



3.2.3 Conclusiones de la validación de cinética de inactivación en E11

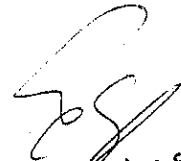
Se cumplieron los criterios de aceptación predeterminados para el estudio de los 3 lotes, y los diversos momentos analizados. Aunque el número total de muestras se redujo durante el estudio, los datos demuestran de forma fiable la inactivación completa de *N. meningitidis* a Tiempo 0 usando desoxicolato a la concentración utilizada en el proceso. La consistencia del proceso ha sido demostrada para este paso con respecto a la inactivación.

3.3 Estudio de Robustez de cinética de inactivación - TR 250708-01

3.3.1 Resumen

Se realizó un estudio adicional de cinética de inactivación para demostrar la robustez del proceso de inactivación. Los materiales utilizados en el estudio fueron proporcionados por el departamento de producción (material de corrida de prueba a escala completa), y el estudio en sí mismo se llevó a cabo en los laboratorios de control de calidad. Se sembraron muestras de la material de fermentación y se trataron con diversas concentraciones de Tampón A1, y el tiempo de contacto varió desde 0 hasta 20 minutos.

Las pruebas de inactivación se llevaron a cabo de acuerdo con el procedimiento de la empresa sobre placas con medio Mueller Hinton. Para cada momento (y Concentración de tampón A1) se inocularon cinco (5) placas con 0,1 ml y cinco placas con 0,01 ml de caldo de fermentación. Se añadió el agente de inactivación en diversas concentraciones en la misma proporción volumétrica que durante la producción (1:20)


Novartis Argentina S.A.
Vacunas & Diagnóstico
Farm. Marina Motta
Gte. Asuntos Regulatorios
Apoderada


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



3.3.2 Resultados

Los resultados del estudio para el estudio de robustez de la cinética de inactivación en los laboratorios de control de calidad se proporcionan en las Tablas 5 y 6 a continuación.

Tabla 5: Resultados del estudio para el estudio de la robustez de la cinética de inactivación (0,1 ml de inoculación)

| Partida de producto | Densidad de células inicial | Potencia de tampón A | Resultados en diversos momentos de contacto (de acuerdo a POE 202298) | | |
|---------------------|---|----------------------|---|--|--|
| | | | Media de UFC/placa a T ₀ | Media de UFC/placa a T _{10 min} | Media de UFC/placa a T _{20 min} |
| MEB-TRUN02 | 6,1 x 10 ⁹ UFC/ml (inoculación de 0,1 ml) | Normal | 0 | 0 | 0 |
| | | Dilución 1:2 | 0 | 0 | 0 |
| | | Dilución 1:4 | 0,6 | 0 | 0 |
| | | Dilución 1:8 | TNTC | TNTC | TNTC |
| MEB-TRUN03 | 1,2 x 10 ⁹ UFC/ml (inoculación de 0,1 ml) | Normal | 0 | 0 | 0 |
| | | Dilución 1:2 | 0 | 0 | 0 |
| | | Dilución 1:4 | 2,4 | 0,2 | 0 |
| | | Dilución 1:8 | TNTC | 0 | 0 |

TNTC= demasiado numerosos para contar

Novartis Argentina S.A.
Vacunas & Diagnóstico
Farm. Marina Motta
Gte. Asuntos Regulatorios
Apoderada

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



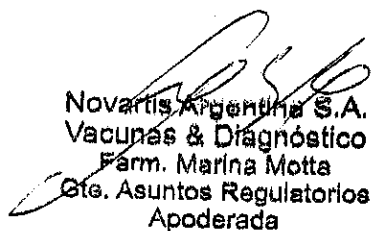
Tabla 6: Resultados del estudio para el estudio de robustez de la cinética de inactivación (0,01 ml de inoculación)

| Partida de producto | Densidad de células inicial | Potencia de tampón A | Resultados en diversos momentos de contacto (de acuerdo a POE 202298) | | |
|---------------------|--|----------------------|---|--|--|
| | | | Media de UFC/placa a T ₀ | Media de UFC/placa a T _{10 min} | Media de UFC/placa a T _{20 min} |
| MEB-TRUN02 | 6,1 x 10 ⁹ UFC/ml (inoculación de 0,01 ml) | Normal | 0 | 0 | 0 |
| | | Dilución 1:2 | 0 | 0 | 0 |
| | | Dilución 1:4 | 0 | 0 | 0 |
| | | Dilución 1:8 | TNTC | TNTC | TNTC |
| MEB-TRUN03 | 1,2 x 10 ⁹ UFC/ml (inoculación de 0,01 ml) | Normal | 0 | 0 | 0 |
| | | Dilución 1:2 | 0 | 0 | 0 |
| | | Dilución 1:4 | 0,6 | 0 | 0 |
| | | Dilución 1:8 | TNTC | 0 | 0 |

TNTC= demasiado numerosos para contar

3.3.3 Conclusiones del estudio de robustez de la cinética de inactivación

Los resultados demuestran que la concentración de Tampón A1 utilizado durante el proceso con un tiempo de contacto de 30 minutos es suficiente para lograr la inactivación completa del cultivo bacteriano. Por otra parte, una concentración de tampón A1 correspondiente al 25% de lo que se utiliza normalmente durante la etapa de inactivación conduce a la inactivación completa después de sólo 20 minutos de contacto. Basándose en los resultados obtenidos, el proceso es suficientemente robusto para tolerar un error posible en el volumen de tampón A1 añadido hasta un 25% del valor requerido en el procedimiento.


Novartis Argentina S.A.
Vacunas & Diagnóstico
Farm. Marina Motta
Cte. Asuntos Regulatorios
Apoderada


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



3.4 Validación del proceso completo (E40 Suite A) - OMVZ/028/40/PVR/03-01

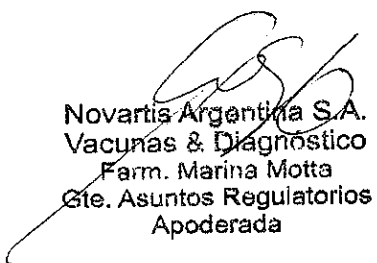
3.4.1 Resumen

Durante el estudio de validación del proceso de elaboración de OMV en E40 (Suite A de Rosia), la fase de concentración e inactivación fue validada de acuerdo con parámetros definidos del proceso, y se confirmó con los atributos de calidad relacionados.

El estudio demostró que a lo largo de las 5 partidas ejecutadas, la etapa de inactivación se realizó de una manera consistente, e inactivó efectivamente a *N. meningitidis*.

3.4.2 Resultados

Los resultados de la validación para la etapa de concentración e inactivación de la validación del proceso del edificio 40 se proporcionan en la Tabla 7 a continuación.


Novartis Argentina S.A.
Vacunas & Diagnóstico
Farm. Marina Motta
Gte. Asuntos Regulatorios
Apoderada


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

Tabla 7 Resultados de validación para la etapa de concentración e inactivación en Edificio 11

| Parámetro | Criterio de aceptación | Lote 01-1201 | Lote 01-1202 | Lote 01-1203 | Lote 01-1204 | Lote 01-1205 |
|---|--|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Parámetros del proceso | | | | | | |
| Temperatura del cultivo durante la fase de concentración | < 15°C | <15 | <15 | <15 | <15 | <15 |
| Presión de alimentación durante la fase de concentración | 0,5 ± 0,1 bar | 0,5 ± 0,1 | 0,5 ± 0,1 | 0,5 ± 0,1 | 0,5 ± 0,1 | 0,5 ± 0,1 |
| Volumen final de concentración | 22 ± 1 Kg ¹ | 22 | 22 | 22 | 22 | 22 |
| pH después del agregado de buffer A | 8,6 ± 0,2 | 8,6 | 8,6 | 8,6 | 8,5 | 8,6 |
| Tiempo de recirculación después del agregado de buffer A | 20 min ² | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 |
| Presión de alimentación durante la inactivación | 1 bar ³ | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Tiempo de recirculación después del agregado de buffer A1 | 30 min ⁴ | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 |
| Cantidad de tampón A de lavado | NLT 20 Kg ⁵ | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 |
| Tiempo de lavado con tampón A | NLT 10 min | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Atributos de calidad | | | | | | |
| Presión del retentato | 0,1-0,2 bar | 0,170-0,192 | 0,170-0,180 | 0,168-0,191 | 0,170-0,190 | 0,172-0,195 |
| pH al final de la fase de inactivación | 7.84 – 8.54 | 8,06 | 8,06 | 8,06 | 8,07 | 8,04 |
| Control de inactivación | Ausencia de <i>N. meningitidis</i> serogrupo B | Ausencia | Ausencia | Ausencia | Ausencia | Ausencia |

Joc#: 320441 # Patrimonio N/C, Fecha de vigencia: 12Set14

Novartis Argentina S.A.
Vacunas & Diagnóstico
Farm. Marina Mosta
Cte. Asuntos Regulatorios
Apoderada

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

CONFIDENCIAL


Página 16 de 19

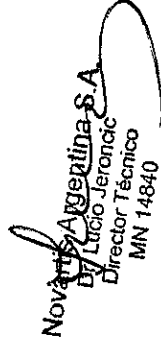


Documento Nº: 320441-01

NLT = no menos de

- 1 La masa de concentrado después de la segunda etapa de concentración ha sido redefinido como el factor de concentración volumétrica (VFC) en un QRA posterior a la validación e implementado en la producción.
- 2 El tiempo de recirculación de tampón A ha sido reevaluado en un QRA posterior a la validación con un criterio de aceptación de NLT 20 min.
- 3 Se introdujo un rango alrededor de la presión de alimentación de destino durante la inactivación (1 bar \pm 0,2 bar después de de un QRA posterior a la validación.
- 4 El criterio de aceptación para el tiempo de recirculación de tampón A1 se ha redefinido como NLT30 minutos en un QRA posterior a la validación.
- 5 El rango para el parámetro de proceso de la cantidad de tampón A utilizado para el lavado final se ha redefinido en un QRA posterior a la validación. El rango ahora se define como NLT 2,5 Kg de tampón A por m² de membrana y se ha implementado en la producción


Novartis Argentina S.A.
Vacunas & Diagnóstico
Farm. Marina Motta
Gte. Asuntos Regulatorios
Apoderada


Novartis Argentina S.A.
Licio Jeronice
Director Técnico
MN 14840





3.4.3 Conclusiones de la validación del proceso de Suite A de E40

Se cumplieron los criterios de aceptación predeterminados para los parámetros del proceso para los 5 lotes ejecutados. La consistencia del proceso se demostró para este paso en la Suite A del Edificio 40 con respecto a la inactivación.

4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

Este documento resume los datos de los estudios históricos de validación de proceso de OMV, así como un estudio a escala de laboratorio ejecutado como se muestra a continuación.

Tabla 8 Resumen de Estudios de inactivación de OMV

| Referencia de documento | Período de ejecución | Escala completa o escala de lab |
|--|-----------------------|---|
| Validación completa del proceso (E11) OMVZ/028/11/PVR/00 | Marzo a junio de 2007 | Escala completa (Fermentación de de 350 litros) |
| Validación de la cinética de inactivación (E11) OMVZ/028/11/PVR/02-01 | Mayo a junio de 2007 | Escala completa (Fermentación de de 350 litros) |
| Estudio de robustez de la cinética de inactivación TR 250708-01 | Febrero de 2008 | Escala de laboratorio (placas de cultivo) |
| Validación de proceso completo (suite A de E40) OMVZ/028/40/PVR/03-01 | Abril a mayo de 2008 | Escala completa (Fermentación de de 450 litros) |

Estos estudios demuestran que la inactivación de *N. meningitidis* tipo B Cepa Nueva Zelanda, después de la adición de Tampón A1, se lleva a cabo de una manera coherente, robusta y reproducible y que el proceso es capaz de elaborar productos consistentemente de conformidad con la especificación de la liberación.

Además, estos estudios demuestran que cuando se añade el agente de inactivación a la concentración predeterminada, la inactivación es esencialmente instantánea. Por esta razón, los datos proporcionados en estos estudios se consideran suficientes

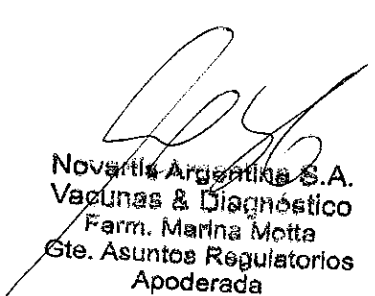
CONFIDENCIAL

Novartis Argentina S.A.
Vacunas & Diagnóstico
Farm. Marina Motta
Gte. Asuntos Regulatorios
Apoderada

Novartis Argentina S.A. Página 18 de 19
Dr. Lucio Jeroncio
Director Técnico
MN 14840



para apoyar la eficacia de la etapa de inactivación, y no es necesario un estudio a escala completa de la cinética de inactivación en E40. La eficacia global de la inactivación se demostró durante el estudio de validación del proceso en 2008, y esto se considera suficiente junto con los controles de inactivación de rutina que se encuentran vigentes para cada lote de principio activo OMV producido.


Novartis Argentina S.A.
Vacunas & Diagnóstico
Farm. Marina Motta
Ste. Asuntos Regulatorios
Apoderada


Novartis Argentina S.A.
Dr. Lucio Jeronim
Director Técnico
MN 44840

**Pregunta 2**

Procedimientos analíticos: falta descripción detallada que incluya fundamento, criterios de aceptación y análisis estadístico (de ser necesario) para los siguientes ensayos sobre el producto terminado: tasa de adsorción, identidad de antígenos, Potencia relativa de dilución múltiple para OMV, Potencia relativa de dilución múltiple de rp_CD1.

Respuesta de Novartis

La información solicitada se describe para los diferentes métodos de análisis a continuación.

1. Tasa de adsorción.*Fundamento*

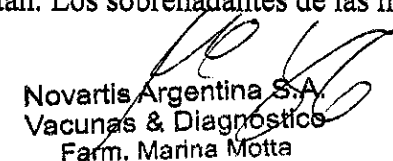
Este método se usa para la determinación de la tasa de adsorción de los antígenos de la vacuna 4CMenB (Bexsero®) al adsorbente, hidróxido de aluminio. Dado que la medición directa de los componentes antigénicos adsorbidos al hidróxido de aluminio no es posible, la tasa de adsorción se determina indirectamente a través de la evaluación del antígeno no adsorbido en el sobrenadante de vacuna.

La tasa de adsorción se determina por análisis SDS-PAGE, en el que las proteínas se disocian en sus cadenas polipeptídicas por el detergente, dodecil sulfato de sodio (SDS), después de la reducción de los enlaces disulfuro. Las proteínas reducidas luego se separan mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE). Las bandas se visualizan con azul de Coomassie. La tasa de adsorción se cuantifica por comparación de la intensidad de la banda de antígeno no adsorbido con cantidades conocidas de estándares de referencia, y la cantidad de antígeno adsorbido se determina mediante sustracción.

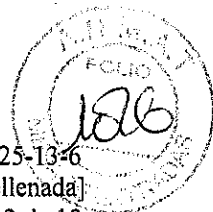
Descripción del ensayo

Los estándares de referencia para las proteínas recombinantes (287-953, 961c y 936-741), que consisten de pools de las tres proteínas, se cargan en diferentes cantidades, que corresponden al 15%, 10% y 5% de vacuna no adsorbida. Los estándares de referencia para OMV (cepa Nueva Zelanda), se cargan en diferentes cantidades, que corresponden al 15%, 10% y 5% de vacuna no adsorbida. El antígeno, en una cantidad que corresponde al 5% de vacuna no adsorbida para cada proteína recombinante y para OMV, sirve como muestra de adición y se corre en cada ensayo.

El sobrenadante utilizado para las pruebas se separa del adyuvante por centrifugación. Los estándares de referencia, las muestras de prueba y muestras adicionadas se precipitan con desoxicolato y ácido tricloroacético (TCA), y los sedimentos resuspendidos se calientan. Los sobrenadantes de las muestras, junto con marcador de peso molecular y los


Novartis Argentina S.A.
Vacunas & Diagnóstico
Farm. Marina Motta
Gte. Asuntos Regulatorios
Apoderada


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



estándares de referencia se agregan a los pocillos adecuados del gel de SDS-PAGE y se realiza la electroforesis.

Para la evaluación de las tres proteínas recombinantes, se corren tres cantidades de estándar de referencia compuesto por un pool de proteínas recombinantes 287-953, 961c, y 936-741, junto con antígeno OMV estándar que corresponde al 10% de vacuna no absorbida, sobrenadante de vacuna no adicionado, sobrenadante de vacuna adicionado con una cantidad que corresponde al 5% de vacuna no adsorbida de un pool de proteínas recombinantes, y el marcador de PM. Para la evaluación del antígeno OMV, se corren tres cantidades de estándar de referencia compuesto de antígeno OMV, junto con un 10% de pool de proteína recombinante, sobrenadante de vacuna no adicionado, sobrenadante de vacuna adicionado con antígeno OMV estándar que corresponde al 5% de vacuna no absorbida, y el marcador de PM.

Para visualizar las bandas, el gel se tiñe con Coomassie azul y se decolora. El gel se escanea.

Criterios de validez


El ensayo es válido si:

- los marcadores proteicos de peso molecular son visibles y se distribuyen a lo largo de toda la pista; y
- los estándares de referencia están posicionados correctamente con respecto al marcador de PM.

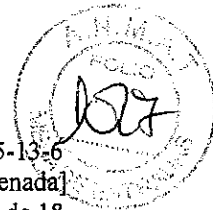
2. Prueba de identidad de antígeno.

Fundamento

El ensayo se utiliza para resolver y detectar los cuatro componentes antigénicos (rp287-953, rp961c, rp936-741, y OMV) de la Vacuna multicomponente contra meningococo B (4CMenB) a través de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) y Western blotting, respectivamente. El principio del método consiste en la separación de las proteínas por tamaño, bajo condiciones reductoras, mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. Las proteínas separadas luego se aplican a una membrana de transferencia mediante el uso de campo eléctrico. La membrana se incuba con un anticuerpo primario, que forma un complejo anticuerpo-proteína, y luego se incuba con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) que reconoce y se une al anticuerpo primario. La membrana luego se incuba con un sustrato cromogénico específico que produce una banda visible sobre la membrana de transferencia en el lugar donde está unido el anticuerpo secundario conjugado con HRP.


Novartis Argentina S.A.
Vacunas & Diagnóstico
Farm. Marina Motta
Gte. Asuntos Regulatorios
Apoderada


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



La identificación de las cuatro especies de proteínas se realiza por comparación con un estándar de referencia calificado para cada proteína.

Descripción de ensayo

Las muestras de la vacuna se separan del adsorbente a través de un buffer de extracción que contiene SDS y ditioneitol (DTT), se calientan, y después se centrifugan; las proteínas extraídas se encuentran en el sobrenadante después de la etapa de centrifugación. Para cada uno de los cuatro antígenos, se cargan sobre el gel de poliacrilamida el marcador de PM, 1 µg del estándar de referencia correspondiente, y el extracto de vacuna (en una cantidad comparable al estándar). Además, para rp961c solamente, también se aplica al gel 1 µg de patrón de referencia, sometido a 37°C durante dos meses, para la evaluación de resultados de estabilidad.

Las proteínas se separan por electroforesis (separación en un campo eléctrico). Después de la electroforesis, cada gel se aplica sobre una membrana de transferencia, lo que transfiere las proteínas separadas. Las proteínas transferidas se pre-tratan con una solución de bloqueo que contiene detergente durante 30 minutos a temperatura ambiente (TA) para evitar la unión no específica. Las membranas luego son marcadas con anticuerpos específicos para cada antígeno a TA. El anticuerpo secundario se añade 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 proteínas específicas).

Los Western blots se evalúan cualitativamente por comparación visual de las bandas de la muestra con el estándar de referencia. La identidad de cada proteína se confirma cuando una banda de reacción (que puede ser de intensidad leve) para cada muestra se alinea con su patrón de referencia correspondiente. Para rp961c debe haber una banda de reacción, aunque de intensidad leve, alineada con el estándar de referencia de 961c que fue sometido o no a 37°C.


Criterios de validez

El análisis es válido si:

- el marcador de PM de proteínas es visible y se distribuye a lo largo de toda la pista,
- el estándar de referencia para la identidad del antígeno es visible,
- el estándar está posicionado correctamente con respecto al marcador de PM.

3. Potencia relativa de dilución múltiple para OMV y rp-CD1.

Esta parte combinada de la respuesta se divide en 4 secciones diferentes.


Novartis Argentina S.A.
Vacunas & Diagnóstico
Farm. Marina Motta
Gte. Asuntos Regulatorios
Apoderada


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



- Sección 3a: Inmunización de ratón,
 - Mediante inmunización de ratón (sección 3a), se produce suero inmune contra la vacuna Multi-Componente contra Meningococo B (4CMenB).
- Sección 3b: ELISA para proteína recombinante,
 - El título de anticuerpos anti-rp en suero de ratón se cuantifica mediante un enzimoimmunoensayo (ELISA).
- Sección 3c: ELISA para OMV,
 - El título de anticuerpos anti-OMV en suero de ratón se cuantifica mediante un enzimoimmunoensayo (ELISA).
- Sección 3d: Cálculo mediante PLAS,
 - La potencia relativa de la vacuna de prueba frente a la vacuna de referencia, para cada proteína recombinante y OMV, se calcula utilizando el análisis de línea paralela con el rango de desplazamiento (PLAS) de la curva de dosis-respuesta.


3a. Ensayo de potencia relativa de dilución múltiple para CD1– Inmunización de ratón.

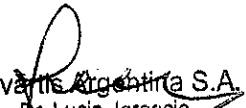
Fundamento

Este método describe el procedimiento utilizado para la inmunización, sangrado y preparación del suero inmune contra la Vacuna Multi-Componente de meningococo B (4CMenB). El título de anticuerpos se cuantificó mediante un enzimoimmunoensayo (ELISA). Los procedimientos de ELISA se describen con más detalle en las secciones 3b (para cada antígeno de la proteína recombinante) y la sección 3c (para OMV).

Descripción de ensayo

La inmunización de ratones se realiza después que finaliza el período de cuarentena y aclimatación. Se utilizan ocho ratones para ser inyectados con cada dilución de la muestra y la vacuna de referencia. Además, cinco ratones se tratan con solución salina como control negativo en la prueba. Cada ratón se inyecta por vía intra-peritoneal (IP) con un volumen de dosis de 0,5 ml de muestra, estándar o control negativo de acuerdo al grupo definido. Se preparan en forma reciente seis (6), diluciones seriadas al cuarto de la vacuna de referencia y de prueba mediante dilución en solución salina o en diluyente 4CMenB (R3) como se indica en la Tabla 1 y Tabla 2, respectivamente. Sólo se utilizan las diluciones 3, 4, 5 y 6 de las vacunas de referencia y de muestra para la inmunización de


Novartis Argentina S.A.
Vacunas & Diagnóstico
Farm. Marina Motta
Gte. Asuntos Regulatorios
Apoderada


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

los ratones; las diluciones 1 y 2 se descartan. Los ratones son inmunizados los días 0, 21 y el sangrado final se lleva a cabo en el día 34-36. El sangrado final y preparación de sueros se realizan de acuerdo con el procedimiento.

Una segunda aplicación de la 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 ensayo de inmunoenzimático (ELISA) de acuerdo con los procedimientos (ver secciones 3b y 3c).

Tabla 1 Diluciones del material de referencia para Ensayo de CD-1 MDRP

| Número de dilución | N° de ratones por dilución | Dilución real de la vacuna de referencia | Preparación de Diluciones de la Vacuna de Referencia ¹ | Cantidad teórica objetivo de antígeno por dosis de 0,5 ml | Cantidad teórica objetivo de adyuvante por dosis de 0,5 ml |
|--------------------|----------------------------|--|---|---|--|
| Dilución 1 | NC | 1/2,5 | 3 ml de vacuna sin diluir + 4,5 ml de solución salina | 20 µg rp961c 20 µg rp287-953 20 µg rp936-741 10 µg OMV | 600 µg Al(OH) ₃ |
| Dilución 2 | NC | 1/10 | 2 ml de dilución 1 + 6 ml de diluyente 4CMenB (R3) | 5 µg rp961c 5 µg rp287-953 5 µg rp936-741 2,5 µg OMV | 600 µg Al(OH) ₃ |
| Dilución 3 | 8 | 1/40 | 2 ml de dilución 2 + 6 ml de diluyente 4CMenB (R3) | 1,25 µg rp961c 1,25 µg rp287-953 1,25 µg rp936-741 0,625 µg OMV | 600 µg Al(OH) ₃ |
| Dilución 4 | 8 | 1/160 | 2 ml de dilución 3 + 6 ml de diluyente 4CMenB (R3) | 0,313 µg rp961c 0,313 µg rp287-953 0,313 µg rp936-741 0,156 µg OMV | 600 µg Al(OH) ₃ |
| Dilución 5 | 8 | 1/640 | 2 ml de dilución 4 + 6 ml de diluyente 4CMenB (R3) | 0,078 µg rp961c 0,078 µg rp287-953 0,078 µg rp936-741 0,039 µg OMV | 600 µg Al(OH) ₃ |
| Dilución 6 | 8 | 1/2560 | 2 ml de dilución 5 + 6 ml de diluyente 4CMenB (R3) | 0,020 µg rp961c 0,020 µg rp287-953 0,020 µg rp936-741 0,010 µg OMV | 600 µg Al(OH) ₃ |

¹ Vacuna Multi-Componente contra Meningococo B (4CMenB)

Placebo (R1): Al(OH)₃ (3 mg/ml), NaCl (6,25 mg/ml), Sacarosa 2%, Histidina pH 6,5 (10 mM), Agua c.s.,

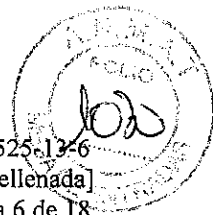
Solución salina: NaCl 9 mg/ml,

Diluyente 4CMenB (R3): Placebo (R1) diluido 1/2,5 con Solución salina

NC: No corresponde

Novartis Argentina S.A.
Vacunas & Diagnóstico
Farm. Marina Motta
Gte. Asuntos Regulatorios
Apoderada

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

**Tabla 2 Diluciones de material de prueba para ensayo de CD-1 MDRP**

| Número de dilución | N° de ratones por dilución | Dilución real de la vacuna de referencia | Preparación de Diluciones de la Vacuna de Referencia ¹ | Cantidad teórica objetivo de antígeno por dosis de 0,5 ml | Cantidad teórica objetivo de adyuvante por dosis de 0,5 ml |
|--------------------|----------------------------|--|---|---|--|
| Dilución 1 | NC | 1/2,5 | 3 ml de vacuna sin diluir + 4,5 ml de solución salina | 20 µg rp961c 20 µg rp287-953 20 µg rp936-741 10 µg OMV | 600 µg Al(OH) ₃ |
| Dilución 2 | NC | 1/10 | 2 ml de dilución 1 + 6 ml de diluyente 4CMenB (R3) | 5 µg rp961c 5 µg rp287-953 5 µg rp936-741 2,5 µg OMV | 600 µg Al(OH) ₃ |
| Dilución 3 | 8 | 1/40 | 2 ml de dilución 2 + 6 ml de diluyente 4CMenB (R3) | 1,25 µg rp961c 1,25 µg rp287-953 1,25 µg rp936-741 0,625 µg OMV | 600 µg Al(OH) ₃ |
| Dilución 4 | 8 | 1/160 | 2 ml de dilución 3 + 6 ml de diluyente 4CMenB (R3) | 0,313 µg rp961c 0,313 µg rp287-953 0,313 µg rp936-741 0,156 µg OMV | 600 µg Al(OH) ₃ |
| Dilución 5 | 8 | 1/640 | 2 ml de dilución 4 + 6 ml de diluyente 4CMenB (R3) | 0,078 µg rp961c 0,078 µg rp287-953 0,078 µg rp936-741 0,039 µg OMV | 600 µg Al(OH) ₃ |
| Dilución 6 | 8 | 1/2560 | 2 ml de dilución 5 + 6 ml de diluyente 4CMenB (R3) | 0,020 µg rp961c 0,020 µg rp287-953 0,020 µg rp936-741 0,010 µg OMV | 600 µg Al(OH) ₃ |

¹ Vacuna Multi-Componente contra Meningococo B (4CMenB)

Placebo (R1): Al(OH)₃ (3 mg/ml), NaCl (6,25 mg/ml), Sacarosa 2%, Histidina pH 6,5 (10 mM), Agua c.s.,

Solución salina: NaCl 9 mg/ml,

Diluyente 4CMenB (R3): Placebo (R1) diluido 1/2,5 con Solución salina

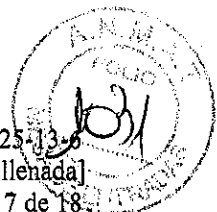
NC: No corresponde

Criterios de validez

Todos los animales deben tener buena salud durante toda la duración de la prueba en relación con el tratamiento recibido. En caso de muerte o síntomas clínicos directamente relacionados con la administración del producto (por ejemplo, ascitis o muerte súbita después de la inoculación), la prueba no es válida y se debe realizar una investigación antes de continuar con una inmunización nueva.

Novartis Argentina S.A.
Vacunas & Diagnóstico
Farm. Marina Motta
Gte. Asuntos Regulatorios
Apoderada

Novartis Argentina S.A.
Dr. Julio Beroncio
Director Técnico
MN 14840



3b. ELISA para Potencia Relativa de dilución múltiple para rp-CD1.

Fundamento

El procedimiento se utiliza para la determinación de títulos de anticuerpos anti-rp961c, anti-rp287-953 y anti-rp936-741 en sueros de ratón (preparación: véase sección 3a) a través de ensayo inmunoenzimático (ELISA). Las placas de microtitulación recubiertas con cada uno de los tres antígenos se incubaron con los anticuerpos murinos específicos de antígeno (generados por inmunización de ratones), seguido por un anticuerpo secundario anti-ratón de cabra conjugado con fosfatasa alcalina. El sustrato, paranitrofenilfosfato (pNPP), reacciona con la fosfatasa alcalina, lo que genera un producto amarillo soluble en agua, que absorbe luz a 405 nm. La cantidad de sustrato hidrolizado se cuantifica en un lector de placas a una longitud de onda doble de 405/620-650 nm. El título de anticuerpos en los sueros de ratón se cuantifica a través de la interpolación frente a una curva de estándar de referencia.

Descripción del ensayo

Las placas de microtitulación se recubren con antígeno purificado (una placa de microtitulación por antígeno: rp961c, rp936-741 o rp287-953). Las placas se incuban durante 14-18 horas a 2-8°C, y se lavan tres veces. Se agrega polivinilpirrolidona (PVP) a cada pocillo como solución de bloqueo para evitar la unión no específica, se incuban durante 2 horas a 37 ± 1°C, se lavan tres veces y después se conservan a 2-8°C hasta su uso.

El estándar de referencia, los sueros de control positivo y de prueba, obtenidos como se describe más arriba, se diluyen en buffer de dilución suplementado con seroalbúmina bovina (BSA) como se indica en la Tabla 3 y Tabla 4 a continuación y se agregan a los pocillos adecuados.

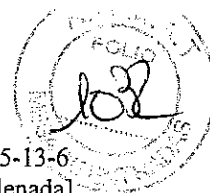
Tabla 3 Diluciones de material de prueba y de referencia para ELISA para Proteína r (rp961c y rp287-953)

| Diluciones utilizadas durante la inmunización | Cantidad teórica objetivo de antígeno por dosis de 0,5 ml | Dilución del suero estándar de referencia** | Dilución del suero de prueba para ELISA | Dilución alternativa para el suero de prueba si el resultado de DO está fuera del rango* |
|---|---|---|---|--|
| Dilución 3 | 1,25 µg rp961c 1,25 µg rp287-953 | 1/40000 | 1/10000 | 1/40000 o 1/160000 si el valor de DO es mayor que el rango 1/1000 si el de DO es menor que el rango |
| Dilución 4 | 0,3125 µg rp961c 0,3125 µg rp287-953 | 1/40000 | 1/1000 | 1/10000 o 1/40000 o 1/160000 si el valor de DO es mayor que el rango |
| Dilución 5 | 0,078 µg rp961c 0,078µg rp287-953 | 1/40000 | 1/1000 | 1/10000 o 1/40000 o 1/160000 si el valor de DO es mayor que el rango |
| Dilución 6 | 0,02 µg rp961c 0,02 µg rp287-953 | 1/40000 | 1/1000 | 1/10000 o 1/40000 o 1/160000 si el valor de DO es mayor que el rango |

* Al menos cuatro puntos consecutivos de la curva de titulación deben estar en la parte lineal.

Novartis Argentina S.A.
Vacunas & Diagnóstico
Farm. Marina Motta
Gte. Asuntos Regulatorios
Apoderada

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



** Los valores de dilución informados son indicativos: la dilución a utilizar depende del lote de suero estándar de referencia y se define durante la calificación de de cada lote nuevo de suero estándar de referencia

Tabla 4 Diluciones de material de prueba y de referencia para ELISA de Proteína r (rp936-741)

| Diluciones utilizadas durante la inmunización | Cantidad teórica objetivo de antígeno por dosis de 0,5 ml | Dilución del suero estándar de referencia** | Dilución del suero de prueba para ELISA | Dilución alternativa para el suero de prueba si el resultado de DO está fuera del rango* |
|---|---|---|---|---|
| Dilución 3 | 1,25 µg rp936-741 | 1/40000 | 1/40000 | 1/160000 si el valor de DO es mayor que el rango 1/10000 o 1/1000 si los valores de DO son menores que el rango |
| Dilución 4 | 0,3125 µg rp936-741 | 1/40000 | 1/40000 | 1/160000 si el valor de DO es mayor que el rango 1/10000 o 1/1000 si los valores de DO son menores que el rango |
| Dilución 5 | 0,078 µg rp936-741 | 1/40000 | 1/40000 | 1/160000 si el valor de DO es mayor que el rango 1/10000 o 1/1000 si los valores de DO son menores que el rango |
| Dilución 6 | 0,02 µg rp936-741 | 1/40000 | 1/10000 | 1/40000 o 1/160000 si el valor de DO es mayor que el rango e 1/1000 si los valores de DO son menores que el rango |

* Al menos cuatro puntos consecutivos de la curva de titulación deben estar la parte lineal.

** Los valores de dilución informados son indicativos: la dilución a utilizar depende del lote de suero estándar de referencia y se define durante la calificación de de cada lote nuevo de suero estándar de referencia

Los pocillos sin suero sirven como blancos de ensayo. Las placas se incuban durante 2 horas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$, y se lavan tres veces. Se añaden los anticuerpos secundarios de cabra anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina a cada pocillo, se incuban durante 1,5 horas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$, y después se lavan tres veces. El sustrato, pNPP, se añade a todos los pocillos y las placas se incuban durante 30 ± 3 minutos a temperatura ambiente. La reacción se termina mediante la adición de una solución de parada en todos los pocillos. La absorbancia de cada pocillo se lee a una longitud de onda doble de 405/620-650 nm.

La determinación cuantitativa de las muestras de suero en el ensayo 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, UE/ml) se calcula utilizando el método de ensayo de la línea de referencia. En el cálculo, se seleccionan al menos cuatro puntos consecutivos de la parte lineal de las curvas de suero estándar y de las muestras de suero; la pendiente y los parámetros de intersección se calculan de acuerdo a la porción lineal seleccionada de las curvas de dilución.

Novartis Argentina S.A.
Vacunas & Diagnósticos
Farm. Marina Motta
Gte. Asuntos Regulatorios
Apoderada

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

