


**Tabla 24 Identidad por Western Blot**

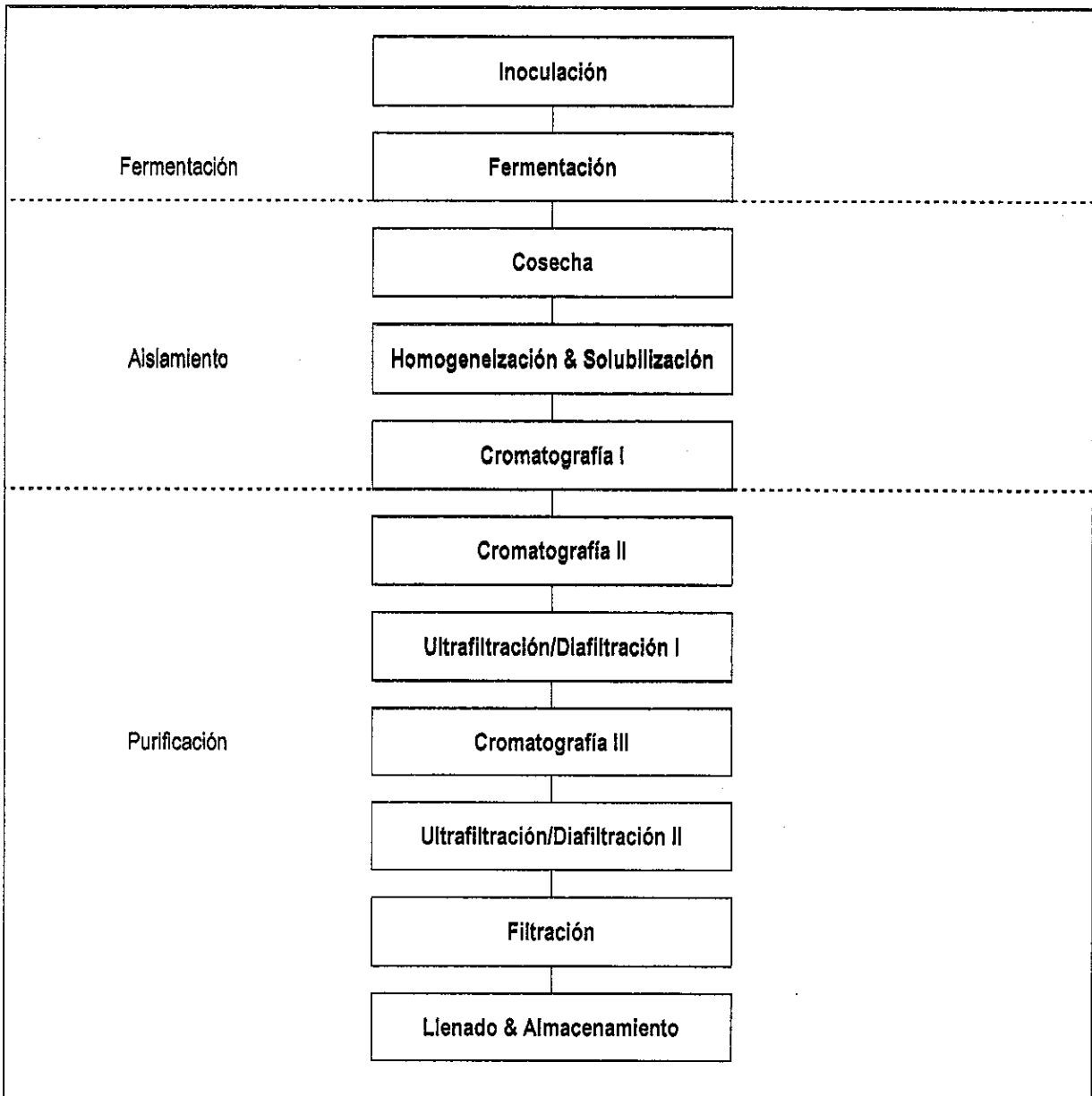
<b>Muestras de Prueba</b>	<b>Granel Concentrado</b>
<b>Descripción de la Valoración</b>	<p>Se opera un western blot con anticuerpos policlonales dirigidos contra la proteína recombinante de fusión fHbp. Las concentraciones de muestra y estándar se ajustan a una concentración nominal, se tratan con un agente reductor, y se calientan para reducir los puentes de disulfuro de la proteína. Un volumen especificado para la muestra y el estándar, igual a aproximadamente 1,0 µg de proteína se carga sobre el gel de poliacrilamida; el estándar de proteína recombinante de fusión fHbp sirve como el estándar de identidad en el análisis de western blot. Un segundo volumen del estándar recombinante, con una menor cantidad de proteína (aproximadamente 5% de la cantidad nominal de proteína), se carga sobre el gen para llevar a cabo una prueba de sensibilidad. El tampón de muestra se aplica a los geles como muestra blanco.</p> <p>Las muestras se aplican al gen por duplicado. Además, se cargan un marcador del peso molecular, estándares, y blancos, sobre un gel de poliacrilamida y se separan por electroforesis (separación en un campo eléctrico). Luego de la electroforesis, el gel se transfiere sobre una membrana de transferencia, transfiriendo las proteínas separadas. Luego, el <i>blot</i> se sondea con anticuerpos policlonales anti- proteína recombinante de fusión fHbp. El anticuerpo secundario se agrega, seguido por una serie de pasos de lavado y la solución de desarrollo, que contiene el sustrato para la tinción basada en enzimas de las bandas de proteína específicas.</p> <p>Los Western Blots están cualitativamente evaluados por la comparación visual de las bandas para las hileras estándar, blanco y de muestra. La identidad de la proteína recombinante de fusión fHbp se confirma cuando una banda a la misma migración en la muestra de referencia es visible. Se verifican los criterios adecuados de idoneidad del sistema para confirmar la validez de la corrida analítica.</p>
<b>Consistencia a Farmacopeas</b>	No aplicable

  
**Novartis Argentina S.A.**  
 Dr. Lucio Jeroncio  
 Director Técnico  
 MN 14640

  
**Novartis Argentina**  
 Farm. Sergio Imirtzi  
 Gle. de Asuntos Regulatorios  
 Codirector Técnico - M.N.  
 Apoderado



**Figura 1: Proceso de Elaboración para la Proteína Recombinante de fusión NHBA**

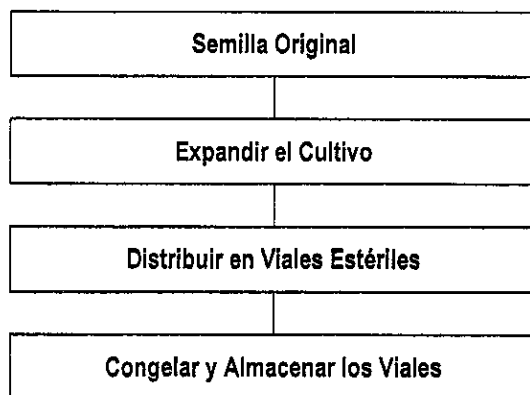


**2.3 Flujos del proceso de elaboración – Semilla Maestra y Semilla de Trabajo**

**2.3.1 Procedimiento de Elaboración para la Semilla Maestra**

A continuación en el diagrama de flujo, se proporcionan los detalles de la elaboración de la semilla maestra S816P9MS01.

**Figura 2. Procedimiento de Elaboración para Semillas Maestra**



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

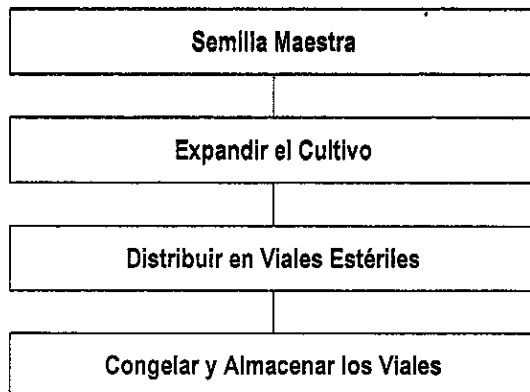
Novartis Argentina S.A.  
Farm. Sergio Imirtzian  
Gte. de Asuntos Regulatorios  
Directeur Técnico - M.N. 11521  
Apoderado



### 2.3.2 Procedimiento de Elaboración para la Semilla de Trabajo

Se proporciona a continuación un diagrama de flujo del proceso de elaboración utilizado para producir semillas de trabajo. La Semilla de Trabajo S816P10WS01 se preparó por el uso de este método.

**Figura 3. Procedimiento de Elaboración para la Semilla de Trabajo**



### Estabilidad Genética

Un estudio llevado a cabo por Sandoz ha verificado la integridad del plásmido de la cepa de producción en la escala de producción de 3000 l.

### 2.4 Control de Materiales

#### 2.4.1 Fuente-Historia-Semilla

El constructo genético utilizado para la expresión bacteriana de la proteína recombinante de fusión NHBA de *Neisseria meningitidis* se generó por tecnología estándar de ADN recombinante en células de *Escherichia coli* (*E. coli*) por el uso de un sistema de vector plásmido de expresión extracromosomal.

#### 2.4.2 Sistema de Banco de Semillas, Caracterización y Pruebas

Las existencias de semillas utilizadas para elaborar los lotes clínicos y los lotes para la campaña actual se elaboraron de acuerdo con los procedimientos estándar de operación (SOPs) bajo las Buenas Prácticas de Elaboración (GMP).

#### 2.4.3 Elaboración de Rutina

Las materias primas utilizadas en el proceso de elaboración de la proteína recombinante de fusión NHBA se adquieren por parte de Sandoz a proveedores aprobados. Una vez recibidas, las materias primas se almacenan y liberan de acuerdo con los procedimientos de operación estándares internos (SOP). Los procedimientos adecuados controlan el flujo de material ingresante a través del depósito de almacenamiento y cuarentena, aprobación de Control de Calidad, y su uso en los departamentos relevantes.

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

  
 Novartis Argentina S.A.  
 Pharm. Sergio Imirtzian  
 Director Técnico - M.N.: 11521  
 Аргентина



#### 2.4.4 Control de Materiales Fuente y Materiales de Inicio de Origen Biológico

No se utilizan materiales de inicio de origen animal o humano durante la preparación de la inoculación, fermentación, aislamiento, o purificación del ingrediente farmacéutico activo.

#### 2.4.5 Especificaciones

##### Especificaciones para la Semilla Maestra y la de Trabajo

Las especificaciones utilizadas para liberar las Semillas Maestra y de Trabajo y para controlar periódicamente estas semillas se enumeran en la Tabla 2 y Tabla 3, respectivamente.

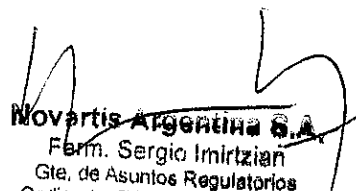
**Tabla 2 Especificaciones de la Semilla Maestra**

Prueba	Método de Análisis	Referencia	Liberación o Reprueba Periódica	Especificación
Identidad	Métodos bioquímicos	Interna	Liberación	Positiva
Identidad de Antígeno	Western Blot	Interna	Liberación Reprueba periódica	Positiva
Vitalidad (Recuento de colonias)	Métodos microbiológicos (Placas de agar)	Interna	Liberación Reprueba periódica	$\geq 10^8$ CFU/ml (Liberación) $\geq 10^6$ CFU/ml (Reprueba periódica)
Pureza	Métodos microbiológicos (Placas de agar)	Interna	Liberación Reprueba periódica	Ausencia de contaminantes
Estabilidad segregacional del plásmido <sup>1</sup>	Métodos microbiológicos (Placas de agar)	Interna	Liberación Reprueba periódica	$\leq 10\%$ Km -
Estabilidad estructural del plásmido	Métodos microbiológicos (Placas de agar)/ Electroforesis en gel	Interna	Liberación	Cumple con el estándar (Perfil de fragmento de ADN)
Secuencia del plásmido	Secuenciación de ADN	Interna	Liberación	Cumple con el estándar (Sin mutación de nucleótidos)
Número de copia del plásmido	Métodos microbiológicos (Placas de agar)/ Métodos bioquímicos	Interna	Liberación	Resultados del registro (número por bacteria)
Bacteriófagos	Métodos microbiológicos (Placas de agar)	Interna	Liberación	Cumple con el estándar (Ausencia de placas lífticas)
Vitalidad (Crecimiento confluyente)	Métodos microbiológicos (Placas de agar y coloración de Gram)	Interna	Reprueba periódica	Cumple (Crecimiento de <i>E. coli</i> sin contaminantes)

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

<sup>1</sup> El plásmido segregacional también es conocido como retención del plásmido

  
**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 3 Especificaciones de la Semilla de Trabajo**

Prueba	Método de Análisis	Referencia	Liberación o Reprueba Periódica	Especificación
Identidad	Métodos bioquímicos	Interna	Liberación	Positiva
Identidad de Antígeno	Western Blot	Interna	Liberación Reprueba periódica	Positiva
Vitalidad (Recuento de colonias)	Métodos microbiológicos (Placas de agar)	Interna	Liberación Reprueba periódica	≥ 10 <sup>8</sup> CFU/ml (Liberación) ≥ 10 <sup>6</sup> CFU/ml (Reprueba periódica)
Pureza	Métodos microbiológicos (Placas de agar)	Interna	Liberación Reprueba periódica	Ausencia de contaminantes
Número de copia del plásmido	Métodos microbiológicos (Placas de agar)/ Métodos bioquímicos	Interna	Liberación	Resultados del registro (number per bacterium)
Vitalidad (Crecimiento confluyente)	Métodos microbiológicos (Placas de agar y coloración de Gram)	Interna	Reprueba periódica	Crecimiento confluyente (Crecimiento de <i>E. coli</i> sin contaminantes)
Estabilidad segregacional del plásmido <sup>1</sup>	Métodos microbiológicos (Placas de agar)	Interna	Reprueba periódica	≤ 10% Km -

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

<sup>1</sup> El plásmido segregacional también es conocido como retención del plásmido

## 2.5 Controles de Pasos Críticos e Intermedios

### Especificaciones y Pruebas de Rutina Realizadas

Las pruebas realizadas sobre intermediarios durante la elaboración del principio activo, proteína recombinante de fusión NHBA, se proporcionan en la Tabla 4. Todas las pruebas se llevan a cabo por parte de Sandoz. Las pruebas especificadas como "información únicamente" se realizan para monitorear y/o ajustar el proceso y son necesarias para el cálculo de otros parámetros definidos.


**Tabla 4 Pruebas sobre Fases Intermedias para la Elaboración del Granel Concentrado de Proteína recombinante de fusión NHBA**

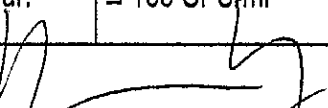
Prueba	Método de Análisis	Referencia	Especificación
<b>Inóculo</b>			
Prueba de contaminación microbiológica	Prueba de placa de agar	Interna	Sin contaminación
<b>Fermentación principal</b>			
Prueba de contaminación microbiológica	Prueba de placa de agar	Novartis Argentina S.A. Fárm. Sergio Imizian Gte. de Asuntos Regulatorios Codirector Técnico - M.N. 11521 Apoderado	Sin contaminación

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



Contenido de Proteínas	SDS-PAGE	Interna	≥ 0,30 g/L	
<b>Homogeneización y solubilización</b>				
Pureza	SDS-PAGE	Interna	Para el cálculo del rendimiento del paso	
Contenido de Proteínas	Valoración de Proteínas Totales BCA	Interna	Para el cálculo de la carga de la columna y del rendimiento del paso	
<b>Cromatografía I</b>				
Pureza	SDS-PAGE	Interna	≥ 20%	
Contenido de Proteínas	Valoración de Proteínas Totales BCA	Interna	Para el cálculo de la carga de la columna y del rendimiento del paso	
Biocarga	Método de filtración de membrana	Ph. Eur.	≤ 100 CFU/ml	
Endotoxina	Prueba cromogénica cinética	Ph. Eur./USP	Para información únicamente	
<b>Cromatografía II</b>				
Fracciones	Pureza	SDS-PAGE	Interna	≥ 80%
	Contenido de Proteínas	Valoración de Proteínas Totales BCA	Interna	Para información únicamente
Acervo	Pureza	SDS-PAGE	Interna	Para el cálculo del rendimiento del paso
	Pureza	SE-HPLC	Interna	Para información únicamente
	Contenido de Proteínas	Valoración de Proteínas Totales BCA	Interna	Para el cálculo de la carga de la membrana y del rendimiento del paso
	Biocarga	Método de filtración de membrana	Ph. Eur.	≤ 100 CFU/ml
	Endotoxina	Prueba cromogénica cinética	Ph. Eur./USP	Para información únicamente
<b>Ultrafiltración/diafiltración I</b>				
Pureza	SDS-PAGE	Interna	Para el cálculo del rendimiento del paso	
Pureza	SE-HPLC	Interna	Para información únicamente	
Contenido de Proteínas	Valoración de Proteínas Totales BCA	Interna	Para el cálculo de la carga de la columna y del rendimiento del paso	
Biocarga	Método de filtración de membrana	Ph. Eur.	≤ 100 CFU/ml	

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

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



Endotoxina	Prueba cromogénica cinética	Ph. Eur./USP	Para información únicamente
<b>Cromatografía III</b>			
Pureza	SDS-PAGE	Interna	≥ 90%
Pureza	SE-HPLC	Interna	Para información únicamente
Contenido de Proteínas	Valoración de Proteínas Totales BCA	Interna	Para el cálculo del rendimiento del paso
Biocarga	Método de filtración de membrana	Ph. Eur.	≤ 100 CFU/ml
Endotoxina	Prueba cromogénica cinética	Ph. Eur./USP	Para información únicamente
<b>Ultrafiltración/diafiltración II</b>			
Pureza	SDS-PAGE	Interna	Para información únicamente
Pureza	SE-HPLC	Interna	Para información únicamente
Contenido de Proteínas	Valoración de Proteínas Totales BCA	Interna	500-1100 µg/ml
Biocarga	Método de filtración de membrana	Ph. Eur.	≤ 100 CFU/ml
Endotoxina	Prueba cromogénica cinética	Ph. Eur./USP	Para información únicamente

BCA: Ácido Bicinconínico; CFU: Unidades de Formación de Colonias; IU: Unidades Internacionales; Ph. Eur.: Farmacopea Europea; 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

## 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

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

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



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 e 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 todas las lotes utilizadas 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 de fusión NHBA. Las impurezas relacionadas con los procesos exógenos incluyen, pero sin limitación, Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosida (IPTG), polipropilenglicol (PPG). Las cinco impurezas se evaluaron en una validación de la depuración llevada a cabo para la proteína recombinante de fusión NHBA para demostrar la capacidad y consistencia del proceso en la eliminación de estas impurezas.

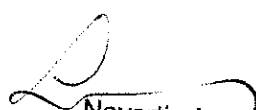
Todos los criterios de aceptación de la depuración se cumplieron para las cinco impurezas. Para ADN, PPG, e IPTG, la impureza se eliminó tan eficientemente por el proceso que estas pruebas no se llevarán a cabo en lotes futuros en los pasos intermedios y del granel concentrado. Si bien las impurezas 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.

### **Vida Útil de la Resina**

Para apoyar la reutilización de columnas de cromatografía para operaciones múltiples, se llevó a cabo una validación de la reutilización de resina concurrente. Las operaciones de cromatografía llevadas a cabo con sus resinas respectivas no influyeron negativamente los parámetros relacionados con la resina tales como rendimiento del paso, pureza, volumen de los acervos respectivos, y agotamiento de ADN o HCP. Todos los límites requeridos se satisficieron y todas los lotes pasaron las especificaciones finales del granel concentrado.



Novartis Argentina S.A.  
Dr. Lucio Jeroncio  
Director Técnico  
MN 14846



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



### Vida Útil de la Membrana

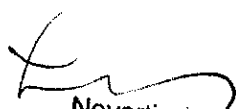
Las membranas utilizadas para los pasos de filtración UF/DF se reutilizan durante cada campaña para la elaboración a granel de la proteína recombinante de fusión NHBA. El desempeño de las membranas se comprueba antes de cada lote y se compara con nuevas membranas por una prueba neta de permeabilidad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

### Validación del Transporte

El granel concentrado de la proteína recombinante de fusión NHBA se 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 Vacunas y Diagnósticos, 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 camión. Para confirmar que el granel con control de temperatura se mantenga a  $\leq -15^{\circ}\text{C}$  (punto de inicio

$-20^{\circ}\text{C}$ ) durante el transporte, se llevó a cabo una validación del traslado.

Una ruta representativa se seleccionó como representativa de 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 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  
Codirector Técnico - M.N. 11621  
Apoderado

