

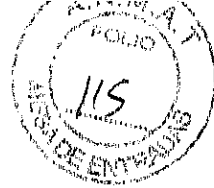


	<p>de todas las áreas pico asignadas a sustancias e impurezas relacionadas con el producto de la proteína recombinante de fusión NHBA y la proteína recombinante de fusión NHBA. Se hace notar que los picos fuera de los intervalos de azul dextrano y NaN<sub>3</sub> no se utilizan para integración. La identidad se confirma por la comparación de tiempos de retención de muestras con el estándar de referencia de MenB proteína recombinante de fusión NHBA. Se verifican criterios adecuados de idoneidad del sistema para confirmar la validez de la corrida analítica.</p> <p><b>Valoración de Novartis, para estabilidad del granel concentrado:</b></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 un tampón de fosfato de potasio y sulfato de sodio y se utiliza para la determinación de la eficiencia de la columna. Se analizan muestras de prueba no diluidas.</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 la proteína recombinante de fusión NHBA, 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 del granel concentrado probada. 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). Peak integration is performed by the Empower system (or equivalent).</p> <p>La pureza se determina por la evaluación del área pico porcentual del pico principal asignada a la proteína recombinante de fusión NHBA con respecto a la totalidad de las áreas de pico asignadas a sustancias e impurezas relacionadas con el producto de la proteína recombinante de fusión NHBA y la proteína recombinante de fusión NHBA. Se hace notar que los picos fuera de los intervalos de azul dextrano y NaN<sub>3</sub> 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 de fusión NHBA. Se verifican criterios adecuados de idoneidad del sistema para confirmar la validez de la corrida analítica.</p>
<p><b>Consistencia a Farmacopeas</b></p>	<p>No aplicable</p>

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

Novartis Argentina S.A.  
 Farm. Sergio Imirtzian  
 Gte. de Asuntos Regulatorios  
 Codirector Técnico - M.N. 17521  
 Apoderado





### 3.3 Justificación de las especificaciones

La justificación de las especificaciones para la elaboración del Granel Concentrado para la proteína recombinante de fusión NHBA se proporcionan a continuación.

Prueba	Método de Análisis	Especificación	Justificación de Especificaciones
Pureza	SDS-PAGE	≥ 90%	<p>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 se ajusta con base en la experiencia clínica y de producción por el uso de los 20 lotes producidos en Sandoz en 2007-2010. Con base en los lotes analizados, los valores de pureza por SDS-PAGE oscilaron de 91-98% y, por lo tanto, la especificación final se ajustó a ≥ 90%.</p>
Pureza	SE-HPLC	≥ 70%	<p>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 que podrían no observarse por el uso de SDS-PAGE.</p> <p>La presencia de una pequeña fracción de formas agregadas en el perfil de elución de todos los principios activos de proteína recombinante de fusión NHBA producidos hasta aquí y probada en investigaciones preclínicas y clínicas no se considera portadora de un impacto negativo sobre la calidad ni sobre la seguridad de la vacuna final formulada. La Compañía considera estas sustancias variantes relacionadas con productos y ha conducido estudios funcionales <i>in vivo</i> y de caracterización para probar que estas formas fuesen seguras e inmunogénicas.</p> <p>Como parte del trabajo para confirmar la seguridad e inmunogeneidad, ambas proteínas recombinante de fusión NHBA agregadas y monoméricas se aislaron y analizaron por el uso de valoraciones funcionales físico-químicas e <i>in vivo</i>; se ha demostrado a través de las respuestas que no son estadísticamente diferentes. Dado que la especificación refleja la contribución de las especies relacionadas con productos que han demostrado ser comparables a partir de un punto de vista inmunológico, la especificación se ha ajustado a at ≥ 70%, con la comprensión de que la contribución principal a la proteína recombinante de fusión NHBA no nativa surge de las formas agregadas de la</p>



			proteína que han demostrado ser funcionalmente equivalentes.
Impurezas inespecíficas		≤ 9%	En base a la evaluación de los datos de los lotes producidos en Sandoz entre 2007 y 2010, se propone un límite de ≤ 9% para los picos distintos al pico principal de la proteína recombinante de fusión NHBA, Agregado 1 proteína recombinante de fusión NHBA y Agregado 2 proteína recombinante de fusión NHBA, y se implementará a partir de la campaña 2013.
Contenido de Proteínas	Valoración de Proteínas Totales BCA	500-1100 µg/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 500 µg/ml se ha ajustado para asegurar que la conductividad que surge de la formulación del Granel Concentrado de proteína recombinante de fusión NHBA no afecte las interacciones antígeno-adyuvante durante la formulación del medicamento. Si bien se ha demostrado que los oligómeros de la proteína recombinante de fusión NHBA son comparables desde un punto de vista inmunológico, la especificación mayor de 1100 µg/ml se mantiene para asegurar un perfil de estabilidad aceptable de la proteína recombinante de fusión NHBA durante el almacenamiento del Granel Concentrado.
Identidad	Western Blot	Positiva	El Western blot es una prueba altamente sensible y específica que cuenta con la capacidad confirmar la identidad y el peso molecular de la proteína recombinante de fusión NHBA. La especificidad combinada conferida por el reconocimiento de anticuerpos y el 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	≤ 50 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 ≤ 50 ppm se basa en los resultados de diez lotes de la proteína recombinante de fusión NHBA elaboradas entre 2007 y 2010.
Osmolaridad	Osmometría/ punto de	600-750 mOsm/kg	La osmolaridad se utiliza para asegurar que el Granel Concentrado contenga el nivel adecuado de sacarosa dado

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



	congelamiento		<p>que la sacarosa se utiliza como un crioprotector durante almacenamiento a largo plazo a -20°C.</p> <p>El uso de sacarosa 1-10% como un crioprotector durante la liofilización es un método ampliamente conocido y frecuentemente utilizado de a estabilización de soluciones congeladas que contienen proteínas. Se ha establecido una especificación de 600-750 mOsm/kg con base en la experiencia clínica y de producción dado que una concentración de sacarosa 10% representa el rango superior típicamente utilizado para la estabilización de proteínas durante el congelamiento.</p>
Endotoxina/ Proteína	Prueba cromogénica cinética/cálculo	≤ 0,16 IU/μg	<p>El límite de especificación de ≤ 0,16 IU/μg de proteína se deriva del límite de Ph.Eur./USP de un total de 25 IU por dosis de vacuna, tomando en cuenta que una dosis de la vacuna Bexsero contiene 150 μg totales de proteína.</p>
Biocarga	Filtración de membrana	≤ 10 CFU/100 ml	<p>Un nuevo límite de biocarga para el antígeno de la proteína recombinante de fusión NHBA se aplicará luego de la campaña de elaboración del granel de proteína recombinante de 2010; el límite de ≤ 25 CFU/100 ml se reducirá a ≤10 CFU/100 ml.</p> <p>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).</p>
pH	Potenciometría	6,5-7,5	<p>Se ha demostrado que la formulación corriente para el Granel Concentrado de la proteína recombinante de fusión NHBA confieren estabilidad adecuada cuando se almacena a -20°C ± 5°C o a -70°C ± 10°C durante hasta el final de la vida útil.</p> <p>La especificación del pH se diseña para demostrar que la operación final de la unidad de ultrafiltración/diafiltración intercambié exitosamente la proteína recombinante de fusión NHBA en un sistema de tampón donde se ha demostrado la estabilidad del Granel Concentrado.</p>
Conductividad	Potenciometría	11.000-14.500 μS/cm	<p>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 de fusión NHBA se ha intercambiado por tampón en la formulación donde se ha demostrado la estabilidad del Granel Concentrado.</p>

BCA: Ácido Bicinconínico; CFU: Unidades de Formación de Colonias; E. coli: Escherichia coli; ELISA: Valoración Inmunoabsorbente Vinculada con Enzimas; HCP: Proteína de las Células Huésped; IU: Unidades

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

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



Internacionales;  $\mu$ S: 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-pollacrilamida; USP: Farmacopea de los Estados Unidos.

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

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



**4) VALIDACIÓN PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS**

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

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

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

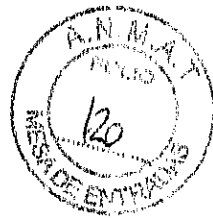


**Tabla 18 Resultados de Validación para Biocarga (Valoración de Sandoz)**

Parámetro Probado	Descripción de la Prueba de la 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 recuperación porcentual osciló de 80-114% para los tres lotes del Granel Concentrado probados.
Inhibición de microorganismos bacterianos y fúngicos para pasos intermedios (soluciones de proceso)		La tasa de recuperación de microorganismos utilizada para la validación en comparación con el recuento microbiano de referencia debe ser $\pm 50\%$ (50-150%).	Las recuperaciones porcentuales promedio para los tres lotes oscilaron de 85-113%, 87-109%, 85-114%, 93-106%, y 88-109%, para UF/DF 1 y 2, Cromatografía III, Cromatografía II, y Cromatografía I, respectivamente, para los tres lotes intermedios probados.

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

Novartis Argentina S.A.  
Farm. Sergio Imizian  
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	<p>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>, <i>Bacillus cereus</i>, <i>Micrococcus luteus</i>, y <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>. Una cantidad conocida de cada microorganismo se enriquece en muestra de ensayo de tres lotes de 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.</p>	<p>La tasa de recuperación de microorganismos utilizada para la validación debe ser de al menos 70% en comparación con el Control Positivo.</p>	<p>La recuperación porcentual osciló de 77-136% para los tres lotes de Granel Concentrado probados.</p>

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

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





**Tabla 20 Validación de Conductividad**

Validación de Conductividad	
Parámetro Probado	Validación de Conductividad
No aplicable	La prueba de conductividad se lleva a cabo como para Ph. Eur. Capítulo 2.2.38 Conductividad y USP <645> Conductividad en Agua. Dado que el método de prueba es del compendio y la conductividad es un atributo inherente, no se requiere ni se lleva a cabo validación específica del producto, como para Sandoz SOP interno, <i>Validación de Métodos Analíticos para Biofarmacéuticos.</i>

**Tabla 21 Resultados para la Verificación del Método para Endotoxina (Valoración de Sandoz)**

Parámetro Probado	Descripción de la Prueba de Validación	Acceptance Criteria	Resultados
Inhibición/Mejora para el Granel Concentrado	La inhibición y mejora se evaluaron en tres lotes de Granel Concentrado y matrices de muestra de tres lotes de muestras intermedias de proceso de Cromatografía I y II. Tres diluciones de cada muestra probada por cuadruplicado se enriquecieron con 0,5 EU/ml de endotoxina y se compararon con muestras no enriquecidas contra una curva estándar. Se calculó la recuperación de muestras enriquecidas.	La recuperación porcentual de muestras del Granel Concentrado enriquecidas con 0,5 EU/ml de endotoxina debe caer entre 50-200%.	La recuperación porcentual osciló de 114-122%, 109-119%, y 115-131%, para los Lotes 36443501, 36443502, y 36443503, respectivamente.
Inhibición/Mejora para Pasos Intermedios (Soluciones de Proceso)			La recuperación porcentual osciló de 104-134% para Cromatografía I y 94-163% para Cromatografía II para los tres lotes probados.

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

EU: Unidades de endotoxina





**Tabla 22 Resultados de Validación para Endotoxina (Valoración de Novartis)**

Parámetros Probados	Descripción de la Prueba de Validación	Criterios de Aceptación de la Validación	Resultados de la Validación
Repetibilidad	Tres lotes de Granel Concentrado se probaron por triplicado por dos operadores. Las muestras se enriquecieron con 0,5 IU/ml de endotoxina y se compararon con muestras no enriquecidas contra una curva estándar de diez puntos. Se calculó la recuperación de muestras enriquecidas.	CV % < 20% para cada operador, para cada placa, para cada lote.	<ul style="list-style-type: none"> <li>CV % para Operador 1 = 6,3% y 1,3% para Placas 1 y 2 para el Lote RS21-03-01, 2,1% y 6,7% para Placas 1 y 2 para el Lote RS21-03-02, y 3,1% y 1,7% para Placas 1 y 2 para el Lote TRFASEII</li> <li>CV % para Operador 2 = 2,3% y 3,0% para Placas 1 y 2 para el Lote RS21-03-01, 2,4% y 5,7% para Placas 1 y 2 para el Lote RS21-03-02, y 2,6% y 2,7% para Placas 1 y 2 para el Lote TRFASEIIO</li> </ul>
Precisión de Intermediarios	Tres lotes del Granel Concentrado se probaron por triplicado por dos operadores. Las muestras se enriquecieron con 0,5 IU/ml de endotoxina y se compararon con muestras no enriquecidas contra una curva estándar de diez puntos. Se calculó la	CV % <25% para resultados combinados por dos operadores.	El CV% combinado fue 9,9%, 12,0%, y 7,0%, para los Lotes RS21-03-01, RS21-03-02, y TRFASEII02, respectivamente.

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



