y se inocula en forma intravenosa en la vena marginal de la oreja de cada ratón. La diferencia de temperatura se determina de acuerdo con</p>

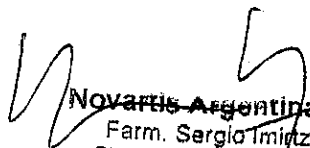
Novartis Argentina S.A.
 Dr. Lucio Jeroncio
 Director Técnico
 MN 14840

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



	<p>lo descrito con anterioridad. Se ruega notar que una diferencia negativa en la temperatura se registra como 0,00°C.</p> <p>El resultado de muestra cumple los requerimientos para la ausencia de pirógenos si ningún conejo exhibe un aumento individual de la temperatura de $\geq 0,5^{\circ}\text{C}$ sobre su temperatura de inicio respectiva. Si el aumento de la temperatura de un conejo individual excede $0,5^{\circ}\text{C}$, la prueba puede continuar con cinco conejos adicionales. Si no más que tres de los ocho conejos exhiben aumentos individuales en la temperatura de $0,5^{\circ}\text{C}$ o más o, si la suma de los aumentos de la temperatura máximos individuales no excede $3,3^{\circ}\text{C}$, el material cumple los requerimientos para la ausencia de pirógenos.</p>
<p>Consistencia a Farmacopeas</p>	<p>USP <151> Prueba de Pirógeno 21 CFR Sección 610.13 Pureza</p>


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


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

