

Pureza ¹ (SE-HPLC)	≥ 90%	R	TBD	TBD	TBD	TBD	TBD	TBD
Proteína BCA	900-2700 µg/ml	R	TBD	TBD	TBD	TBD	TBD	TBD
pH	6,5-7,5	TBD	TBD	TBD	TBD	TBD	TBD	TBD
Contenido de endotoxina	≤ 0,16 IU/µg de proteína	TBD	TBD	TBD	TBD	TBD	TBD	TBD
Biocarga	≤ 1 CFU/10 ml ²	TBD	TBD	TBD	TBD	TBD	TBD	TBD

BCA: Ácido Bicinconínico; R: Los resultados informados son de liberación; SDS-PAGE: Electroforesis en gel de dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida; SE-HPLC: Cromatografía líquida de alto rendimiento con exclusión de tamaño; TBD: A determinar

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

²La especificación para Biocarga de ≤ 1,5 CFU/10 ml será reducida a ≤ 1 CFU/10 ml y se aplicará comenzando desde la campaña 2013.

Resultados

Se presentan a continuación las tablas que contienen los datos de estabilidad.



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



Novartis Argentina S.A.
Fanni Sergio Imirtzjan
Eje. de Asuntos Regulatorios
Director Técnico - M.N. 11521
Apoderado

Tabla 65 Resultados del Estudio de Estabilidad a Largo Plazo para los Lotes 36438806, 36438807, y 36438808 del Granel Concentrado de la proteína recombinante de fusión fHbp, cuando se almacenan a $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$

Prueba de Estabilidad	Especificación	Lote N°	Tiempo de almacenamiento (en meses)									
			Tiempo Cero (T0)	Inicio del Estudio	3	6	12	18	24 ²	36	48	
Pureza (SDS-PAGE)	≥ 88%	36438806	95	95	99	99	97	99	98	96	97	
		36438807	96	95	98	99	98	99	97	97		
		36438808	96	96	98	99	98	99	97	98		
Pureza ¹ (SE-HPLC)	≥ 90%	36438806	96	100	100	100	100	99	96	98		
		36438807	95	100	100	98	100	99	98	98		
Contenido de Proteína BCA	900-2700 µg/ml	36438806	1055	1079	NR	1215	1143	NR	1027	1065	1219	
		36438807	1289	1282	NR	1372	1365	NR	1293	1377	1406	
pH	6,5-7,5	36438806	7,0	6,9	NR	7,1	7,0	NR	7,0	7,0	7,0	
		36438807	6,9	6,9	NR	7,0	6,9	NR	6,9	7,0	7,0	
		36438808	7,0	6,8	NR	7,0	7,0	NR	7,0	7,0	7,0	

Las muestras de tiempo cero se probaron al momento de la liberación. Se probaron muestras al inicio del estudio en la fecha de comienzo de estabilidad del 15-Oct-2007 para los tres lotes, cuando las muestras tenían 4-5 meses de edad. Las muestras se almacenaron a $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ hasta el comienzo del estudio de estabilidad cuando se transfirieron a las condiciones de almacenamiento de estabilidad adecuadas.

BCA: Ácido Bicarbinómico; NR = No requerido, no se requieren pruebas en este punto de tiempo; SDS-PAGE: Electroforesis en gel de dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida; SE-HPLC: Cromatografía líquida de alto rendimiento con exclusión de tamaño; TBO = A determinar; la prueba se programa para un punto de tiempo futuro.

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 de ICHQ6B.

² Ocurrió una falla en el congelador entre los intervalos de prueba de 18 y meses. Todas las muestras almacenadas se transfirieron inmediatamente a otro congelador. No hubo impacto en el estudio dado que las muestras se mantuvieron congeladas y los resultados observados en el intervalo de tiempo de 24 meses fueron satisfactorios.

Novartis Argentina
Dr. Lucio Jeroncio
Director Técnico
MN 14840

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

Tabla 66 Resultados del Estudio de Estabilidad a Largo Plazo para los Lotes 36438806, 36438807, y 36438808 del Granel Concentrado de la proteína recombinante de fusión fHbp, cuando se almacenan a $-70^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$

Prueba de Estabilidad	Especificación	Lote Nº	Tiempo de almacenamiento (en meses)											
			Tiempo Cero (T0)	Inicio del Estudio	3	6	12	18	24	36	48			
Pureza (SDS-PAGE)	$\geq 88\%$	36438806	95	95	98	99	98	98	99	98	99	98	97	98
		36438807	96	95	98	99	98	99	99	99	99	97	97	98
		36438808	96	96	91	98	98	99	98	99	98	98	98	98
Pureza ¹ (SEC-HPLC)	$\geq 90\%$	36438806	96	100	100	100	100	100	99	98	99	96	96	95
		36438807	95	100	100	100	100	99	97	99	97	96	95	95
		36438808	96	100	100	99	100	98	98	97	97	96	96	95
Contenido de Proteína BCA	900-2700 $\mu\text{g/ml}$	36438806	1055	1079	NR	1081	1079	1079	NR	1030	NR	1043 ²	1134	
		36438807	1289	1282	NR	1245	1353	1281	NR	1281	NR	1367	1429	
		36438808	1457	1464	NR	1230	1530	1448	NR	1448	NR	1511	1607	
pH	6,5-7,5	36438806	7,0	6,9	NR	7,1	7,0	7,0	NR	7,0	NR	7,0	7,0	
		36438807	6,9	6,9	NR	7,0	6,9	6,9	NR	6,9	NR	7,0	6,9	
		36438808	7,0	6,8	NR	7,0	7,0	7,0	NR	7,0	NR	7,0	7,0	

Las muestras de tiempo cero se probaron al momento de la liberación. Se probaron muestras al inicio del estudio en la fecha de comienzo de estabilidad del 15-Oct-2007 para los tres lotes, cuando las muestras tenían 4-5 meses de edad. Las muestras se almacenaron a $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ hasta el comienzo del estudio de estabilidad cuando se transfirieron a las condiciones de almacenamiento de estabilidad adecuadas.

BCA: Ácido Bicconinico; NR = No requerido; no se requieren pruebas en este punto de tiempo; IP: En Proceso; SDS-PAGE: Electroforesis en gel de dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida; SE-HPLC: Cromatografía líquida de alto rendimiento con exclusión de tamaño; TBD = A determinar; la prueba se programa para un punto de tiempo futuro.

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 de ICH Q6B.

² Se observó un resultado fuera de especificación (FDE) a los 36 meses. Se realizó una segunda prueba y el resultado fuera de especificación no se confirmó como el resultado que cumple la especificación. El resultado FDE no tiene impacto en la calidad o estabilidad del lote.

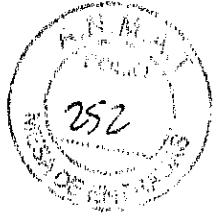



Tabla 67 Resultados del Estudio de Estabilidad Acelerada para los Lotes 36438806, 36438807, y 36438808 del Granel Concentrado de la proteína recombinante de fusión fHbp, cuando se almacenan a 5°C ± 3°C

Prueba de Estabilidad	Especificación	Lote N°	Tiempo de almacenamiento (en meses)				
			Tiempo Cero (T0)	Inicio del Estudio	0,5	1	3
Pureza (SDS-PAGE)	≥ 88%	36438806	95	95	96	97	97
		36438807	96	95	95	97	90
		36438808	96	96	96	97	91
Pureza ¹ (SEC-HPLC)	≥ 90%	36438806	96	100	100	100	100
		36438807	95	100	100	100	100
		36438808	96	100	100	100	100
Contenido de Proteína BCA	900-2700 µg/ml						
pH	6,5-7,5	36438806	1055	1079	1024	1035	1037
		36438807	1289	1282	1258	1268	1326
		36438808	1457	1464	1209	1329	1546
		36438806	7,0	6,9	7,0	7,0	7,0
		36438807	6,9	6,9	7,0	6,9	6,9
		36438808	7,0	6,8	6,8	7,0	7,0

Las muestras de tiempo cero se probaron al momento de la liberación. Se probaron muestras al inicio del estudio en la fecha de comienzo de estabilidad del 15-Oct-2007 para los tres lotes, cuando las muestras tenían 4-5 meses de edad. Las muestras se almacenaron a -20°C ± 5°C hasta el comienzo del estudio de estabilidad cuando se transfirieron a las condiciones de almacenamiento de estabilidad adecuadas.

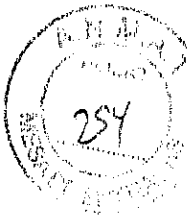
BCA: Ácido Bicinónico; NR = No requerido; no se requieren pruebas en este punto de tiempo; SDS-PAGE: Electroforesis en gel de dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida; SEC-HPLC: Cromatografía con exclusión de tamaño-Cromatografía líquida de alto rendimiento; TBD = A determinar; la prueba se programa para un punto de tiempo futuro.

¹ Se hace 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 de ICHQ6B.


 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



**Conclusión**

Se generaron datos satisfactorios a través de 48 meses cuando se almacena el granel de proteína recombinante de fusión fHbp a $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ y a $-70^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$. Además, el almacenamiento a $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ durante hasta tres meses no impactó en la estabilidad del granel.

Los datos dan sustento a la vida media propuesta de 36 meses cuando se almacena a $\leq -15^{\circ}\text{C}$ (punto de ajuste), protegido de la luz.



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

PRINCIPIO ACTIVO

Proteína Recombinante NadA

1) INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 Caracterización

1.1.2 Elucidación de la Estructura y otras Características


La proteína recombinante NadA (proteína 961c) es un fragmento de Neisseria adhesina A (NadA), una proteína oligomérica de superficie expuesta perteneciente a la familia de Adhesina Oligomérica de Doble Espiral (OCA). La NadA es una molécula de adhesina meningocócica involucrada en la unión a células epiteliales (Capecchi et al., 2005). La proteína deriva de la Cepa 2996 del serogrupo B de Neisseria meningitidis (N. meningitidis). Esta proteína también está identificada en la literatura como Antígeno derivado de Genoma (GNA) 1994 (o NMB994), con base en el enfoque de vacunología inversa que permitió su identificación. El antígeno 961c se expresa vía fermentación bacteriana por métodos estándares de tecnología de ADN recombinante en Escherichia coli (E. coli) por el uso de un sistema de vector plásmido, de acuerdo con lo descrito a continuación.


La secuencia codificadora 961c (que contiene la secuencia líder nativa, y carece del dominio del ancla de la membrana) se amplificó por PCR por el uso de ADN cromosomal de la Cepa 2996 del serogrupo B como una plantilla. El producto se clonó en el Vector de Expresión pET-24b(+). El constructo resultante, 961cL-K, se introdujo posteriormente en la Cepa BL21(DE3) de E. coli, donde la expresión del antígeno 961c se indujo por isopropil- β -D-tiogalactopiranosida (IPTG).

La proteína recombinante NadA se purifica a partir del sobrenadante de E. coli vía una serie de pasos, que incluyen centrifugación, filtración, y purificación a través de una serie de columnas cromatográficas. Los pasos de purificación eliminan la mayoría de las proteínas de células huésped de E. coli y reducen la cantidad de variantes de proteína recombinante NadA. Además, los pasos cromatográficos dan lugar a una reducción en el nivel de endotoxinas. Luego de los pasos de purificación de columna, el material a granel resultante se somete a diafiltración seguido por un paso de filtración de 0,2 μ m. El material a granel concentrado se almacena a $\leq -15^{\circ}\text{C}$ (punto de inicio -20°C).

Propiedades de la Proteína

La secuencia de aminoácidos predicha a partir de la secuencia de nucleótidos conocida para la proteína recombinante NadA da cuenta de una cadena de polipéptidos de 327 aminoácidos con un punto isoeléctrico teórico (pI) de 4,62. El principio activo proteína recombinante NadA tiene un peso molecular teórico (PM) de 34,558 Da, con base en la secuencia de aminoácidos derivada a partir de los cálculos por el servidor de Proteómicas del Sistema de Análisis Experto (Expasy). La masa molecular promedio de 34,6 kDa se confirmó por el análisis de masa ESI-q-Tof.


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

El análisis de masa Molecular Experimental de la proteína recombinante NadA se llevó a cabo por infusión directa en un espectrómetro de masa ESI-q-ToF cuadrupolo de electropulverización, que reveló la presencia de 5 formas relacionadas de PM menor en el perfil de masa experimental, que podría atribuirse a las formas de eliminación del extremo terminal C de la secuencia principal. El análisis de SDS-PAGE bajo condiciones de reducción, utilizado para determinar la pureza e integridad de la proteína recombinante NadA en el granel, ha confirmado la presencia de un polipéptido de peso molecular aparente de 37-40 kDa, con 2 bandas con PM menor pertenecientes a la familia de las 5 formas eliminadas del extremo terminal C observadas por análisis de espectrometría de masas.

La cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa (RP-HPLC) proporcionó una confirmación adicional de un pico principal, correspondiente a la proteína recombinante NadA intacta, acompañada por un pico menos intenso correspondiente a especies con PM menores, que representa las formas eliminadas del extremo terminal C. La presencia y cantidad de las formas eliminadas del extremo terminal C han sido consistentes en todos los lotes producidos de proteína recombinante NadA. La Compañía espera que estas formas sean variantes del ingrediente activo, dado que los resultados preclínicos y clínicos hasta ahora no indicaron ningún impacto negativo sobre la calidad, seguridad, e inmunogenicidad del medicamento formulado con estos antígenos.

Niveles de Estructura de la Proteína

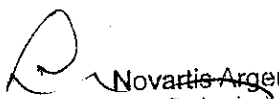
La estructura tridimensional del antígeno de NadA se organiza en tres dominios: un dominio del ancla del extremo terminal C que forma hebras β transmembranales, un dominio de tallo con doble espiral que contiene una cremallera de leucina que está involucrada en la oligomerización, y una región globular del extremo terminal N (Feavers and Pizza, 2009).

Se evaluaron las estructuras primaria, secundarias, terciarias, y cuaternarias del principio activo proteína recombinante NadA. El espectro de UV CD lejano de la proteína recombinante NadA en el granel muestra dobles mínimos (209 y 222 nm) que sugieren que la porción principal de la proteína podría disponerse en una hélice α .

La estructura cuaternaria (agregación de proteínas) se evaluó por Cromatografía con Exclusión de Tamaño acoplada con análisis por Difusión de Luz Láser a Ángulos Múltiples (SEC-MALLS). Los datos dimensionales de SEC-MALLS indican que los lotes de proteína recombinante NadA son consistentes con el valor teórico para una organización estructural trimérica (PM de 94,9 kDa), aunque la desnaturalización térmica causa el desacoplamiento de la proteína a su estructura monomérica. SEC-HPLC confirma la presencia de una forma trimérica, en un pico con un grupo de cola que contiene el material eliminado del extremo terminal C y picos muy pequeños relacionados con material proteína recombinante NadA agregado y monomérico. Este perfil se ha observado en forma consistente en todos los lotes de proteína recombinante NadA probados en ensayos preclínicos y clínicos.

Características Físico-químicas

El principio activo proteína recombinante NadA purificado en solución de tampón es un líquido claro incoloro, esencialmente libre de partículas visibles.


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


Argentina S.A.
Sergio Imirtzian
Asuntos Regulatorios
por Técnico - M.N. 11521
Apoderado

Características Biológicas e Inmunológicas

Los estudios de caracterización biológica e inmunológica se sintetizan en la siguiente tabla.

Tabla 1 Estudios de Caracterización Biológica e Inmunológica

Descripción del Estudio	Referencia
Homología de secuencia observada entre el Antígeno de proteína recombinante NadA y proteínas de superficie expuesta en especies <i>M. catarrhalis</i> y <i>Yersinia</i> .	Comanducci et al., 2002
La proteína recombinante NadA purificada se une y promueve la entrada a las células epiteliales.	Capecchi et al., 2005
Estudio de alelos de NadA de aparición natural.	Comanducci et al., 2004
Producción de anticuerpos inmunoprotectores contra proteína recombinante NadA en ratas infantas; inmunoreactividad con suero de niños infectados con enfermedad meningocócica.	Litt et al., 2004
Producción de anticuerpos bactericidas contra proteína recombinante NadA en sujetos humanos.	Giuliani et al., 2010
La expresión de fase variable modula la intensidad del promotor.	Martin et al., 2003
La NadR lleva a cabo la función de modulación de la expresión en cepas diferentes.	Metruccio et al, 2009

1.1.3 Impurezas

Impurezas relacionadas con el Proceso

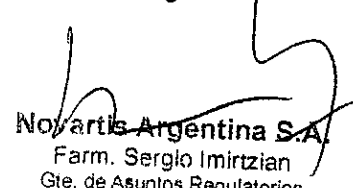
Impurezas relacionadas con el Proceso Endógeno

Las impurezas relacionadas con el proceso endógeno incluyen ADN, proteínas de las células huésped (HCP), y endotoxina. La depuración de las tres impurezas se tomó en cuenta en la validación del proceso, donde el control de impurezas se demostró en pasos intermedios y en el nivel de granel concentrado.

Impurezas relacionadas con el Proceso Exógeno

Las impurezas relacionadas con el proceso exógeno incluyen Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosida (IPTG), polipropilén glicol (PPG), y kanamicina. IPTG y PPG se tomaron en cuenta en la validación de depuración para proteína recombinante NadA. Se llevó a cabo un cálculo del peor escenario de la cantidad de impureza de kanamicina relacionada con el proceso exógeno potencialmente presente en la formulación final y se determinó que era de 0,75 μ g/dosis. En este cálculo se supuso una mayor concentración de cada antígeno que la planeada. Una evaluación toxicológica, llevada a cabo para evaluar el riesgo de la exposición de infantes a kanamicina por vacunación, indicó que no existen problemas de seguridad asociados con 0,75 μ g de kanamicina por dosis. La cantidad esperada de kanamicina en una dosis simple en concentraciones propuestas de antígeno sería de aproximadamente 0,004 μ g.


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


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

2) PROCESO DE PRODUCCIÓN

2.1 Elaborador

Nombre y Domicilio	Responsabilidad
Novartis Vaccines and Diagnostics S.r.l. Bellaria-Rosia 53018 Sovicille Italia (Rosia)	Elaboración, almacenamiento, y pruebas de control de calidad de las Semillas Madre y de Trabajo Pruebas de control de calidad Liberación de lote del granel concentrado de la proteína recombinante NadA
Novartis Vaccines and Diagnostics S.r.l. Via Fiorentina, 1 53100 Siena Italia (Siena)	Almacenamiento (copias) y pruebas control de calidad de las Semillas Maestra y de Trabajo Pruebas de control de calidad
Sandoz GmbH Biochemiestraße 10 A-6250 Kundl Austria (Kundl)	Fermentación, cosechado, y purificación de la proteína recombinante NadA Pruebas de control de calidad

2.2 Descripción del proceso de elaboración y controles del proceso


Proceso de Fermentación

La producción se basa en un sistema de lote de semillas. Se utilizan semillas de trabajo de E. coli 961cL-K (que contienen el plásmido codificante para la proteína recombinante NadA) para preparar un inóculo. Durante el paso de fermentación, se expande el cultivo de E. coli, la proteína recombinante se expresa y secreta en el sobrenadante intracelularmente (luego de la inducción), y se cosecha. Se hace notar que durante la inoculación y las etapas tempranas de expansión del cultivo, se agrega kanamicina a 30 µg/ml. El lote de fermentación se define como el producto de una operación de fermentación simple hasta la cosecha.

Proceso de Aislamiento

Una vez cosechado el caldo, la proteína recombinante se separa (aisla) de las bacterias vía centrifugación y pasos de filtración. Un lote de aislamiento se define como el producto de una operación de aislamiento simple a partir de la cosecha a Diaretentato 1.


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


Novartis Argentina S.A.
Farm. Sergio Imirtzian
Gte. de Asuntos Regulatorios
Codirector Técnico - M.N. 11621
Apoderado

Proceso de Purificación

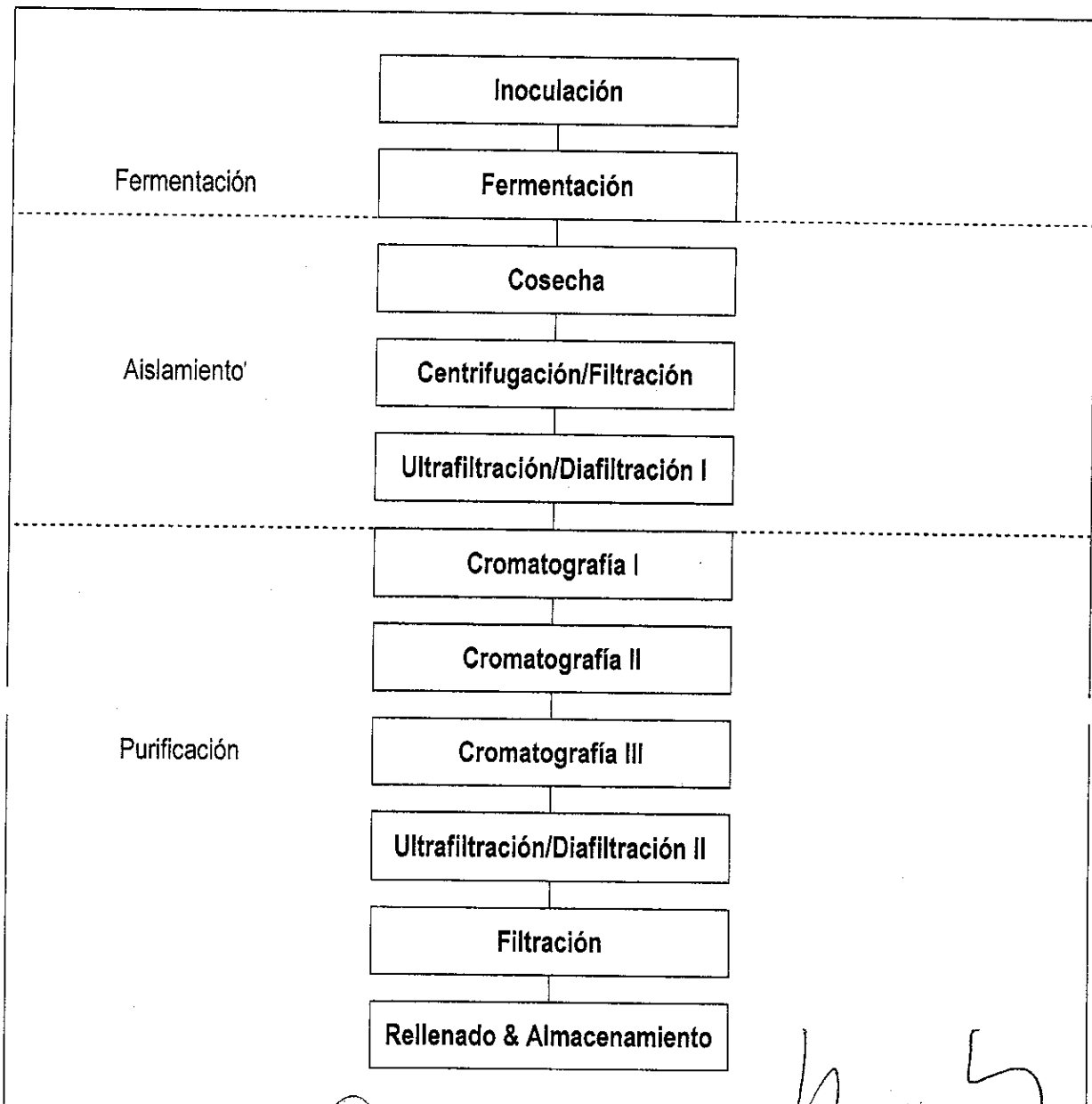
Las últimas series de pasos en la elaboración a granel son los pasos de purificación donde la proteína recombinante se pasa a través de una serie de columnas de cromatografía y se filtra. Un lote de purificación se define como el producto de una operación de purificación simple a partir de Diarenteato 1 al granel concentrado (CB).

Llenado, Almacenamiento y Transporte (Traslado)

El material de granel concentrado de la proteína recombinante NadA se distribuye en botellas PETG de 1 l. El material proteína recombinante NadA se congela y almacena a $\leq -15^{\circ}\text{C}$ como granel concentrado con poca biocarga. El granel concentrado de proteína recombinante NadA se despacha del sitio Kundl, Austria al sitio Rosia, Italia a $\leq -15^{\circ}\text{C}$. Una vez recibida, el granel concentrado se almacena a $\leq -15^{\circ}\text{C}$ en un área de cuarentena a baja temperatura hasta ser liberada por Aseguramiento de la Calidad antes de su uso en una formulación de vacuna.

A continuación, se proporciona un flujograma de la producción del granel concentrado de proteína recombinante NadA en la Figura 1.

Figura 1 Proceso de Elaboración para la proteína recombinante NadA



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

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

