

trasladaron del almacenamiento a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  al almacenamiento a  $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  mientras aguardaban la reprobación.

Para la evaluación de pureza por SE-HPLC, los resultados para los tres lotes no cumplieron la especificación. Estos resultados estaban en línea con los resultados previamente obtenidos para los lotes clínicos de Fase I y Fase II.

La inestabilidad térmica se demostró por los resultados de la prueba acelerada a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

#### Plan de estabilidad

El estudio de estabilidad se lleva a cabo de acuerdo con un protocolo de estabilidad preaprobado. Para este estudio, tres lotes consecutivos de granel concentrado de proteína recombinante NadA, elaborados en el sitio Kundl, de Austria, se colocaron en estabilidad. Estos lotes (48201404, 48201405, y 48201406) se utilizaron en los ensayos clínicos de Fase III y también sirvieron como lotes de consistencia para el proceso de granel concentrado de proteína recombinante NadA.

**Tabla 48 Información de Elaboración para los lotes sometidos a estabilidad.**


| Lote Granel N° | Fecha de Elaboración <sup>1</sup> | Tamaño del Granel de Elaboración (Litros) |
|----------------|-----------------------------------|---|
| 48201404       | 20-Dic-2006                       | 99,8                                      |
| 48201405       | 09-Ene-2007                       | 91,8                                      |
| 48201406       | 16-Ene-2007                       | 74,4                                      |

<sup>1</sup>Fecha de elaboración para el granel concentrado es la fecha de llenado.

Muestras de cada uno de los tres lotes se dividieron en alícuotas en recipientes de polietileno tereftalato glicol (PETG) de 10 ml con tapa a rosca en el sitio de Kundl y se enviaron al sitio de Novartis Rosia, Italia, para pruebas de estabilidad. Estos recipientes de estabilidad eran del mismo material de construcción y tipo de sistema de cierre del recipiente utilizado para almacenar lotes de producción, excepto por una reducción en el tamaño. Este se considera el peor caso en términos de la proporción de superficie/volumen. Todas las muestras utilizadas para el estudio de estabilidad se almacenaron en posición horizontal.

El estudio de estabilidad se llevó a cabo a cuatro temperaturas. Un estudio de estabilidad a largo plazo se llevó a cabo a la temperatura de almacenamiento recomendada de  $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  para confirmar la vida útil de 36 meses. Además, muestras de los lotes de granel concentrado se mantuvieron a  $-70^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$  para demostrar que las temperaturas bajo la temperatura de almacenamiento recomendada actual también eran adecuadas para el granel concentrado. Se llevaron a cabo estudios de estrés a  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  sobre los tres lotes para generar información adicional sobre el perfil de estabilidad de la proteína.

Las pruebas, cronogramas, y especificaciones a largo plazo y aceleradas se proporcionan en la Tabla 49 a continuación. Se hace notar que todos los métodos de prueba de estabilidad fueron validados.

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

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



**Tabla 49 Cronogramas de Prueba de Estabilidad a Largo Plazo y Acelerada**

| Prueba de Estabilidad          | Especificaciones           | Puntos de Tiempo Programados  |  |   |
|--------------------------------|----------------------------|---|--|---|
|                                |                            | Prueba a largo plazo a $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ y a $-70^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$ | Prueba acelerada a $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ | Prueba acelerada a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ |
| Pureza e Integridad (SDS-PAGE) | Pureza $\geq 90\%$         | 0, 3, 6, 12, 18, 24, 36, y 48 meses, para ambas temperaturas  | 0, 0,5, 1, y 3 meses   | 0, 0,5, 1, y 2 meses  |
|                                | Integridad $\geq 70\%^1$   |   |  |   |
| Pureza <sup>2</sup> (SE-HPLC)  | $\geq 89\%$                |   |  |   |
| Contenido de Proteínas BCA     | 1000-3000 $\mu\text{g/ml}$ | 0, 6, 12, 24, 36, y 48 meses, para ambas temperaturas   | 0, 0,5, 1, y 3 meses   | NR  |
| pH                             | 6,5-7,5                    |   |  |   |

BCA: Ácido Bicinconínico; NR = No requerido; no se llevan a cabo pruebas a esta temperatura; SDS-PAGE: Electroforesis en gel de dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida; SE-HPLC: Cromatografía líquida de alto rendimiento con exclusión de tamaño;

<sup>1</sup> Desde Marzo de 2010 la especificación de estabilidad para Integridad (SDS-PAGE) se ajustó de  $\geq 65\%$  a  $\geq 70\%$  luego del comienzo de este estudio.

<sup>2</sup> Se hace notar que el término "integridad" se ha reemplazado con "pureza" para SE-HPLC, en conformidad con las recomendaciones de ICHQ6B.


**Protocolo de Estabilidad Posterior a la Aprobación y Compromiso de Estabilidad**

Un mínimo de un lote de granel concentrado para proteína recombinante NadA se colocará en estabilidad en una base anual. El programa de estabilidad anual del granel incluirá, como mínimo, las pruebas e intervalos enumerados en la siguiente tabla.

**Tabla 50 Plan de Prueba para el Programa de Estabilidad Anual de Granel para la proteína recombinante NadA, para Almacenamiento a  $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$** 

| Prueba                        | Especificación                                 | Intervalos de Prueba (Meses) |     |     |     |     |     |     |
|-------------------------------|--|------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|                               |  | Tiempo 0                     | 3   | 6   | 12  | 24  | 36  | 48  |
| Pureza (SDS-PAGE)             | $\geq 90\%$                                    | R                            | TBD | TBD | TBD | TBD | TBD | TBD |
| Integridad (SDS-PAGE)         | $\geq 70\%$                                    | R                            | TBD | TBD | TBD | TBD | TBD | TBD |
| Pureza <sup>1</sup> (SE-HPLC) | $\geq 89\%$                                    | R                            | TBD | TBD | TBD | TBD | TBD | TBD |
| Proteína BCA                  | 1000-3000 $\mu\text{g/ml}$                     | R                            | TBD | TBD | TBD | TBD | TBD | TBD |
| pH                            | 6,5-7,5  | TBD                          | TBD | TBD | TBD | TBD | TBD | TBD |
| Contenido de endotoxina       | $\leq 0,16 \text{ IU}/\mu\text{g}$ de proteína | TBD                          | TBD | TBD | TBD | TBD | TBD | TBD |

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

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





|          |                                 |     |     |     |     |     |     |     |
|----------|---------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Biocarga | $\leq 1$ CFU/10 ml <sup>2</sup> | 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-pollacrilamida; SE-HPLC: Cromatografía líquida de alto rendimiento con exclusión de tamaño; TBD: A determinar

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

<sup>2</sup>La especificación para Biocarga de  $\leq 1,7$  CFU/10 ml será reducida a  $\leq 1$  CFU/10 ml y se aplicará a los lotes sometidos a estabilidad comenzando desde el 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.**  
 Farm. Sergio Imirtzian  
 Ge. de Asuntos Regulatorios  
 Codirector Técnico - M.N. 11521  
 Apoderado



**Tabla 51** Resultados del Estudio de Estabilidad a Largo Plazo para los Lotes 48201404, 48201405, y 48201406 de Granel Concentrado de la proteína recombinante NadA, cuando se almacenan a  $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$

| Prueba de Estabilidad          | Especificación                                   | Lote No. | Tiempo de Almacenamiento (en meses) |                    |     |      |      |    |                 |      |                 |      |      |                 |
|--------------------------------|--|----------|-------------------------------------|--------------------|-----|------|------|----|-----------------|------|-----------------|------|------|-----------------|
|                                |  |          | Tiempo Cero (T0)                    | Inicio del Estudio | 3   | 6    | 12   | 18 | 24 <sup>3</sup> | 36   | 48              |      |      |                 |
| Pureza e Integridad (SDS-PAGE) | Pureza $\geq 90\%$<br><br>Integridad $\geq 65\%$ | 48201404 | 94                                  | 98                 | 100 | 98   | 98   | 98 | 98              | 98   | 98              | 98   | 98   | 98              |
|                                |  | 48201405 | 92                                  | 98                 | 98  | 98   | 99   | 98 | 99              | 99   | 99              | 99   | 99   | 98              |
| Pureza <sup>1</sup> (SE-HPLC)  | $\geq 89\%$                                      | 48201406 | 94                                  | 98                 | 99  | 99   | 99   | 98 | 89              | 86   | 88              | 88   | 88   | 88              |
|                                |  | 48201404 | 82                                  | 79                 | 81  | 87   | 89   | 82 | 89              | 86   | 88              | 89   | 86   | 88              |
| Contenido de Proteína BCA      | 1000-3000 $\mu\text{g/ml}$                       | 48201405 | 83                                  | 80                 | 90  | 91   | 93   | 84 | 90              | 85   | 89 <sup>4</sup> | 85   | 85   | 89 <sup>4</sup> |
|                                |  | 48201406 | 80                                  | 80                 | 89  | 90   | 91   | 82 | 88              | 86   | 87              | 86   | 86   | 87              |
| pH                             | 6,5-7,5  | 48201404 | 92                                  | 95                 | 95  | 96   | 95   | 95 | 93              | 93   | 94              | 95   | 93   | 94              |
|                                |  | 48201405 | 92                                  | 95                 | 96  | 96   | 96   | 94 | 94              | 93   | 92              | 94   | 93   | 92              |
| pH                             | 6,5-7,5  | 48201406 | 93                                  | 94                 | 96  | 96   | 95   | 96 | 94              | 93   | 93              | 94   | 93   | 93              |
|                                |  | 48201404 | 1883                                | 2042               | NR  | 2009 | 2081 | NR | 1964            | 2085 | 2140            | 1964 | 2085 | 2140            |
| pH                             | 6,5-7,5  | 48201405 | 1780                                | 1942               | NR  | 1580 | 1852 | NR | 1787            | 1923 | 1831            | 1787 | 1787 | 1923            |
|                                |  | 48201406 | 1800                                | 1938               | NR  | 1921 | 1900 | NR | 1844            | 2007 | 1944            | 1844 | 1844 | 2007            |
| pH                             | 6,5-7,5  | 48201404 | 7,1                                 | 7,1                | NR  | 7,1  | 7,1  | NR | 7,1             | 7,1  | 7,1             | 7,1  | 7,1  | 7,1             |
|                                |  | 48201405 | 6,9                                 | 7,0                | NR  | 7,0  | 7,0  | NR | 6,9             | 7,0  | 6,9             | 7,0  | 7,0  | 7,0             |
| pH                             | 6,5-7,5  | 48201406 | 7,0                                 | 7,1                | NR  | 7,1  | 7,1  | NR | 7,0             | 7,1  | 7,0             | 7,0  | 7,1  | 7,1             |
|                                |  | 48201406 | 7,0                                 | 7,1                | NR  | 7,1  | 7,1  | NR | 7,0             | 7,1  | 7,0             | 7,0  | 7,1  | 7,1             |

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 9-10 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 Bicinónico; 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.

<sup>1</sup> 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.

<sup>2</sup> Comenzando desde el tiempo de 36 meses (Marzo 2010) el límite para la Integridad (SDS-PAGE) se ajustó de  $\geq 65\%$  a  $\geq 70\%$ .

<sup>3</sup> 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.

<sup>4</sup> Se observó un perfil fuera de tendencia (OOT) en comparación con determinados datos existentes. La investigación concluyó que el OOT está relacionado con la variabilidad analítica. En base a esta evaluación, se excluyó una tendencia debido a la estabilidad de la proteína recombinante NadA.



**Tabla 52 Resultados del Estudio de Estabilidad a Largo Plazo para los Lotes 48201404, 48201405, y 48201406 de Granel Concentrado de la proteína recombinante**
**Nada, cuando se almacenan a  $-70^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$** 

| Prueba de                        | Especificación             | Lote No. | Tiempo de Almacenamiento (en meses) |            |    |      |      |    |      |                 |                 |    |    |
|----------------------------------|----------------------------|----------|-------------------------------------|------------|----|------|------|----|------|-----------------|-----------------|----|----|
|                                  |                            |          | Tiempo                              | Inicio del | 3  | 6    | 12   | 18 | 24   | 36              | 48              |    |    |
| Pureza e                         | Pureza $\geq 90\%$         | 48201404 | 94                                  | 98         | 98 | 98   | 99   | 98 | 98   | 98              | 98              | 98 | 99 |
|                                  |                            | 48201405 | 92                                  | 98         | 99 | 99   | 98   | 98 | 98   | 99              | 99              | 99 | 99 |
| Integridad<br>(SDS-PAGE)         | Integridad $\geq 70\%^2$   | 48201406 | 94                                  | 98         | 98 | 99   | 98   | 98 | 98   | 99              | 98              | 98 | 97 |
|                                  |                            | 48201404 | 82                                  | 79         | 79 | 80   | 85   | 80 | 90   | 83              | 87 <sup>3</sup> |    |    |
| Pureza <sup>1</sup><br>(SE-HPLC) | $\geq 89\%$                | 48201405 | 83                                  | 80         | 90 | 74   | 87   | 82 | 84   | 89 <sup>3</sup> |                 |    |    |
|                                  |                            | 48201406 | 80                                  | 80         | 83 | 83   | 88   | 82 | 86   | 86              |                 |    |    |
| Contenido de<br>Proteína BCA     | 1000-3000 $\mu\text{g/ml}$ | 48201404 | 92                                  | 95         | 93 | 96   | 95   | 94 | 94   | 92              |                 |    |    |
|                                  |                            | 48201405 | 92                                  | 95         | 94 | 95   | 96   | 95 | 94   | 94              | 91              |    |    |
| pH                               | 6,5-7,5                    | 48201406 | 93                                  | 94         | 94 | 96   | 95   | 96 | 94   | 95              | 93              |    |    |
|                                  |                            | 48201404 | 1883                                | 2042       | NR | 2020 | 2074 | NR | 1800 | 2135            |                 |    |    |
|                                  |                            | 48201405 | 1780                                | 1942       | NR | 1820 | 1846 | NR | 1783 | 1907            |                 |    |    |

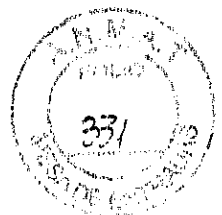
Las muestras de tiempo cero se probaron al momento de la liberación. Se probaron muestras al inicio del estudio en la fecha de comienzo de estabilidad del 15-Oct-2007 para los tres lotes, cuando las muestras tenían 9-10 meses de edad. Las muestras se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  hasta el comienzo del estudio de estabilidad cuando se transfirieron a las condiciones de almacenamiento de estabilidad adecuadas.

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; BCA: Ácido Bicinónico.

<sup>1</sup> 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.

<sup>2</sup> La especificación de estabilidad para la Integridad (SDS-PAGE) se ajustó de  $\geq 65\%$  a  $\geq 70\%$  después del comienzo de este estudio.

<sup>3</sup> Se observó un perfil fuera de tendencia (OOT) en comparación con determinados datos existentes. La investigación concluyó que el OOT está relacionado con la variabilidad analítica. En base a esta evaluación, se excluyó una tendencia debido a la estabilidad de la proteína recombinante Nada.



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

