

Tabla 53 Resultados del Estudio de Estabilidad Acelerada para los Lotes 36439702, 36439703, y 36439704 del Granel Concentrado de la proteína recombinante de fusión NHBA, cuando se almacenan a 5°C ± 3°C

Prueba de Estabilidad	Especificación	Lote Nº	Tiempo de almacenamiento (en meses)				
			Tiempo Cero (T0)	Inicio del Estudio	0,25 (7 días)	0,5 (15 días)	1 (30 días)
Pureza (SDS-PAGE)	≥ 90%	36439702	97	95	96	96	97
		36439703	98	95	97	97	98
		36439704	97	96	97	97	98
Pureza ¹ (SEC-HPLC)	≥ 65%	36439702	82	83	81	86	79
		36439703	81	84	81	85	82
		36439704	79	83	80	83	80
Contenido de Proteína BCA	500-1100 µg/ml	36439702	755	768	724	774	819
		36439703	687	743	739	763	728
		36439704	690	758	733	781	718
pH	6,5-7,5	36439702	7,0	6,8	7,1	7,1	7,1
		36439703	7,0	7,1	7,1	7,0	7,1
		36439704	7,1	6,8	6,6	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 4-5 meses de edad. Las muestras se almacenaron a -20°C ± 5°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; TBD = A determinar; la prueba se programa para un punto de tiempo futuro.

¹ 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.

Novartis Argentina S.A.
Dr. Lucio J. Jancic
Director Técnico
MN 14840

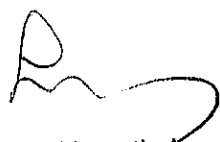
Novartis Argentina S.A.
Farm. Sergio Imirtzian
Gte. de Asuntos Regulatorios
Codirector Técnico - M.N. 11521
Apoderado





Conclusión

Se generaron datos satisfactorios a través de 48 meses para el granel concentrado de la proteína recombinante de fusión NHBA cuando se almacenaron a $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ o a $-70^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$. Además, el almacenamiento a $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ durante hasta un mes no impactó en la estabilidad del granel.



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. 11521
Apoderado

PRINCIPIO ACTIVO

Proteína Recombinante de Fusión fHbp

1) INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 Caracterización

1.1.2 Elucidación de la Estructura y otras Características

La proteína recombinante de fusión fHbp (proteína 936-741) es un producto de proteína de fusión de 936 y 741 (Proteína de Unión al Factor H o fHBP). La proteína 741 es el componente antigénico principal mientras que 936 es una proteína accesoria que aumenta la inmunogenicidad de su contraparte fusionada. En la naturaleza, la Proteína de Unión al Factor H (741) se expresa ampliamente sobre la superficie celular de *Neisseria meningitidis* (*N. meningitidis*) y se une al factor H humano, un inhibidor de 150 kDa de la vía de complemento alternativa (un componente innato de la defensa natural del sistema inmune contra una infección que no está mediada por las células B o T). La unión del factor H aumenta la capacidad de *N. meningitidis* de resistir el asesinato mediado por complementos, proporcionando así una estrategia efectiva para evadir los mecanismos de defensa del huésped (Madico et al., 2006; Seib et al., 2009). Los anticuerpos dirigidos contra fHBP pueden mediar la actividad bactericida del suero (por ej., la bacteriolisis directa a través de la vía clásica de complemento) pero también puede bloquear la unión de fH aumentando la susceptibilidad de asesinato por la vía de complemento alternativa (Feavers and Pizza, 2009).

La Proteína 936 está derivada de la Cepa 2996 del serogrupo B de *N. meningitidis* y la Proteína 741 está derivada de la Cepa MC58 del serogrupo B. Las Proteínas 936 y 741 también se identifican en la literatura como Antígenos GNA2091 (o NMB2091) y GNA1870 (o NMB1870) derivados de Genomas, respectivamente, con base en la minería de genomas o el enfoque de vacunología inversa (Giuliani et al., 2006). La proteína de fusión se expresa vía fermentación bacteriana por métodos de tecnología estándares de ADN recombinante en *Escherichia coli* (*E. coli*) por el uso de un sistema de vector de plásmidos, de acuerdo con lo brevemente descrito a continuación.

La proteína recombinante de fusión fHbp está compuesta por 26-202 Aminoácidos de Antígeno 936 y por 23-274 Aminoácidos de Antígeno 741, donde las dos proteínas están vinculadas por dos aminoácidos. El género de fusión se clonó en el Vector de Expresión pET-24b(+). El clon resultante, 936-741-K, se introdujo posteriormente en la cepa BL21(DE3) de *E. coli*, donde la expresión de la proteína recombinante de fusión fHbp se indujo por IPTG (Isopropil- β -D-tiogalactopiranosida).

La proteína de fusión se cosecha vía centrifugación, se filtra, y purifica a través de un serie de columnas cromatográficas. Los pasos de purificación eliminan la mayoría de las proteínas de células huésped de *E. coli*. Además, los pasos cromatográficos dan lugar a una reducción en el nivel de endotoxinas. Luego de los pasos de purificación de columna, el granel resultante se somete a

diafiltración seguido por un paso de filtración de 0,2 µm. El granel concentrado se almacena a ≤ -15°C.

Propiedades de la Proteína

La secuencia de aminoácidos predicha a partir de la secuencia de nucleótidos conocida para la proteína recombinante de fusión fHbp da cuenta de una cadena de polipéptidos de 434 aminoácidos con un punto isoeléctrico teórico (pI) de 5.1.

El principio activo, proteína recombinante de fusión fHbp, purificado tiene un peso molecular teórico (PM) de 46,253 Da con base en la secuencia de aminoácidos derivada a partir de los cálculos por el servidor de Proteómicas del Sistema de Análisis Experto (Expasy). La masa molecular promedio de 46 kDa se confirmó por el análisis de masa ESI-q-Tof.

El análisis SDS-PAGE bajo condiciones de reducción, utilizado para determinar la pureza de la proteína recombinante de fusión fHbp en el granel, ha confirmado la presencia de una banda de polipéptido simple con un PM aparente de aproximadamente 45 kDa.

Niveles de Estructura de la Proteína

Se evaluaron las estructuras principal, secundarias, terciarias, y cuaternarias del principio activo 287-953. La secuencia de aminoácidos fue confirmada por digestión enzimática y S-carboximetilación (RPC) bajo condiciones de reducción, seguido por cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (RP-HPLC) - espectroscopía de masas ESI q- TOF. Las estructuras secundarias y terciarias fueron confirmadas por dicroísmo circular y fluorescencia. La estructura cuaternaria se evaluó por Cromatografía líquida de alto rendimiento-Dispersión de Luz Láser de Ángulos Múltiples con Exclusión de Tamaño (SEC HPLC), que confirmó que el peso molecular lote a lote y el radio hidrodinámico eran consistentes.

Características Físico-químicas

El principio activo purificado en solución de tampón es un líquido claro incoloro, esencialmente libre de partículas visibles.

Características Biológicas e Inmunológicas

Los estudios de caracterización biológica e inmunológica se sintetizan en la siguiente tabla.

Tabla 1 Estudios de Caracterización Biológica e Inmunológica

Descripción del Estudio	Referencia
Función de la Proteína de Unión al Factor H (Antígeno 741) expresada sobre la superficie celular de <i>N. meningitidis</i> en la inhibición de la vía de complemento alternativo humana.	Feavers and Pizza, 2009
Producción de anticuerpo bactericida contra 741 en ratas infantiles	Massignani et al., 2003
Producción de anticuerpo bactericida contra 741 en sujetos humanos.	Giuliani et al., 2010
Estudio de variabilidad genética en el extremo terminal C de 741 meningocócica natural.	Giuliani et al., 2005
Análisis RMN de un epítipo inmunodominante.	Cantini et al., 2006
Estudio de unión de 741 a fH en presencia de complemento.	Madico et al., 2006

1.1.3 Impurezas

Impurezas relacionadas con el Proceso

Impurezas relacionadas con el Proceso Endógeno

Las impurezas relacionadas con el proceso endógeno incluyen ADN, proteínas de las células huésped (HCP), y endotoxina. La depuración de las tres impurezas se tomó en cuenta en la validación del proceso, donde el control de impurezas se demostró en pasos intermedios y en el nivel de granel concentrado.

Impurezas relacionadas con el Proceso Exógeno

Las impurezas relacionadas con el proceso exógeno incluyen Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosida (IPTG), polipropilén glicol (PPG), y kanamicina. IPTG y PPG se tomaron en cuenta en la validación de depuración para la proteína recombinante de fusión fHbp. Se llevó a cabo un cálculo del peor escenario de la cantidad de impureza de kanamicina relacionada con el proceso exógeno potencialmente presente en la formulación final y se determinó que era de 0,75 μ g/dosis. En este cálculo se supuso una mayor concentración de cada antígeno que la planeada. Una evaluación toxicológica, llevada a cabo para evaluar el riesgo de la exposición de infantes a kanamicina por vacunación, indicó que no existen problemas de seguridad asociados con 0,75 μ g de kanamicina por dosis. La cantidad esperada de kanamicina en una dosis simple en concentraciones propuestas de antígeno sería de aproximadamente 0,004 μ g.



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

2) PROCESO DE PRODUCCIÓN

2.1 Elaborador

Nombre y Domicilio	Responsabilidad
Novartis Vaccines and Diagnostics S.r.l. Bellaria-Rosia 53018 Sovicille Italia (Rosia)	Elaboración, almacenamiento, y pruebas de control de calidad de las Semillas Maestra y de Trabajo Pruebas de control de calidad Liberación de lote del granel concentrado de la proteína recombinante de fusión fHbp
Novartis Vaccines and Diagnostics S.r.l. Via Fiorentina, 1 53100 Siena Italia (Siena)	Almacenamiento (copias) y pruebas control de calidad de las Semillas Maestra y de Trabajo Pruebas de control de calidad
Sandoz GmbH Biochemiestraße 10 A-6250 Kundl Austria (Kundl)	Fermentación, cosechado, y purificación de la proteína recombinante de fusión fHbp Pruebas de control de calidad

2.2 Descripción del proceso de elaboración y controles del proceso

Proceso de Fermentación

La producción se basa en un sistema de lote de semillas. Se utilizan semillas de trabajo de *E. coli* BL21(DE3) 936-741-K (que contienen el plásmido codificante para la proteína recombinante de fusión fHbp) para preparar un inóculo. Durante el paso de fermentación, se expanden las células de *E. coli*, la proteína recombinante se expresa intracelularmente (luego de la adición de isopropil- β -D-tiogalactopiranosido), y se cosecha. Un lote de fermentación se define como el producto de una operación de fermentación simple hasta la cosecha. Un diagrama de flujo detallado del proceso de fermentación, con controles de parámetros y en-proceso identificados, se proporciona en la Figura 1.

Proceso de Aislamiento

Una vez cosechado el caldo, las bacterias se separan del sobrenadante vía centrifugación. El sobrenadante se descarga y con el fin de aislar la proteína recombinante se homogeneiza la pasta celular resultante. Luego de la homogeneización el material se centrifuga y se aplica a una cromatografía en columna. Un diagrama de flujo detallado del proceso de aislamiento, con los parámetros controlados y controles en proceso identificados, se proporciona en la Figura 2.



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



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

