

2.6 Validación y evaluación de los procesos

Parámetros de Proceso y Controles durante el Proceso

Se han definido parámetros operacionales para controlar el desempeño del proceso, y pueden categorizarse en dos grupos – críticos y no críticos. Dentro de cada categoría, el monitoreo del proceso de elaboración también se divide en parámetros de proceso y controles durante el proceso, de acuerdo con lo descrito a continuación.

Los Parámetros Críticos del Proceso, o CPP, se definen como procesos variables para los que una desviación del rango predeterminado tiene un potencial significativo para causar una falla de un aspecto de calidad crítico (CQA). Las imposibilidades para cumplir un CPP darán lugar a una investigación para determinar el impacto potencial sobre el CQA. Los controles durante el proceso (IPC), especificados por criterios de aceptación definidos (AC), se llevan a cabo durante la elaboración del principio activo para monitorear el proceso y pueden afectar la calidad final del principio activo. Las imposibilidades para cumplir estos criterios de aceptación darán lugar al rechazo del lote.

Los Parámetros No Críticos del Proceso se definen como procesos variables que no tienen impacto sobre los aspectos críticos de calidad del producto resultante; se monitorean para obtener una mejor comprensión del proceso que dará lugar a mejoras no relacionadas con la calidad (por ej., optimización económica de un proceso). Los controles durante el proceso (IPC), límites de acción de vías controlados (AL), se llevan a cabo durante la elaboración del principio activo para monitorear el proceso. En los resultados que no cumplan los requerimientos de los parámetros de proceso o IPC, se inicia una investigación para evaluar la causa raíz y descartar cualquier efecto perjudicial sobre la calidad y seguridad causado por la desviación observada del límite de acción.

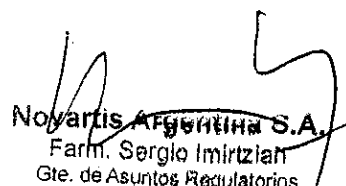
Por último, pueden llevarse a cabo parámetros no críticos de prueba IPC por su valor informativo, esto es, por el propósito de monitorear y/o ajustar el proceso y que son necesarios para, por ej., el cálculo de otros parámetros especificados. Estos datos pueden utilizarse como datos de apoyo para la investigación de desviaciones en los límites de acción o los criterios de aceptación.

Se identificaron los parámetros críticos de proceso para fermentación, aislamiento, y purificación y se encontraron dentro del rango especificado para todos los lotes utilizados para las actividades de Validación del Proceso.

Validación de la Depuración

Las impurezas relacionadas con los procesos endógenos incluyen ADN, proteínas de la célula huésped (HCP), y endotoxinas, que están compuestas por residuales de proceso de la línea celular de *E. coli* utilizada en la elaboración de la proteína recombinante NadA. Las impurezas relacionadas con los procesos exógenos incluyen, pero sin limitación, Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosida (IPTG), polipropilenglicol (PPG). Las cinco impurezas se evaluaron en una validación de la depuración llevada a cabo para la proteína recombinante NadA para demostrar la capacidad y consistencia del proceso en la eliminación de estas impurezas.


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

Todos los criterios de aceptación de la depuración se cumplieron para las cinco impurezas. Para ADN, PPG, e IPTG, la impureza se eliminó tan eficientemente por el proceso que estas pruebas no se llevarán a cabo en lotes futuros en los pasos intermedios y del granel concentrado. Si bien las impurezas para HCP y endotoxina también se eliminaron eficientemente por parte del proceso, las pruebas continuarán llevándose a cabo en los pasos de control durante el proceso para endotoxinas y en el paso del granel concentrado como un cálculo conservador para asegurar la pureza del producto.

Control de Biocarga

El ingreso de biocarga en las soluciones de proceso/producto se controla vía las instalaciones, equipamiento, y procesos designados para mantener bajos niveles de Biocarga durante la elaboración. Se llevaron a cabo mejoras extensivas en las instalaciones entre las campañas de 2007 y 2009, lo que dio lugar a niveles de biocarga significativamente menores para la campaña de 2009.

Dado que las mejoras se completaron en 2009, la biocarga en los pasos intermedios se está monitoreando actualmente con el fin de generar datos suficientes para el ajuste de límites adecuados. Sin embargo, se han establecido límites de acción con base en los resultados de las campañas de 2009 y 2010.

Vida Útil de la Resina


Para establecer la máxima vida útil de la columna, se llevó a cabo un estudio de duración de la resina de la proteína recombinante NadA de pasos cromatográficos para determinar el número máximo de ciclos en que puede utilizarse una resina, por el uso de un modelo calificado reducido a escala y muestras de intermediarios recolectadas durante la campaña de 2009 y 2010 llevada a cabo en Sandoz. El modelo reducido a escala llevado a cabo con estos intermediarios se ha calificado para comparabilidad con el proceso a escala completa. El estudio se llevó a cabo con nuevas resinas cromatográficas para intercambio aniónico, interacción hidrofóbica y pasos de cromatografía en hidroxapatita cerámica. Con base en los resultados, la reutilización de resina se demostró como segura para todas las resinas cromatográficas hasta 30 operaciones.


Vida Útil de la Membrana

Las membranas utilizadas para los pasos de filtración UF/DF se reutilizan durante cada campaña para la elaboración a granel de la proteína recombinante NadA. El desempeño de las membranas se comprueba antes de cada lote y se compara con nuevas membranas por una prueba neta de permeabilidad en agua de acuerdo con las recomendaciones del comercializador. Las membranas se descargan una vez que se completa cada campaña.

Validación del Transporte


El granel concentrado de la proteína recombinante NadA congelan a $\leq -15^{\circ}\text{C}$ en el sitio Sandoz, en Kundl, Austria, y se trasladan vía camiones con control de temperatura a Novartis Vaccines and Diagnostics, ubicado en Rosia, Italia, para el proceso de elaboración adicional. Todas las cargas se transportan con dos monitores de temperatura en el producto y una sonda de temperatura en el


Novartis Argentina S.A.
Dr. Lucio Jerošic
Director Técnico
MN 14640


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

camión. Para confirmar que el granel con control de temperatura se mantenga a $\leq -15^{\circ}\text{C}$ (punto de inicio -20°C) durante el transporte, se llevó a cabo una validación del traslado.

Una ruta representativa se seleccionó como representativa para todas las otras rutas de traslado. Para el estudio, se llevaron a cabo tres operaciones de mapeo térmico, que consistían en dos cargas a escala completa y una carga a escala reducida, en tres trailers refrigerados. El estudio se llevó a cabo en febrero de 2009, por el uso de registradores automáticos de la temperatura calibrados y certificados. Se cumplieron todos los criterios de aceptación.



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



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

3) CONTROL DE CALIDAD - METODOS CONTROL

3.1 Especificaciones

Se proporciona en la tabla a continuación una síntesis de las pruebas y especificaciones llevadas a cabo para liberación del granel concentrado de la proteína recombinante NadA. Todas las pruebas, con la excepción de HCP/ELISA y Osmolaridad, se llevan a cabo por cuenta de Sandoz. La liberación final del granel concentrado para elaboración adicional se lleva a cabo por cuenta de Novartis Vacunas & Diagnósticos.

Con base en un pedido de AFSSAPS posterior a la reunión y discusiones internas del día 24-Oct-2008, el término "integridad" ha sido reemplazado por "pureza" para los análisis llevados a cabo vía SE-HPLC, en alineación con la directriz Q6B de ICH Q6B. Para diferentes purezas determinadas por el mismo método y aplicables a las valoraciones de RP-HPLC y SDS-PAGE, se asignaron dos términos para diferenciar entre la pureza del antígeno con respecto a formas degradadas e impurezas del proceso de proteína (pureza) y la pureza del antígeno con respecto a sustancias relacionadas con productos específicos (integridad). La terminología propuesta se detalla en la Tabla 5.

Tabla 4 Especificaciones de Liberación para el Granel Concentrado de la proteína recombinante NadA

Prueba	Método de Análisis	Referencia	Especificación Corriente
Pureza	SDS-PAGE	Interna	≥ 90%
Integridad		Interna	≥ 70%
Pureza	SE-HPLC	Interna	≥ 89%
Contenido de Proteínas	Valoración de Proteínas Totales BCA	Interna	1000-3000 µg/ml
Identidad	Western Blot	Interna	Positiva
HCP/Proteína ¹	ELISA/cálculo	Interna	≤ 50 ppm
Osmolaridad ¹	Osmometría, punto de congelamiento	Ph. Eur./USP	240-360 mOsm/kg
Endotoxina/Proteína	Prueba cromogénica cinética/cálculo	Ph. Eur./USP	≤ 0,16 IU/µg
Biocarga	Filtración de membrana	Ph. Eur./USP	≤ 10 CFU/100 ml ²
pH	Potenciometría	Ph. Eur./USP	6,5-7,5
Conductividad	Potenciometría	Ph. Eur./USP	15,000-17,300 µS/cm

BCA: Ácido Bicinconínico; CFU: Unidades de Formación de Colonias; ELISA: Valoración Inmunoabsorbente Vinculada con Enzimas; IU: Unidades Internacionales; µS: Micro-Siemens; mOsm: Milli-Osmoles; Ph. Eur.: Farmacopea Europea; ppm: partes por millón; SE-HPLC: Cromatografía líquida de alto rendimiento con exclusión de tamaño; SDS-PAGE: Electroforesis en gel de dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida; USP: Farmacopea de los Estados Unidos

¹ La prueba se lleva a cabo por cuenta de Novartis Vacunas & Diagnósticos.

² La especificación para Biocarga de ≤ 17 CFU/100 ml será reducida a ≤ 10 CFU/100 ml y se aplicará comenzando desde la campaña 2013.


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

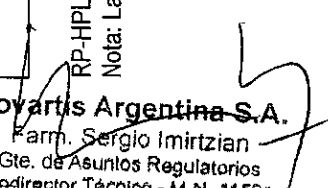
Novartis Argentina S.A.
Farm. Sergio Imirtzian
Gte. de Asuntos Regulatorios
Codirector Técnico - M.N. 11521
Apoderado

Tabla 5 Fundamentos para el Uso de Terminología para Pureza e Integridad

Método de Análisis	Descripción General de Medición	Nomenclatura Corriente	Nomenclatura Propuesta	Fundamentos para la Selección de la Terminología Utilizada
SE-HPLC	Área porcentual del pico de antígenos con respecto al área total del cromatograma	Integridad	Pureza	La pureza del antígeno con respecto a formas agregadas/degradadas y a impurezas del proceso de proteínas. El término "Pureza" se seleccionó dado su extenso significado que incluye, pero sin limitación, "integridad".
RP-HPLC	Área porcentual del pico de antígenos con respecto al área total del cromatograma	Pureza	Pureza	La pureza del antígeno con respecto a formas agregadas/degradadas y a impurezas del proceso de proteínas
RP-HPLC	Área porcentual del pico de antígenos con respecto a la suma del área del pico de antígenos más el área de picos de degradación seleccionados	Integridad	Integridad	La pureza del antígeno con respecto a sustancias relacionadas con productos específicos. El término "Integridad" se seleccionó para diferenciar entre dos purezas diferentes determinadas por el uso del mismo método.
SDS-PAGE	Intensidad porcentual de la banda de antígenos con respecto a la intensidad de las bandas totales en el gel	Pureza	Pureza	La pureza del antígeno con respecto a las formas degradadas y a impurezas del proceso de proteínas
SDS-PAGE	Intensidad porcentual de la banda de antígenos con respecto a la suma de la banda de antígenos más bandas de degradación seleccionadas	Integridad	Integridad	La pureza del antígeno con respecto a sustancias relacionadas con productos específicos; el término "Integridad" se seleccionó para diferenciar entre dos purezas diferentes determinadas por el uso del mismo método.

RP-HPLC: Cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa; SE-HPLC: Cromatografía líquida de alto rendimiento con exclusión de tamaño; SDS-PAGE: gel de dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida
 Nota: La RP-HPLC se utiliza para la prueba de controles durante el proceso para la proteína recombinante NADA.


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


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




3.2 Procedimientos Analíticos

Se describen en las siguientes tablas los procedimientos analíticos para el granel concentrado e intermediarios de la proteína recombinante NadA.

Tabla 6 Biocarga

<p>Descripción de la Valoración</p>	<p>Valoración de Sandoz, para controles durante el proceso y liberación del granel concentrado:</p> <p>Un volumen de 100 ml del granel concentrado se filtra a través de un filtro de membrana estéril de 0,45µm. Luego, el filtro se enjuaga 3 veces con 100 ml de solución estéril de cloruro de sodio-peptona. El filtro se transfiere asépticamente a agar de soja triptica para el crecimiento de bacterias aeróbicas, levaduras, y moldes. El tampón de peptona sirve como un control negativo diario. La incubación se lleva a cabo durante no menos que 7 días a 30 ± 2°C.</p> <p>Valoración de Novartis, para estabilidad del granel concentrado:</p> <p>Un volumen especificado de muestra de prueba se filtra a través de un filtro de membrana estéril de 0,45 µm. Luego, el filtro se enjuaga 3 veces con 100 ml de Solución de Enjuague, y se transfiere asépticamente a placas TSA y SDA. La Solución de Enjuague filtrada de la misma manera que las Muestras de Prueba sirve como el control negativo. La incubación se lleva a cabo a 30-35°C durante 3-5 días para las placas TSA y a 20-25°C durante 5-7 días para las placas SDA. Al final del período de incubación, se cuentan las colonias formadas sobre las placas. Si se detecta crecimiento microbiano, los contaminantes se identifican e investigan.</p>
<p>Consistencia a Farmacopeas</p>	<p>Valoración de Sandoz:</p> <p>Ph. Eur. Capítulo 2.6.12 Examinación Microbiana de Productos no Estériles: Pruebas de Enumeración Microbiana [Método de Prueba: Recuentos Microbianos Aeróbicos Totales (TAMC)]</p> <p>Valoración de Novartis:</p> <p>Ph. Eur. Capítulo 2.6.12 Examinación Microbiológica de Productos no Estériles: Pruebas de Enumeración Microbiana</p> <p>USP Capítulo <61> Examinación Microbiológica de Productos no Estériles: Pruebas de Enumeración Microbiana</p>



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



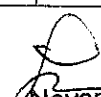
Novartis Argentina S.A.
Farm. Sergio Imirtzian
Gte. de Asuntos Regulatorios
Codirector Técnico - M.N. 11521
Apoderado

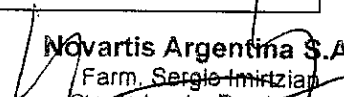
Tabla 7 Conductividad

Muestras de Prueba	Granel Concentrado
Estándares y Controles de Referencia	Soluciones Estándares de Conductividad Certificada NIST y PTB para Calibración
Descripción de la Valoración	<p>Valoración de Sandoz:</p> <p>La célula (electrodo) constante en el conductímetro se calibra a una solución estándar, por el uso del estándar más cercano a la conductividad de la solución a medir. La muestra de prueba se vierte en el recipiente y las sondas de temperatura y conductividad se colocan en la solución de prueba y se mide la conductividad. La sonda se enjuaga con agua desionizada entre las muestras de prueba. Se toma una lectura simple para cada muestra a temperatura ambiente.</p> <p>El análisis es válido si la conductividad de la solución estándar de referencia está dentro de $\pm 5\%$ del valor certificado, a menos que se especifique lo contrario por parte del fabricante.</p>
Consistencia a Farmacopeas	Ph. Eur. Capítulo 2.2.38 Conductividad USP <645> Conductividad en Agua

Tabla 8 Endotoxina

Descripción de la Valoración	<p>Valoración de Sandoz (para controles durante el proceso y liberación del granel concentrado) y Valoración de Novartis (para la estabilidad del granel concentrado):</p> <p>Se lleva a cabo en la prueba de rutina una prueba de inhibición/aumento. Las muestras se diluyen y los pocillos que contienen muestras se enriquecen con una cantidad conocida de endotoxina por propósitos de revisión de factores interferentes. La curva estándar se prepara a partir de una solución estándar de endotoxina de control (CSE) incluida en el kit comercial. Para generar la curva estándar, se llevan a cabo cuatro diluciones seriales en diez veces de CSE, comenzando en una concentración de CSE de 5 IU/ml (Valoración de Sandoz) o 50 UI/ml (Valoración de Novartis).</p> <p>La muestra y las diluciones de la curva estándar y el control negativo se siembran en una placa de microtitulación de 96 pocillos y se preincuban antes de la adición del reactivo LAL a cada pocillo durante 10 minutos a $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Luego de la adición del reactivo LAL, las placas se agitan durante 30 segundos a $37 \pm$</p>
-------------------------------------	---


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


Novartis Argentina S.A.
 Farm. Sergio Imirtzian
 Cte. de Asuntos Regulatorios
 Codirector Técnico - M.N. 11821
 Apoderado

