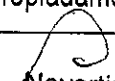
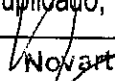

Tabla 15 SDS-PAGE

Descripción de la Valoración	<p>Valoración de Sandoz, para controles durante el proceso y liberación del granel concentrado:</p> <p><u>Determinación de Pureza e Integridad</u></p> <p>El estándar de referencia proteína recombinante NadA se diluye apropiadamente, se calienta, y agrega a los pocillos adecuados en dos concentraciones diferentes; las concentraciones superiores e inferiores sirven como los estándares de identidad y valor de referencia, respectivamente. Se diluyen muestras de prueba para ajustarse al rango de concentración especificado de proteínas totales por pocillo; luego, las muestras se calientan y se aplican, por duplicado, a los pocillos con gel. Se incluye un estándar de peso molecular sobre cada gel (en cada operación de valoración) y el tampón de muestra diluido en agua y calentado sirve como el blanco y el control negativo. Las muestras por duplicado, junto con un marcador del peso molecular, estándares, y blancos, se someten a electroforesis.</p> <p>Para visualizar las bandas, el gel se tinte con azul de Coomassie en etanol y se destiñe por el uso de una mezcla de etanol y ácido acético. El gel se barre con un densitómetro. Para la proteína recombinante NadA, existe una banda principal y dos bandas menores correspondientes a las variantes de proteína recombinante NadA nativa y de proteína recombinante NadA (proteínas eliminadas del extremo terminal C), respectivamente. La pureza se expresa como la suma de la cantidad relativa porcentual de las tres bandas de proteína recombinante NadA, cuando se compara con la intensidad densitométrica global de la totalidad de la hilera.</p> <p>La integridad se expresa como la proporción de la cantidad relativa porcentual de la banda principal de la proteína recombinante NadA, cuando se compara con la suma de la cantidad relativa porcentual de las tres bandas relacionadas con la proteína recombinante NadA. Se verifican los criterios adecuados de idoneidad del sistema para confirmar la validez de la corrida analítica.</p> <p><u>Determinación de Cantidad</u></p> <p>La cuantificación se lleva a cabo únicamente para el sobrenadante de muestras de fermentación de caldo de cultivo centrifugadas. El estándar de referencia se diluye apropiadamente, se calienta y volúmenes iguales a cuatro cargas de proteína diferentes (1,5, 3,0, 4,5, y 6,0 µg) se aplican a los pocillos con gel adecuados. Las muestras se recolectan en cuatro puntos de tiempo de fermentación: Tiempo 0 a partir de la adición de IPTG, y 1, 2, y 3 horas después de la adición IPTG. Las muestras se diluyen apropiadamente. Las muestras por duplicado, junto con un</p>
-------------------------------------	--


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


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

	<p>marcador del peso molecular, estándares, y blancos, se cargan sobre el gel de SDS gel y se someten a electroforesis. Los geles se tiñen y barren de acuerdo con lo descrito con anterioridad para pureza e integridad. La suma de los valores de cantidad de señales (densidad óptica x mm) para las tres bandas de proteína recombinante NadA en las muestras de referencia se utilizan para un análisis de regresión lineal. La cuantificación de la muestra no diluida se lleva a cabo vía la evaluación de las tres bandas de proteína recombinante NadA, y se calcula por un análisis de regresión lineal. Se verifican los criterios adecuados de idoneidad del sistema para confirmar la validez de la corrida analítica.</p>
	<p>Valoración de Novartis, para estabilidad del granel concentrado:</p> <p><u>Determinación de Pureza e Integridad</u></p> <p>El estándar de referencia proteína recombinante NadA se diluye con PBS o agua y se mezcla con un tampón de muestra y agente reductor, se calienta, y agrega a los pocillos adecuados. Se diluyen muestras de prueba en tampón de muestra y agente reductor para dar un rango de concentración especificado de proteínas totales por pocillo; las muestras se calientan y agregan, por duplicado, a los pocillos. Una mezcla calentada de PBS, tampón de muestra, y agente reductor sirve como el blanco, o control negativo. Se incluye un estándar de peso molecular en cada operación de valoración. Las muestras por duplicado, junto con un marcador del peso molecular, estándares, y blancos, se cargan sobre el gel de SDS y se someten a electroforesis.</p> <p>Para visualizar las bandas, el gen se tiñe con azul de Coomassie en etanol y se destiñe por el uso de una mezcla de etanol y ácido acético. El gel se barre con un densitómetro. Para la proteína recombinante NadA, hay una banda principal y dos bandas menores. La pureza se expresa como la suma de la cantidad relativa porcentual de las tres bandas de proteína recombinante NadA, cuando se compara con la intensidad densitométrica total de la hilera. La integridad se expresa como la proporción de la cantidad relativa porcentual de la banda principal de proteína recombinante NadA, cuando se compara con la suma de la cantidad relativa porcentual de las tres bandas. Se verifican los criterios adecuados de idoneidad del sistema para confirmar la validez de la corrida analítica.</p>
<p>Consistencia a Farmacopeas</p>	<p>No aplicable</p>



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



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

Tabla 16 SE-HPLC

Descripción de la Valoración	<p>Valoración de Sandoz, para la liberación del granel concentrado:</p> <p>Para la separación cromatográfica, se preparan cuatro soluciones de estándares y referencias. Una mezcla de azul dextrano y azida de sodio (NaN₃) se utiliza para la prueba del rango de integración y eficiencia de separación. Para la calibración del tiempo de retención y el peso molecular, se utiliza una mezcla que consiste en proteínas estándares con PM múltiples (por ej., proteínas de tiroglobulina, gamma globulina, ovoalbúmina, mioglobina y Vitamina B12). El estándar de proteína recombinante NadA sirve como la referencia y la fase móvil (mezcla de fosfato de dihidrógeno de potasio y sulfato de sodio) sirve como el blanco, o control negativo. Se diluyen muestras de prueba en la fase móvil de modo tal que el detector de señal esté dentro del rango del sistema.</p> <p>La columna SEC se equilibra con fase móvil antes del uso. Cada secuencia de inyección incluye una inyección simple mínima del estándar de referencia proteína recombinante NadA antes y después de la inyección de muestra de prueba, el estándar de PM, y la muestra de azul dextrano/azida de sodio, para la operación óptima del sistema. Una inyección doble se utiliza para cada muestra de granel concentrado probado. La columna se opera a las condiciones validadas, con detección a una absorbancia de UV de 214 nm. La integración del pico se lleva a cabo en forma manual con la ayuda del sistema de evaluación de datos Chromeleon (o equivalente).</p> <p>El contenido de pureza/impurezas se determina por la evaluación del área de pico porcentual (integración) del pico principal asignada a proteína recombinante NadA con respecto al total de todas las áreas pico asignadas a sustancias e impurezas relacionadas con el producto de la proteína recombinante NadA y la proteína recombinante NadA. Se ruega notar que los picos fuera de los intervalos de azul dextrano y NaN₃ no se utilizan para integración. La identidad se confirma por la comparación de tiempos de retención de muestras con el estándar de referencia de MenB proteína recombinante NadA. Se verifican los criterios adecuados de idoneidad del sistema para confirmar la validez de la corrida analítica.</p> <p>Valoración de Novartis, para estabilidad del granel concentrado:</p>
-------------------------------------	--



	<p>Para la separación cromatográfica, se preparan los mismos estándares y referencias que los usados por Sandoz. Además, una solución de PABA (ácido para-aminobenzoico), se prepara en la fase móvil y se utiliza para la determinación de la eficiencia de la columna. Se diluyen muestras de prueba en la fase móvil de modo tal que la señal de detección esté dentro del rango del sistema.</p> <p>La columna de resina de gel de sílice se equilibra con la fase móvil antes del uso. Cada secuencia de inyección incluye una inyección simple mínima del estándar de referencia de proteína recombinante NadA, el estándar de PM, la muestra de PABA, la muestra de azul dextrano/azida de sodio, y el blanco. Una inyección doble se utiliza para cada muestra de granel concentrado probado. La columna se opera a las condiciones validadas, con detección a una absorbancia de UV de 214 nm y 280 nm (para eficiencia de columna). La integración del pico se lleva a cabo por el sistema Empower (o equivalente).</p> <p>La pureza se determina por la evaluación del área de pico porcentual del pico principal asignada a la proteína recombinante NadA con respecto a la totalidad de las áreas de pico asignadas a sustancias e impurezas relacionadas con el producto de la proteína recombinante NadA y la proteína recombinante NadA. Se hace notar que los picos fuera de los intervalos de azul dextrano y NaN₃ no se utilizan. La identificación del pico principal se determina por la comparación de los tiempos de retención de la muestra con el estándar de referencia de MenB proteína recombinante NadA. Se verifican los criterios adecuados de idoneidad del sistema para confirmar la validez de la corrida analítica.</p>
Consistencia a Farmacopeas	No aplicable

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

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

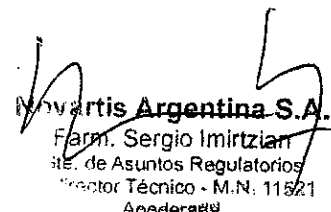
3.3 Justificación de las especificaciones

La justificación de las especificaciones para la elaboración del Granel Concentrado para la proteína recombinante NadA se proporciona a continuación.

Tabla 17 Justificación de Especificaciones para la Elaboración del Granel Concentrado de la proteína recombinante NadA

Prueba	Método de Análisis	Especificación	Justificación de Especificaciones
Pureza	SDS-PAGE	≥ 90% relativa a especies no proteína recombinante NadA	SDS-PAGE monitorea la pureza del producto por la separación de proteínas y péptidos de acuerdo con la masa bajo condiciones de desnaturalización y reducción. La especificación corriente para la proteína recombinante NadA relativa a especies no proteína recombinante NadA especies se ajusta con base en la experiencia clínica y de producción y por el uso de los lotes producidos en Sandoz en 2007-2010. Con base en los lotes analizados, los valores de pureza por SDS-PAGE oscilaron de 90-98% y, por lo tanto, la especificación final se ajustó a ≥ 90%.
Integridad	SDS-PAGE	≥ 70% de proteína recombinante NadA intacta relativa a proteína recombinante NadA total	La presencia de especies de menor peso molecular que representan las formas eliminadas del extremo terminal C de la proteína se han observado en forma consistente en todos los lotes de proteína recombinante NadA producidos en NVD y Sandoz. Para caracterizar en forma funcional estas variantes, la Compañía ha llevado a cabo estudios de inmunogeneicidad dedicados por el uso de las formas eliminadas del extremo terminal C de la proteína recombinante NadA y los datos muestran que estas especies generan una respuesta inmune comparable a la proteína recombinante de longitud completa. SDS-PAGE bajo condiciones de reducción se utiliza para cuantificar las cantidades relativas de formas eliminadas del extremo terminal C de la proteína recombinante NadA y para demostrar la consistencia lote a lote. La especificación corriente de ≥ 70% da cuenta del patrón de heterogeneidad observado de la proteína recombinante NadA, con base en la experiencia de producción y clínica y por el uso de los 12 lotes producidos en Sandoz de 2007-2010.


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


Novartis Argentina S.A.
 Farn. Sergio Imirtzian
 Director de Asuntos Regulatorios
 Director Técnico - M.N. 11521
 Aneferam

Pureza	SE-HPLC	$\geq 89\%$	SE-HPLC también monitorea la pureza del producto, pero proporciona información referente al estado nativo de la proteína y es capaz de detectar agregados no covalentes en adición a las formas truncadas de la proteína. La especificación corriente de $\geq 89\%$ se basa en la experiencia de producción y clínica, por el uso de los lotes producidos en Sandoz de 2007-2010.
Contenido de Proteínas	Valoración de Proteínas Totales BCA	1000-3000 $\mu\text{g/ml}$	La valoración BCA mide el Contenido Total de Proteínas en el granel purificado y los resultados obtenidos se utilizan para formular el medicamento. La especificación menor de 1000 $\mu\text{g/ml}$ se ha ajustado para asegurar que la conductividad que surge de la formulación del Granel Concentrado de proteína recombinante NadA no afecte las interacciones antígeno-adyuvante durante la formulación del medicamento. Con base en la estabilidad obtenida a la fecha, no existe formación de oligómeros o agregados de proteína recombinante NadA, por lo tanto, la especificación mayor se ha ajustado a 3000 $\mu\text{g/ml}$.
Identidad	Western Blot	Positiva	El Western blot es una prueba altamente sensible y específica que cuenta con la capacidad confirmar identidad y el peso molecular de la proteína proteína recombinante NadA. La especificidad combinada conferida por reconocimiento de anticuerpos y peso molecular torna a esta valoración apropiada para confirmar la identidad de antígenos individuales en el principio activo y en el medicamento.
HCP/Proteína	ELISA/ cálculo	$\leq 50 \text{ ppm}$	La cantidad de HCP residual se determina vía el uso de una inmunoválora enzímica tipo sándwich comercial directa, con la cantidad de proteínas de <i>E. coli</i> extrapoladas de la curva estándar proporcionada con el kit. El límite de especificación de $\leq 50 \text{ ppm}$ se basa en los resultados obtenidos de doce lotes de proteína recombinante NadA elaboradas entre 2007 y 2010.
Osmolaridad	Osmometría/ punto de congelamiento	240-360 mOsm/kg	La osmolaridad se determina por la depresión del punto de congelamiento. Se ha establecido una especificación de 240-360 mOsm/kg con base en la experiencia clínica y de producción y por el uso de los 12 lotes producidos en Sandoz de 2007-2010.
Endotoxina/ Proteína	Prueba cromogénica	$\leq 0,16 \text{ IU}/\mu\text{g}$	El límite de especificación de $\leq 0,16 \text{ IU}/\mu\text{g}$ de proteína se deriva del límite de Ph.Eur./USP de un total de 25 IU por

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

	cinética/cálculo		dosis de vacuna, tomando en cuenta que una dosis de la vacuna Bexsero contiene 150 µg totales de proteína.
Biocarga	Filtración de membrana	≤ 10 CFU/100 ml	Un nuevo límite de biocarga para el antígeno proteína recombinante NadA se aplicará comenzando desde la campaña de elaboración del granel de proteína recombinante del 2013; el límite de ≤ 17 CFU/100 ml se reducirá a ≤ 10 CFU/100 ml. Esto cumple con los requerimientos del Manual de Calidad de Novartis y de la Nota CPMP para la Guía de Elaboración de la Forma de Dosificación Terminada (CPMP/QWP/486/95).
pH	Potenciometría	6,5-7,5	Se ha demostrado que la formulación corriente para el Granel Concentrado de proteína recombinante NadA confieren estabilidad adecuada cuando se almacena a -20°C ± 5°C o a -70°C ± 10°C durante hasta 24 meses y actualmente hay estudios en curso para dar sustento a la extensión de ese tiempo de espera. La especificación del pH se diseña para demostrar que la operación final de la unidad de ultrafiltración/diafiltración intercambié exitosamente la proteína recombinante NadA en un sistema de tampón donde se ha demostrado la estabilidad del Granel Concentrado.
Conductividad	Potenciometría	15.000-17.300 µS/cm	En forma similar a la justificación de la especificación del pH descrita con anterioridad, la especificación de conductividad se diseña para demostrar que la proteína recombinante NadA se ha intercambiado por tampón en la formulación donde se ha demostrado la estabilidad del Granel Concentrado.

BCA: Ácido Bicinconínico; CFU: Unidades de Formación de Colonias; ELISA: Valoración Inmunoabsorbente Vinculada con Enzimas; HCP: Proteína de las Células Huésped; IU: Unidades Internacionales; µS: Micro-Siemens; mOsm: Mili-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.



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



Novartis Argentina S.A.
Farm. Sergio Imizian
Dir. de Asuntos Regulatorios
Director Técnico - M.N. 11521
Aparellado



4) VALIDACIÓN PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS


La síntesis para la validación de procedimientos analíticos para Intermediarios y el granel concentrado se describe en la siguiente sección.


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 18 Resultados de Validación para Biocarga (Valoración de Sandoz)

Parámetro Probado	Descripción de la Prueba de Validación	Criterios de Aceptación de la Validación	Resultados de la Validación
Inhibición de microorganismos bacterianos y fúngicos de prueba para el Granel Concentrado	Los recuentos viables se determinan en presencia de seis organismos microbianos de referencia: <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Candida albicans</i> , y <i>Aspergillus niger</i> . Una cantidad conocida de cada microorganismo se enriquece en la muestra de prueba, luego se lamina por triplicado sobre un medio adecuado por el método de filtración de membrana. Luego, las placas se incuban durante un período de tiempo predefinido, y se recuentan las colonias.	La tasa de recuperación de microorganismos utilizada para la validación en comparación con el recuento microbiano de referencia debe ser $\pm 50\%$ (50-150%).	La recuperación porcentual osciló de 56-102% para los tres lotes del Granel Concentrado probado.
Inhibición de microorganismos bacterianos y fúngicos para pasos intermedios (soluciones de proceso)			Las recuperaciones porcentuales promedio oscilaron de 69-114%, 71-105%, 71-96%, 63-100%, y 76-107%, para UF/DF 1 y 2, Cromatografía III, II, y I, respectivamente, para los tres lotes intermedios probados.


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




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



Tabla 19 Resultados de Validación para Biocarga (Valoración de Novartis)

Parámetro Probado	Descripción de la Prueba de Validación	Criterios de Aceptación de la Validación	Resultados de la Validación
Inhibición de microorganismos bacterianos y fúngicos de prueba	Los recuentos viables se determinan en presencia de seis organismos microbianos de referencia: <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Aspergillus niger</i> , y <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> . Una cantidad conocida de cada microorganismo se enriquece en muestra de ensayo de tres lotes del granel concentrado, luego se lamina por duplicado sobre un medio adecuado por el uso del método de filtración de membrana. Luego, las placas se incuban durante un período de tiempo predefinido, y se recuentan las colonias.	La tasa de recuperación de microorganismos utilizada para la validación debe ser de al menos 70% en comparación con el Control Positivo.	La recuperación porcentual osciló de 76-100% para los tres lotes del Granel Concentrado probado.



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

