

Un suero se clasifica como “no respondedor” cuando la curva de titulación tiene menos de cuatro puntos consecutivos en el rango aceptable para valores de DO, si se prueba en la dilución más baja explotable (1/1000). A los ratones no respondedores se les asigna un título mínimo definido.

#### *Criterios de validez*

El ensayo es válido si:

- el suero estándar de referencia cumple los criterios para la pendiente y la intersección en y,
- y el suero de control positivo cae dentro del rango aceptable para el título establecido.

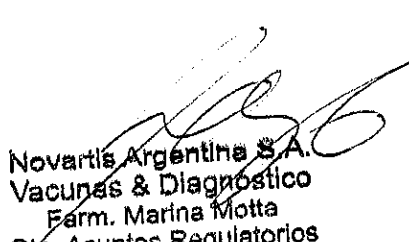
Actualmente, se están utilizando el lote 005 de suero control y el lote 004 de suero de referencia en los ensayos de ELISA. Los rangos de aceptación determinaron durante los experimentos de calificación. Los rangos se calculan mediante el cómputo de los límites de predicción bilaterales del 99% (que excluye observaciones periféricas), que es el intervalo que contendrá una única observación futura de la población de la muestra con 99% de probabilidad. Dado que el número de observaciones obtenidas durante los experimentos de calificación normalmente es bastante grande ( $n > 30$ ), una aproximación conservadora de los límites toma la forma general:

$$\text{media} \pm t_{0,01;df} * \text{sd}$$

donde  $t_{0,01;df}$  es el cuantil de la distribución t de Student bilateral (307592 -> Informe de calificación para el suero de referencia, 318234 -> Informe de calificación para el suero de control). Los criterios de aceptación se ajustan para los parámetros siguientes:

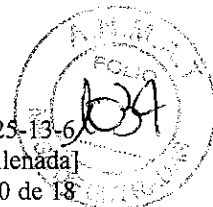
- Pendiente del suero estándar (expresada en  $\log(\text{DIL})/\log(\text{DO})$ )
- Intersección de suero estándar, dilución de punto final a DO 0,1 (expresado en  $\log(\text{DIL})$ )
- Título del suero control (expresado en UE/ml)

Para el uso el lote 004 de suero estándar y el lote 005 de suero de control los criterios de aceptación para las pruebas ELISA rp 936-741, 287-953 y rp 961c se mencionan en Tabla 5.

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

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



**Tabla 5 Criterios de aceptación para ELISAs de Proteínas r**

			Límite inferior	Límite superior
<b>ELISA 961c</b>	Estándar Lote 004	Pendiente	-1,92	-1,45
		Intersección	5,73	7,77
	Control Lote 005	Título	4821	7147
<b>ELISA rP 287-953</b>	Estándar Lote 004	Pendiente	-1,95	-1,43
		Intersección	5,30	7,61
	Control Lote 005	Título	3686	6823
<b>ELISA rP 936-741</b>	Estándar Lote 004	Pendiente	-2,14	-1,45
		Intersección	7,26	9,88
	Control Lote 005	Título	6906	11902

*Cálculo de potencia relativa*

La potencia relativa de la vacuna de prueba frente a la vacuna de referencia, para cada proteína recombinante, se calcula utilizando el Análisis de líneas paralelas con desplazamiento de rango (PLAS) de la curva dosis-respuesta (ver sección 3d).

Para el cálculo Potencia relativa se aplican el procedimiento y los criterios siguientes.

*Criterios de adecuación de la muestra*

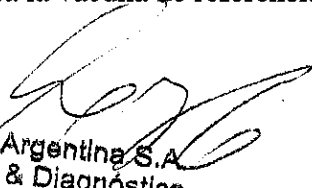
La determinación cuantitativa de la vacuna de prueba se basa en la comparación entre la curva obtenida con la vacuna de prueba y la curva obtenida con la vacuna de referencia.

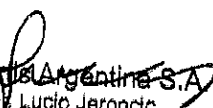
La validez de la prueba se confirma si se cumplen los siguientes criterios para las vacunas de referencia y de muestra:

- valor p de regresión  $\leq 0,001$
- la suma de los cuadrados de la no linealidad (modelo completo) son menores o iguales a los valores umbral establecidos
- la suma de los cuadrados del no paralelismo (modelo completo) son menores o iguales a los valores umbral establecidos

*Criterios de adecuación del sistema*

Para cada esquema de inmunización (corrida 1 y corrida 2), la validez del ensayo para los dos rangos de dilución (diluciones 5-4-3 y diluciones 6-5-4) se confirma si se cumplen los criterios siguientes para la vacuna de referencia:

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

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





- Valor p de regresión  $\leq 0,050$
- la suma de cuadrados de la no linealidad (estándar solo) son menores o iguales a los valores umbral establecidos

Si el ensayo es válido para ambos rangos de dilución, se utiliza para el cálculo el rango de dilución con el valor más alto de la pendiente común. Si el ensayo es válido sólo para uno de los dos rangos de dilución, este rango se utiliza para el cálculo. Si el ensayo no es válido para ninguno de los dos rangos de dilución, el ensayo se considera no válido.

#### *Cálculo*

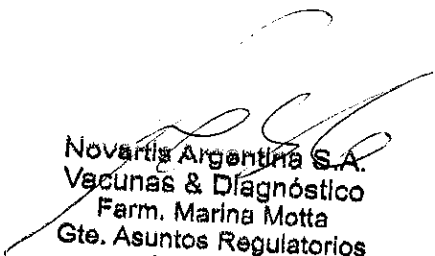
La evaluación descrita para la validez del ensayo se repite para ambos esquemas de inmunización (corrida 1 y corrida 2). Si el ensayo es válido sólo en uno de los dos esquemas de inmunización, esta corrida de inmunización se utilizará para el cálculo de Potencia relativa y límite de confianza superior.

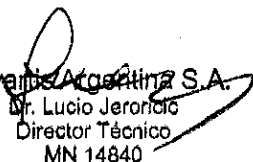
Si el ensayo es válido para ambos esquemas de inmunizaciones se utiliza una combinación de los dos resultados. La combinación de ensayos se realiza siguiendo la indicación informada en pH. Eur. <5.3.6>. Más precisamente, se evalúa la homogeneidad de los ensayos a combinar y si el valor de p para la homogeneidad es  $\geq 0,100$  se utiliza una combinación ponderada, de lo contrario se realiza una combinación semi-ponderada. Si el ensayo no es válido para ninguno de los dos esquemas de inmunización, toda la sesión se considera no válida.

### **3c. ELISA para Potencia relativa de dilución múltiple para OMV-NZ-CD1.**

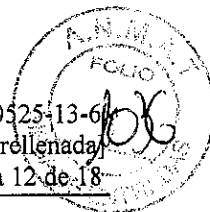
#### *Fundamento*

Este método se utiliza para la determinación de títulos de anticuerpos anti-OMV-NZ (vesículas de membrana externa, cepa Nueva Zelanda) en suero de ratón (preparación: véase la sección 3a), mediante enzimoimmunoensayo (ELISA). Las placas de microtitulación recubiertas con antígeno OMV-NZ se incuban con anticuerpos específicos-NZ-OMV murinos, seguido por anticuerpos secundarios de cabra anti-ratón conjugados 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 estándar de referencia.

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

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



*Descripción del ensayo*

Las placas de microtitulación se recubren con 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 solución de bloqueo para evitar la unión no específica, se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente, se lavan tres veces y después se conservan a  $2-8^\circ\text{C}$  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 Tabla 6 a continuación y se añade a los pocillos adecuados.

**Tabla 6 Diluciones de material de prueba y de referencia para ELISA de OMV**

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	0,625 $\mu\text{g}$ OMV	1/20000	1/3000	1/24000 o 1/96000 si el valor de DO es mayor que el rango 1/750 si el valor de DO es menor que el rango
Dilución 4	0,156 $\mu\text{g}$ OMV	1/20000	1/3000	1/24000 o 1/96000 si el valor de DO es mayor que el rango 1/750 si el valor de DO es menor que el rango
Dilución 5	0,039 $\mu\text{g}$ OMV	1/20000	1/750	1/3000 o 1/24000 o 1/96000 si el valor de DO es mayor que el rango
Dilución 6	0,01 $\mu\text{g}$ OMV	1/20000	1/750	1/3000 o 1/24000 o 1/96000 si el valor de DO es mayor que el rango

\* Al menos dos puntos consecutivos de la curva de titulación deben estar en el rango de la curva estándar.

\*\* Los valores de dilución informados son indicativos: la dilución a utilizar depende del lote de suero de estándar de referencia y se define durante la calificación 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 2 horas a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ , y después se lavan tres veces. El sustrato, pNPP, se añade a todos los pocillos y las placas se incuban durante 25-30 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.

Las densidades ópticas (DO) para cada estándar de referencia se utilizan para construir una curva estándar, usando un modelo logístico de 4 parámetros. La absorbancia de las muestras de ensayo se interpola a partir de la curva estándar.

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

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





### *Criterios de validación*

El ensayo de ELISA es válido si:

- la DO promedio del tercer pocillo de la curva estándar, sin sustracción del blanco, está dentro de límites aceptables para el lote de estándar de referencia calificado usado;
- el cuadrado del coeficiente de correlación ( $r^2$ )  $\geq 0,980$ ;
- el valor de la pendiente de la curva estándar está dentro de límites aceptables para el lote de estándar de referencia calificado utilizado;
- Por lo menos uno de los dos sueros control positivo (sueros control positivo medio o bajo) incluidos en la prueba se encuentra dentro de los límites aceptables para el lote de suero utilizado.

La prueba de ELISA se debe repetir para cualquiera de las placas que no cumplan con al menos uno de los parámetros anteriores.

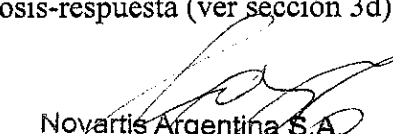
Actualmente, se están utilizando el lote 005 de suero control, el lote de suero control bajo 003 y el lote 004 de suero de referencia en los ensayos de ELISA. Los rangos de aceptación (excepto para  $R^2$ ) se determinaron durante los experimentos de calificación. Los rangos se calculan mediante el cómputo de los límites de predicción bilaterales del 99% con la misma metodología descrita anteriormente para ELISA de proteína recombinante. Para el uso del lote 004 de suero estándar y los lotes 003 y 005 de sueros de control, los criterios de aceptación para el ELISA de OMV se mencionan en Tabla 7.

**Tabla 7 Criterio de aceptación para ELISAs para OMV**

			Límite inferior	Límite superior
<b>ELISA OMV</b>	Estándar Lote 004	DO de 3° pocillo	1,049	2,711
		Pendiente	0,52	1,41
		$R^2$	>0,980	n.c.
	Ctrl bajo Lote 003	Título	2735	4632
	Control Lote 005	Título	6761	16492

### *Cálculo de la Potencia relativa*

La potencia relativa de la vacuna de prueba frente a la vacuna de referencia para los OMV se calcula aplicando el Análisis de líneas paralelas con desplazamiento de rango (PLAS) de la curva dosis-respuesta (ver sección 3d).

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

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





Para el cálculo de la potencia Relativa se aplican el procedimiento y los criterios siguientes.

#### *Criterios de adecuación de la muestra*

La determinación cuantitativa de la vacuna de prueba se basa en la comparación entre la curva obtenida con la vacuna de prueba y la curva obtenida con la vacuna de referencia.

La validez de la prueba se confirma si se cumplen los criterios siguientes para la vacuna de referencia y la de muestra:

- valor  $p$  de regresión  $\leq 0,001$
- la suma de los cuadrados de la no linealidad (modelo completo) son menores o iguales a los valores umbral establecidos
- la suma de los cuadrados del no paralelismo (modelo completo) son menores o iguales a los valores umbral establecidos

#### *Criterios de idoneidad del sistema*

Para cada esquema de inmunización (corrida 1 y corrida 2), la validez del ensayo para los dos rangos de dilución (diluciones 5-4-3 y 6-5-4) se confirma si se cumplen los siguientes criterios para la vacuna de referencia:


- valor  $p$  de regresión  $\leq 0,050$
- la suma de los cuadrados de la no linealidad (estándar solo) son menores o iguales a los valores umbral establecidos

Si el ensayo es válido para ambos rangos de dilución, se utiliza para el cálculo el rango de dilución con el valor más alto de la pendiente común. Si el ensayo es válido sólo para uno de los dos rangos de dilución, este rango se utiliza para el cálculo. Si el ensayo no es válido para ninguno de los dos rangos de dilución, el ensayo se considera no válido.

#### *Cálculo*

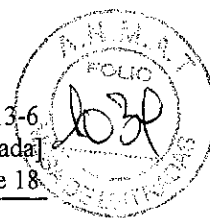
La evaluación que se describe para la validez del ensayo se repite para los dos esquemas de inmunización (corrida 1 y corrida 2). Si el ensayo es válido sólo en uno de los dos esquemas de inmunización, esta corrida de inmunización se utilizará para el cálculo de Potencia relativa y límite de confianza superior.

Si el ensayo es válido para ambos esquemas de inmunizaciones se utiliza una combinación de los dos resultados. La combinación de ensayos se realiza siguiendo la indicación informada en pH. Eur. <5.3.6>. Más precisamente, se evalúa la homogeneidad de los ensayos a combinar y si el valor de  $p$  para la homogeneidad es  $\geq 0,100$  se utiliza

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

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





una combinación ponderada, de lo contrario se realiza una combinación semi-ponderada. Si el ensayo no es válido para ninguno de los dos esquemas de inmunización, toda la sesión se considera no válida.

### 3d. Cálculo de Potencia Relativa mediante Análisis de líneas paralelas con desplazamiento de rango (PLAS).

La potencia relativa de la vacuna de prueba frente a la vacuna de referencia, para cada proteína recombinante (ver sección 3b) y OMV (ver sección 3c), se calcula utilizando el Análisis de líneas paralelas con desplazamiento de rango (PLAS) de la curva dosis-respuesta utilizando software validado.

#### Método PLAS

En el método de PLAS, se preparan seis diluciones de la vacuna de prueba, sin embargo, sólo se utilizan 4 diluciones (de la dilución 3 a la 6) para inmunizar a 8 ratones por dilución. En lugar de utilizar un rango fijo de diluciones se aplicará un conjunto de criterios de selección para determinar el rango de dilución donde mejor se cumplan los criterios de validez y se observe la pendiente más pronunciada. Esto asegura que el intervalo de dilución se traducirá en la estimación más exacta de RP.


Los títulos obtenidos para cada antígeno y ensayo independientes se analizan a continuación:


- Se ajustan los modelos de Análisis de líneas paralelas (PLA) para el rango de dilución de 3 a 5 y 4 a 6
- Se aplican los criterios de validación y se calcula la pendiente común
- En caso de que ambos rangos de dilución sean válidos, entonces se utiliza el ensayo con la pendiente más pronunciada

Más detalles de cada paso se presentan a continuación.

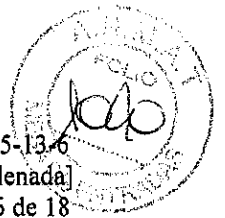
#### *Fundamento para la selección de desplazamiento de rango*

La justificación para el uso del rango de desplazamiento de diluciones se basó en la experiencia adquirida al analizar la curva de dosis-respuesta completa obtenida con el CD-1 MDRP previamente aprobado por el cual la parte lineal de la curva dosis-respuesta tiende a desplazarse entre los diferentes ensayos; lo cual es de esperar debido a la variabilidad inherente del bioensayo in vivo. El enfoque adoptado por la Empresa está en línea con la expectativa de la Ph. Eur., donde la estimación de la dosis se limita a la parte del rango de dosis-respuesta que es lineal bajo una transformación adecuada, por lo que en este caso se puede aplicar PLA (Análisis de líneas paralelas) (Ph. Eur. <5,3>, par 3.4).

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

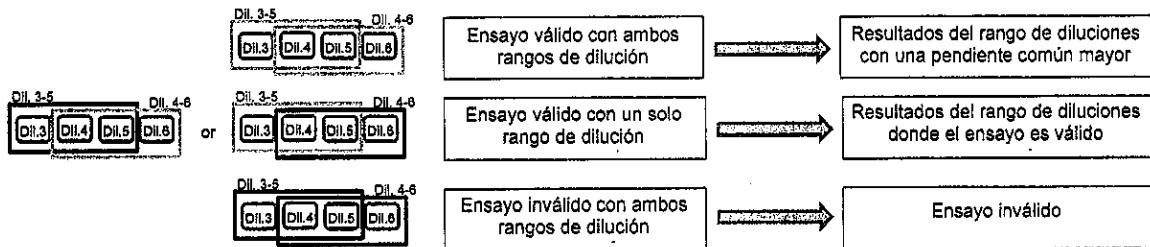
  
Novartis Argentina S.A.  
Dr. Lucio Jeroncio  
Director Técnico  
MN 14840





Este enfoque permite además la selección del rango en el que se cumplen mejor los criterios de validez especificados y se observa la pendiente más pronunciada; garantizando así la mejor estimación de la potencia relativa. Con el fin de asegurar que se selecciona la parte lineal de la curva dosis-respuesta, se determinó el rango de diluciones más adecuado en la sección a continuación. Para seleccionar el rango de diluciones a considerar entre 3-5 y 4-6 para cada antígeno en un ensayo, se sigue el árbol de decisión informado en la Figura 1:

**Figura 1 Selección del rango de dilución**



El árbol de decisión permite la selección del rango en el que los criterios de validez se cumplen mejor y se observa la pendiente más pronunciada.

*Límites de equivalencia*

Los márgenes de equivalencia consisten en un rango de valores aceptables, normalmente llamado intervalo de equivalencia, para las medidas elegidas. La Empresa ha adoptado el enfoque detallado en USP <1032>; lo que sugiere compilar datos históricos que comparan la referencia contra sí misma y determinar a partir de este conjunto de datos históricos el intervalo de equivalencia como el intervalo de tolerancia para las medidas elegidas. En ausencia de datos históricos suficientes, el conjunto de datos de 20.000 ensayos simulados de referencia vs referencia (ref-ref) se utilizó para definir los límites significativos. Los límites de equivalencia se obtuvieron como percentilos de una distribución obtenida a través de simulaciones de Monte Carlo de las mediciones elegidas. Los límites definidos para evaluar la adecuación de la muestra se presentan a continuación.

Los percentilos 99 de la suma de los cuadrados de la no linealidad y la suma de los cuadrados del no-paralelismo se informan en Tabla 8.

*[Signature]*  
 Novartis Argentina S.A.  
 Vacunas & Diagnóstico  
 Farm. Marina Motta  
 Gte. Asuntos Regulatorios  
 Apoderada

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





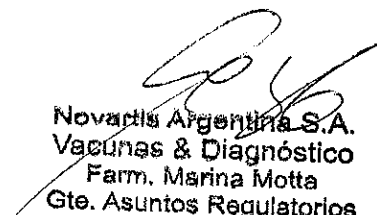
**Tabla 8 Criterios para Suma de cuadrados de la No Linealidad y para Suma de cuadrados del No Paralelismo**

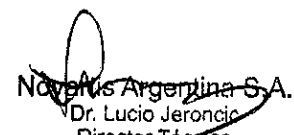
Antígeno	Rango de diluciones	Suma de cuadrados de la No Linealidad (Modelo completo)	Suma de cuadrados del No Paralelismo (Modelo completo)
287-953	3-5	$\leq 77,5$	$\leq 22,5$
	4-6	$\leq 54,9$	$\leq 43,9$
936-741	3-5	$\leq 16,7$	$\leq 9,0$
	4-6	$\leq 34,0$	$\leq 30,3$
961c	3-5	$\leq 64,2$	$\leq 17,3$
	4-6	$\leq 47,4$	$\leq 39,1$
OMV	3-5	$\leq 18,4$	$\leq 13,5$
	4-6	$\leq 18,8$	$\leq 12,8$

Los criterios de validez para el paralelismo y la linealidad se cumplen cuando la suma de los cuadrados de la no linealidad y la suma de cuadrados del no paralelismo son menores o igual que el percentilo 99 calculado para la medida correspondiente, el antígeno y el rango de diluciones. Si el criterio no se cumple entonces el ensayo no es válido con ese intervalo de diluciones.

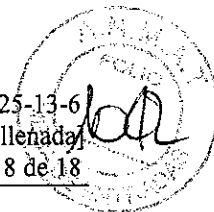
También se ha introducido un criterio de idoneidad del sistema adicional para el estándar de referencia utilizando el mismo enfoque.

El percentilo 99 se calcula para cada antígeno y cada rango de diluciones para establecer los márgenes de equivalencia para evaluar la idoneidad del sistema (Tabla 9).

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

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



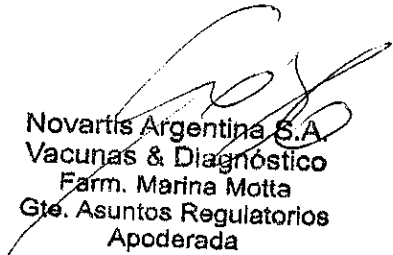


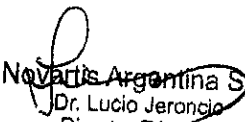
**Tabla 9 Criterios para la adecuación del sistema de referencia mediante el uso de la suma de cuadrados de la no linealidad del modelo**

Antígeno	Rango de diluciones	Suma de cuadrados de la no linealidad (Referencia sola)
287-953	3-5	$\leq 56,6$
	4-6	$\leq 40,1$
936-741	3-5	$\leq 11,9$
	4-6	$\leq 24,2$
961c	3-5	$\leq 45,5$
	4-6	$\leq 34,3$
OMV	3-5	$\leq 13,1$
	4-6	$\leq 13,8$

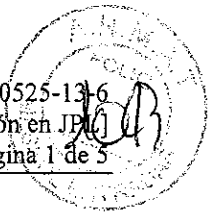
El criterio de validez para linealidad para la adecuación del sistema se cumple cuando durante la prueba de rutina de la suma de cuadrados de no linealidad es menor o igual que el percentilo 99 calculado para el intervalo de antígeno y las diluciones correspondientes. Si el criterio no se cumple ese rango de diluciones debe desecharse para los ensayos que incluyeron esa referencia.

Los márgenes de equivalencia para una medida de la linealidad y paralelismo se utilizan en las pruebas de rutina para establecer la conformidad con los supuestos del modelo. El valor observado para el ensayo de la medida elegida de linealidad/paralelismo tiene que caer dentro de los márgenes definidos. Si el criterio no se cumple la prueba no es válida.

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

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



**Pregunta 3**

*Material de referencia para la determinación de Inmunogenicidad en el producto terminado por ELISA: falta informe del estudio de calificación del lote 112801 frente al lote 101601 (certificado en estudios clínicos).*

**Respuesta de Novartis**

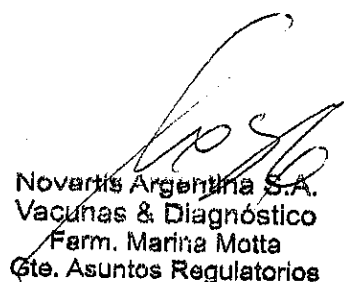
Los detalles del estándar de referencia utilizado para el ensayo de inmunogenicidad del producto se proporcionan a continuación. Los informes de calificación de los estándares de referencia anteriores y actuales (Lotes 112801 y 126901, respectivamente) se proporcionan como Anexos 03-01 y 03-02 a esta respuesta.

**1.0 Estándares de referencia para la inmunogenicidad del producto por ensayo CD1-MDRP**

El lote utilizado como vacuna de referencia en el ensayo CD1-MDRP de inmunogenicidad del producto es un lote de 4CMenB (Bexsero®) calificado de acuerdo a un protocolo definido. El protocolo de calificación incluye una comparación con el lote de estándar de referencia anterior.

El lote de estándar de referencia 112801 reemplazó al Lote 101601 y fue calificado como un estándar de referencia frente al Lote 101601 durante la validación del ensayo CD1-MDRP. El lote 112801 fue clasificado clínicamente en el estudio clínico V72P12E2.

El estándar de referencia actual (Lote 126901) ha sido calificado frente al Lote 112801. De acuerdo con el protocolo actual, la calificación de un lote de referencia nuevo se realiza utilizando al menos 6 valores válidos de Potencia Relativa (PR) (comenzando con 12 esquemas de inmunización). Los valores de PR se calculan considerando al nuevo lote a ser calificado como muestra de prueba y al lote de estándar de referencia anterior como vacuna de referencia. La PR asignada al nuevo lote de referencia se calcula como la PR combinada de todos los valores de PR válidos. Se eligió un número mínimo de 6 valores de PR válidos para incluir en este cálculo para garantizar una precisión de la potencia asignada que se estimara aceptable. La precisión se expresa como el intervalo de confianza del 95 % (IC del 95%) de la PR. La PR asignada se utiliza luego como un factor de conversión para las pruebas de rutina.

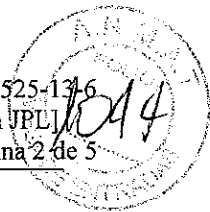


Novartis Argentina S.A.  
Vacunas & Diagnóstico  
Farm. Marina Motta  
Cte. Asuntos Regulatorios  
Apoderada



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





## 2.0 Estándares de referencia anteriores

El lote estándar de referencia 101601 fue calificado clínicamente en el estudio V72\_41. La información general sobre el Lote 101601 se provee en la Tabla 1.

**Tabla 1 Descripción del lote de estándar de referencia 101601 anterior para el ensayo CD-1 MDRP**

Descripción:	Lote de producto
Número de lote:	101601
Fecha de fabricación:	Junio de 2010
Uso del lote:	Calificado clínicamente en el Estudio V72_41 (LSLV: Diciembre del 2011)
Condiciones de conservación	2-8°C
Vida útil o período de reevaluación	28 de Febrero de 2013

LSLV: Última Visita del Último Sujeto

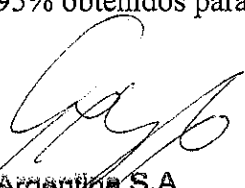
El lote de estándar de referencia 112801 reemplazó al Lote 101601 y fue calificado como estándar de referencia frente al Lote 101601 durante la validación del ensayo CD1-MDRP. El Lote 112801 fue calificado clínicamente en el estudio V72P12E2. La información general sobre el Lote 112801 se proporciona en la Tabla 2.

**Tabla 2 Descripción del estándar de referencia 112801 para el ensayo CD-1 MDRP**

Descripción:	Lote de Producto
Número de Lote:	112801
Fecha de fabricación:	Julio de 2011
Uso del lote:	Calificado clínicamente en el Estudio V72P12E2 (LSLV: Julio de 2013)
Condiciones de conservación	2-8°C
Vida útil o período de reevaluación	30 de Junio de 2014

LSLV: Última Visita del Último Sujeto

Se calcularon los valores de Potencia Relativa (PR) para todos los antígenos y sus correspondientes Intervalos de Confianza del 95% (IC del 95%) para el Lote 112801 mediante la comparación con el Lote previamente calificado clínicamente 101601, para el cual la potencia asignada se asumió como igual a 1,0. Los valores de PR y los IC del 95% se calcularon utilizando el modelo logístico de cuatro parámetros, considerando sólo el total de los resultados válidos del ensayo en este cálculo. Los valores de PR y sus correspondientes Intervalos de Confianza del 95% obtenidos para todos los antígenos se informan en la Tabla 3.

  
 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 3 Valores de Potencia Relativa e Intervalos de Confianza del 95% del Lote 112801**

Lote	Antígeno	Potencia Relativa (media)	LCL 95%	UCL 95%
112801	rp287-953	0,9	0,7	1,2
	rp936-741	1,1	0,9	1,3
	rp961c	1,2	1,0	1,4
	OMV	0,8	0,7	1,0

LCL: Límite de Confianza Inferior; UCL Límite de Confianza Superior.

Debido a la variabilidad *in-vivo* del método de CD1-MDRP y a la cantidad limitada de datos disponibles a la fecha, el uso de un valor exacto de PR como factor de conversión para cada antígeno (que puede llevar a la introducción de sesgos en los ensayos) se consideró no conveniente y se decidió asignar una potencia relativa al Lote 112801 en base al intervalo de confianza. Como se informó en la Tabla 3, el IC del 95% combinado calculado para todos los antígenos incluyó el valor de 1,0. Dado que no se pudieron declarar diferencias significativas entre los dos lotes, el Lote 112801 se consideró comparable con el estándar de referencia previo, el Lote 101601. Por lo tanto se asignó un valor de Potencia Relativa igual a 1,0 para cada antígeno del Lote 112801 como el estándar de referencia para el ensayo CD1-MDRP. Luego de la introducción del modelo matemático PLAS (que es el método actualmente aplicado para el ensayo de inmunogenicidad por ELISA, como ya se ha descrito en la información presentada al inicio del expte.) la variabilidad del método es más baja y se establece un criterio relativo a la precisión de la estimación basada en el intervalo de confianza en el protocolo de calificación actual para garantizar que se utilice un número suficiente de cantidad de datos, como se detalla más adelante.

### 3 Calificación de estándares de referencia nuevos para la inmunización de ratones CD1-MDRP

La calificación de estándares de referencia nuevos a utilizar en la inmunización de ratones CD1-MDRP se lleva a cabo de acuerdo con el protocolo descrito a continuación y se aplica para cada nuevo lote seleccionado para su uso como Estándar de Referencia.

El estándar de referencia actual (Lote 126901) ha sido calificado contra el Lote 112801. Información general sobre el Lote 4CMenB126901 se provee en la Tabla 4.

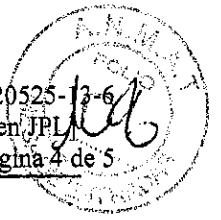
**Tabla 4 Descripción del Estándar de Referencia 126901 para el Ensayo CD-1 MDRP**

Descripción:	Lote de Producto
Número de Lote:	126901
Fecha de fabricación:	Diciembre de 2012
Uso del lote:	Interno - pruebas de liberación de lotes comerciales
Condiciones de conservación	2-8°C
Vida útil o periodo de reevaluación	Noviembre de 2015

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

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






Los valores medios de Potencia Relativa (PR) para todos los antígenos y los intervalos de confianza del 95% (IC del 95%) correspondientes para el Lote 126901 se obtuvieron siguiendo el protocolo de calificación detallado más adelante. Se realizaron 12 inmunizaciones y los 12 valores de Potencia Relativa (PR) se calcularon utilizando el método PLAS, considerando el nuevo lote de referencia 126901 como vacuna de muestra y el lote de referencia previo (112801) como vacuna de referencia. La potencia a ser asignada al nuevo lote de referencia se calculó como el promedio ponderado o semi-ponderado de todos los valores utilizables fuera de los 12 previamente calculados dependiendo de la homogeneidad de los resultados.

La potencia asignada para cada antígeno, el Límite de Confianza Inferior y Superior y los Intervalos de Confianza relativos del 95% respecto a la PR se resumen en la Tabla 5 a continuación. Para cada antígeno se alcanzó la precisión deseada (en el rango de 69-146% de la PR) y no se requirieron más inmunizaciones. Las potencias asignadas se utilizarán como un factor de conversión para futuras pruebas MDRP en las cuales el Lote 126901 servirá como vacuna estándar de referencia.

**Tabla 5 Potencia asignada, LCL y UCL, y LCL y UCL del 95% del Lote 126901**

Antígeno	LCL*	Potencia asignada*	UCL*	LCL 95% respecto a la PR	UCL 95% respecto a la PR
rp287-953	0,8	1,0	1,1	84	119
rp936-741	0,9	1,2	1,6	75	133
rp961c	0,9	1,1	1,2	87	115
OMV	1,0	1,1	1,3	87	115

LCL: Límite de Confianza Inferior; UCL: Límite de Confianza Superior; \* los valores en la tabla se redondean utilizando un dígito decimal en línea con los típicos resultados reportables. El factor de conversión será utilizado con cuatro dígitos decimales.

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

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



Protocolo de calificación y Criterio de aceptación

La calificación de un lote de referencia nuevo se hace utilizando al menos 6 valores válidos de Potencia Relativa (comenzando con 12 esquemas de inmunización como se detalla más adelante) utilizando el Análisis de Líneas Paralelas con Rango de Desplazamiento (PLAS).

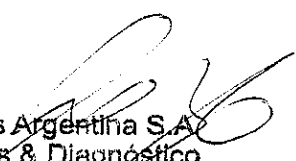
Los valores de PR se calculan teniendo en cuenta el lote nuevo a calificar como muestra de prueba y el lote de referencia estándar previo como vacuna de referencia.

La PR asignada al nuevo lote de referencia se calcula con la PR combinada de todos los valores válidos de PR. El número mínimo de valores válidos de PR a incluir en este cálculo se eligió para garantizar una precisión de la potencia asignada considerada como aceptable. La precisión se expresa como el Intervalo de Confianza del 95 % (IC del 95%) de la PR. La PR asignada se utiliza luego como un factor de conversión para las pruebas de rutina.

A continuación se describe la estrategia de calificación:

- 1) Se realizan 12 esquemas de inmunización
- 2) para cada antígeno, en caso de que el número de resultados válidos de PR que provengan de los 12 esquemas de inmunización sea menor que 6, se programan más esquemas de inmunización. Se selecciona el número de reevaluaciones a realizar con el fin de alcanzar un número válido de PR al menos igual a 6. Si, para cada antígeno, el número de resultados válidos de PR es  $\geq 6$ , no se realizan reevaluaciones y los análisis avanzan al paso siguiente.
- 3) Se aplica la prueba de Dixon para la identificación de valores atípicos. En caso de encontrar valores atípicos, se realiza una investigación interna para identificar las causas fundamentales y para evaluar si el valor de PR, identificado como atípico, puede usarse en el análisis estadístico para la calificación de un nuevo lote de referencia. Si, al continuar la investigación, hay menos de 6 valores de PR disponibles, deben realizarse más esquemas de inmunización para reemplazar los valores atípicos con el objetivo de alcanzar al menos un número de valores de PR igual a 6.
- 4) Si están disponibles al menos 6 valores válidos de PR, se calcula la PR combinada (que se calcula utilizando todos los resultados válidos de PR disponibles) y sus IC del 95% para cada antígeno. La PR combinada y sus IC del 95 % se calculan utilizando ya sea un promedio ponderado o bien semi-ponderado, dependiendo de la homogeneidad de los resultados (para una descripción detallada de los cálculos estadísticos, consultar a Ph. Eur. 5.3, Capítulo 6).
- 5) Si para todos los antígenos, el IC del 95 % parece estar dentro de los límites de PR de 69-146 %, se asigna un factor de conversión. Si para uno o más antígenos, el IC del 95 % parece estar fuera del 69 -146 % de la PR, deben realizarse más esquemas de inmunización sólo para los antígenos que no cumplen los criterios antes mencionados. El número de inmunizaciones adicionales a realizar debe elegirse en base a la precisión alcanzada con la PR que surge de los 12 esquemas de inmunización todavía disponibles. El intervalo de confianza (69-146%) se calculó teniendo en cuenta la variabilidad máxima del método (que se supone equivalente a la estimada durante la validación del método PLAS) y el mínimo número de repeticiones utilizado para calcular el factor de conversión (6).

El valor medio de la potencia relativa, obtenido para el nuevo estándar de referencia durante la calificación, utilizando el procedimiento detallado anteriormente, será utilizado como factor de conversión para el ensayo de rutina de liberación MDRP de los lotes de vacuna. Actualmente, el factor de conversión es adoptado como la potencia supuesta del lote de referencia, multiplicando la relación de la potencia obtenida en el ensayo de inmunogenicidad MDRP por la potencia supuesta de la referencia.

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

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

