

Tabla 50 Resultados de Validación para Pureza por SE-HPLC (Valoración de Novartis)

Parámetros Probados	Descripción de la Prueba de Validación	Criterios de Aceptación de la Validación	Resultados de la Validación
Repetibilidad	Un lote de Granel Concentrado se probó por duplicado por un único operador. Se llevaron a cabo seis operaciones de prueba en una sesión analítica única.	CV % calculado para pureza (área %) de un único lote de granel de proteína recombinante de fusión fHbp probado por duplicado, en seis operaciones de valoración, en la misma sesión analítica, debe ser \leq 2%.	CV % para el Lote RS15-05-01 Lote de granel de proteína recombinante de fusión fHbp = 0,1 %.
Reproducibilidad	Tres lotes de Granel Concentrado se analizaron en días diferentes por dos operadores de un grupo (tres veces cada uno), y un operador de un segundo grupo (seis veces).	CV % calculado para pureza (área %) para los 12 valores para 3 lotes de granel de proteína recombinante de fusión fHbp debe ser \leq 8 %. Las pruebas se llevaron a cabo por dos técnicos de TD (3 pruebas cada uno) y por un técnico de QC (6 pruebas).	<ul style="list-style-type: none"> • CV% para el Lote TRFASE102 = 0,8 • CV % para el Lote RS15-03-01= 1,4 • CV % para el Lote RS15-05-01= 0,8
Especificidad	Una matriz sintética se preparó por triplicado, compuesta por sustancias probablemente interferentes del proceso de elaboración del principio activo, en los peores casos de concentraciones.	La muestra de la matriz no debe mostrar un pico con un tiempo de retención correspondiente al antígeno de proteína recombinante de fusión fHbp.	<ul style="list-style-type: none"> • El pico de proteína recombinante de fusión fHbp correspondió al antígeno de proteína recombinante de fusión fHbp • No se detectaron picos para la muestra blanco. • No se detectaron picos en el tiempo de retención del antígeno de proteína recombinante de fusión fHbp para la muestra de la matriz.

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

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



Resistencia	Las muestras por duplicado de un lote se analizaron 2 y 4 horas después del descongelamiento.	CV % calculado para pureza (área %) para seis resultados de las tres alícuotas de muestra, operadas por duplicado, de RS15-05-01, a T0, T2, y T4 horas luego del descongelamiento, debe ser ≤ 8 %.	<ul style="list-style-type: none"> CV % para el Lote RS15-05-01= 0,2
Linealidad	Se prepararon diluciones por duplicado en cinco concentraciones y se operaron en tres sesiones analíticas diferentes.	$r^2 \geq 0,99$	$r^2 = 0,9973, 0,9992, \text{ y } 0,9999$, para las Sesiones, 1, 2, y 3, respectivamente.
Exactitud	Los resultados del Estudio de Linealidad se utilizaron para determinar la Exactitud.	La recuperación porcentual para cada carga (a 50 %, 75 %, y 100 %), en cada sesión analítica, cayó dentro de 85-115%, y la intersección "y" para cada curva estaba dentro de $\pm 10\%$ del nivel de carga teórica del 100 %.	Recuperación porcentual entre 97,9 % y 104,0 %; las intersecciones de "y" en una carga teórica del 100% fueron 0,88%, 1,11%, y 1,21%, para las Sesiones 1, 2, y 3, respectivamente.
Límite de Cuantificación (LOQ)	Se prepararon cinco diluciones de estándar y se inyectaron por duplicado.	$S/N \geq 10$; RSD porcentual para las diez repeticiones ≤ 20 %.	El valor de S/N promedio fue 11; RSD % = 9,7%; LOQ = 1%

Qc: Control de Calidad; rp: Proteína Recombinante; RSD: Desviación Estándar Relativa; TD: Desarrollo Técnico; CV%: Coeficiente porcentual de variación

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

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




Tabla 51 Calificación Cruzada de los Métodos SE-HPLC de Sandoz y Novartis

Parámetros Probados	Descripción de la Prueba de Validación	Criterios de Aceptación de la Validación	Resultados de la Validación
Reproducibilidad	<p>En Novartis, se llevaron a cabo seis análisis de tres lotes de Granel Concentrado, por dos operadores (tres análisis por operador), por el uso de dos instrumentos y columnas diferentes, en tres días diferentes.</p> <p>En Sandoz, la valoración se llevó a cabo seis veces por un único operador en una sesión analítica única.</p> <p>Todas las inyecciones se llevaron a cabo por duplicado.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • La identidad se confirma como proteína recombinante de fusión fHbp. • CV % de la muestra de granel concentradas de proteína recombinante de fusión fHbp debe ser $\leq 8\%$ para las 12 repeticiones (resultados combinados de ambos laboratorios) para los tres lotes probados, confirmando la pureza. • La prueba t de Student para los resultados de ambos laboratorios debe ser $\leq 1\%$ (es decir, $p > 0,01$) 	<ul style="list-style-type: none"> • La identidad se confirma como proteína recombinante de fusión fHbp. • CV% fue 0% para el lote A009330, 0,5% para el lote A009131, y 0,3% para el lote A009132. • p = no evaluable para el Lote A009330; p = 0,0493 para el lote A009131, y p = 0,3409 para el lote A009132.

CV%: Coeficiente porcentual de variación



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





5) CONSISTENCIA DE LA PRODUCCION

Semilla Maestra

Tabla 52 Análisis de Lote para la Semilla Maestra S815P9MS01

Prueba	Método de Análisis	Especificación	Resultado
Identidad	Métodos bioquímicos	Positiva	Positivo
Identidad de Antígeno	Western Blot	Positiva	Positivo
Vitalidad (Recuento de colonias)	Métodos microbiológicos (Placas de agar)	$\geq 10^8$ CFU/ml	$1,0 \times 10^9$ CFU/ml
Pureza	Métodos microbiológicos (Placas de agar)	Ausencia de contaminantes	Ausencia de contaminantes
Estabilidad segregacional del plásmido ¹	Métodos microbiológicos (Placas de agar)	$\leq 10\%$ Km -	1% Km -
Estabilidad estructural del plásmido	Métodos microbiológicos (Placas de agar)/ Electroforesis en gel	Cumple con el estándar (Perfil de fragmento de ADN)	Cumple con el estándar
Secuencia del plásmido	Secuenciación de ADN	Cumple con el estándar (Sin mutación de nucleótidos)	Cumple con el estándar
Número de copias del plásmido	Métodos microbiológicos (Placas de agar)/ Métodos bioquímicos	Resultados del registro (número por bacteria)	16,0 por bacteria
Bacteriófagos	Métodos microbiológicos (Placas de agar)	Cumple con el estándar (Ausencia de placas líticas)	Cumple con el estándar

CFU: Unidad de Formación de Colonias; Km - : colonias sin plásmido que confiera resistencia a kanamicina

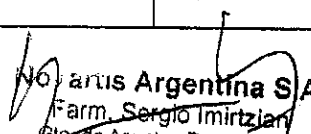
¹ La estabilidad segregacional del plásmido también se conoce como retención del plásmido

Semilla de trabajo

Tabla 53 Análisis de Lote para la Semilla de Trabajo S815P10WS01

Prueba	Método de Análisis	Especificación	Resultado
Identidad	Métodos bioquímicos	Positiva	Positivo
Identidad de Antígeno	Western Blot	Positiva	Positivo
Vitalidad (Recuento de colonias)	Métodos microbiológicos (Placas de agar)	$\geq 10^8$ CFU/ml	$4,5 \times 10^8$ CFU/ml


 Novartis Argentina
 Dr. Lucio Jeroncic
 Director Técnico
 MN 14840


 Novartis Argentina S.A.
 Farm. Sergio Imirtzian
 Gl. de Asuntos Regulatorios
 Codirector Técnico - M.N. 17521
 Apoderado

Pureza	Métodos microbiológicos (Placas de agar)	Ausencia de contaminantes	Ausencia de contaminantes
Número de copia del plásmido	Métodos microbiológicos (Placas de agar)/ Métodos bioquímicos	Resultados del registro (número por bacteria)	10,0 por bacteria

CFU: Unidad de Formación de Colonias

Granel concentrado

La información de elaboración general para tres lotes del granel concentrado de la proteína recombinante de fusión fHbp, utilizados en los ensayos clínicos de la Fase III y como lotes de consistencia de procesos, se proporciona en la Tabla 54 a continuación. Las pruebas, especificaciones, y resultados de liberación para los tres lotes del Granel Concentrado a escala completa se proporcionan en la Tabla 56.


Tabla 54 Información de Elaboración General de Fase III/Consistencia para los Lotes de Granel Concentrado de proteína recombinante de fusión fHbp

Purificación/Lotes de Granel Concentrado		
Lote No.	Fecha de Elaboración	Tamaño del Lote (Litros)
36438806	31-Mar-2007	83,6
36438807	04-Abr-2007	59,9
36438808	08-Abr-2007	62,4

La información de elaboración general para dos lotes recientes del granel concentrado de la proteína recombinante de fusión fHbp se proporciona en la Tabla 55 más abajo. Las pruebas, especificaciones y los resultados de la liberación para los dos lotes del granel concentrado a escala completa se proporcionan en la Tabla 57.

Tabla 55 Información de Elaboración General para los Lotes de Granel Concentrado de la proteína recombinante de fusión fHbp elaborados en 2012

Purificación/Lotes del Granel Concentrado		
Lote No.	Fecha de Elaboración	Tamaño del Lote (Litros)
B169253	26-Nov-2012	54,6
B169254	30-Nov-2012	54,4


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



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

Tabla 56 Pruebas, Especificaciones, y Resultados para los Lotes 36438806, 36438807 y 36438808 de Granel Concentrado de proteína recombinante de fusión fHbp

Prueba	Método de Análisis	Especificación	Lote 36438806	Lote 36438807	Lote 36438808
Granel Concentrado					
Pureza	SDS-PAGE	≥ 88%	95%	96%	96%
Pureza ¹	SE-HPLC	≥ 90%	96%	95%	96%
Contenido de Proteínas ²	Valoración de Proteínas Totales BCA	900-2700 µg/ml	1055	1289	1457
Identidad	Western Blot	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
HCP ³	Western Blot	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
HCP/Proteína ⁴	ELISA/cálculo	≤ 200 ppm	55 ppm	59 ppm	50 ppm
Osmolaridad ⁴	Osmometría, punto de congelamiento	240-360 mOsm/kg	298 mOsm/kg	307 mOsm/kg	319 mOsm/kg
Endotoxina/Proteína	Prueba cromogénica cinética/cálculo	≤ 0,16 IU/µg	< 0,004 IU/µg	< 0,003 IU/µg	< 0,003 IU/µg
Biocarga	Filtración de membrana	≤ 5 CFU/ml ⁵	0 CFU/ml	0 CFU/ml	0 CFU/ml
pH	Potenciometría	6,5-7,5	7,0	6,9	7,0
Conductividad	Potenciometría	15.000-17.300 µS/cm	16.730 µS/cm	16.900 µS/cm	17.180 µS/cm
ADN/Proteína ^{3,4}	Sistema de Umbral	≤ 10 pg/µg	< 1 pg/µg	< 1 pg/µg	1 pg/µg
IPTG ^{3,4}	RP-HPLC	≤ 10 ppm	< 10 ppm	< 10 ppm	< 10 ppm
PPG ^{3,4}	HPTLC	≤ 10 ppm	< 10 ppm	< 10 ppm	< 10 ppm

BCA: Ácido Bicinonínico; CFU: Unidades de Formación de Colonias; ELISA: Valoración Inmunoabsorbente Vinculada con Enzimas; HCP: Proteína de las Células Huésped; HP-TLC: Cromatografía de alto rendimiento en capa fina; IU: Unidades Internacionales; mOsm: Milli-Osmoles; µS: Micro-Siemens; ppm: partes por millón; RP-HPLC: Cromatografía líquida de alto rendimiento en fase invertida; SDS-PAGE: Electroforesis en gel de dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida; SE-HPLC: Cromatografía líquida de alto rendimiento con exclusión de tamaño

¹ Se ruega notar que, a pedido de las Autoridades de Salud, el término "integridad" se ha reemplazado con "Pureza" para SE-HPLC, en conformidad con las recomendaciones ICHQ6B.

² La prueba de Concentración de Proteínas se llevó a cabo por Novartis por el uso de la valoración de tubo de ensayo. A partir de entonces, el método se ha transferido a Sandoz para prueba de liberación del Granel Concentrado.

³ Con base en los Resultados de Validación de la Depuración, estas pruebas no se llevarán a cabo sobre lotes futuros.

⁴ La prueba se lleva a cabo por cuenta de Novartis Vacunas & Diagnósticos.

⁵ La especificación para Biocarga de ≤ 5 CFU/ml estaba en su lugar al momento de llevarse a cabo la prueba. A partir de entonces, la especificación se ha reducido a ≤ 15 CFU/100 ml para lotes futuros, con base en análisis de datos históricos.

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

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



