

Figura 3 Flujo de Proceso de Purificación de la proteína recombinante de fusión fHbp

Parámetros Controlados	Proceso	Controles En-Proceso
Parámetros: Temperatura: 15-25°C Flujo through: : ≤ 150 cm/h	Cromatografía de Intercambio Aniónico AEX-No-Adsorbido (AEX.NA) Almacenado: ≤ 5 días a 5 ± 3°C	Pureza mediante SDS-PAGE Pureza mediante SE-HPLC Contenido de Proteína por BCA Carga biológica Endotoxinas
Parámetros: Temperatura: 15-25°C Tasa de flujo: ≤ 150 cm/h	Cromatografía de Interacción Hidrofóbica (HIC) Eluato HIC- (HIC.E) Almacenado: ≤ 5 días a 5 ± 3°C	Pureza por RP-HPLC Contenido de Proteína por RP-HPLC Carga biológica Endotoxina
Parámetros: Temperatura: 15-25°C Presión Transmembrana: > 1,0 bar	Ultrafiltración/Diafiltración (UF/DF) Diarretentato (DR) Almacenado: ≤ 5 días a 5 ± 3°C	Pureza por RP-HPLC Contenido de Proteína por RP-HPLC Carga biológica Endotoxina
Parámetros: Temperatura: 15-25°C	Llenado y Almacenamiento filtración por 0,2 µm Granel concentrado de proteína recombinante de fusión fHbp Almacenado: ≤ -15°C	Pureza mediante SDS-PAGE Pureza mediante SE-HPLC Contenido de Proteína por BCA Identidad por Western Blot HCP por ELISA Osmolalidad Endotoxinas Carga biológica Conductividad pH



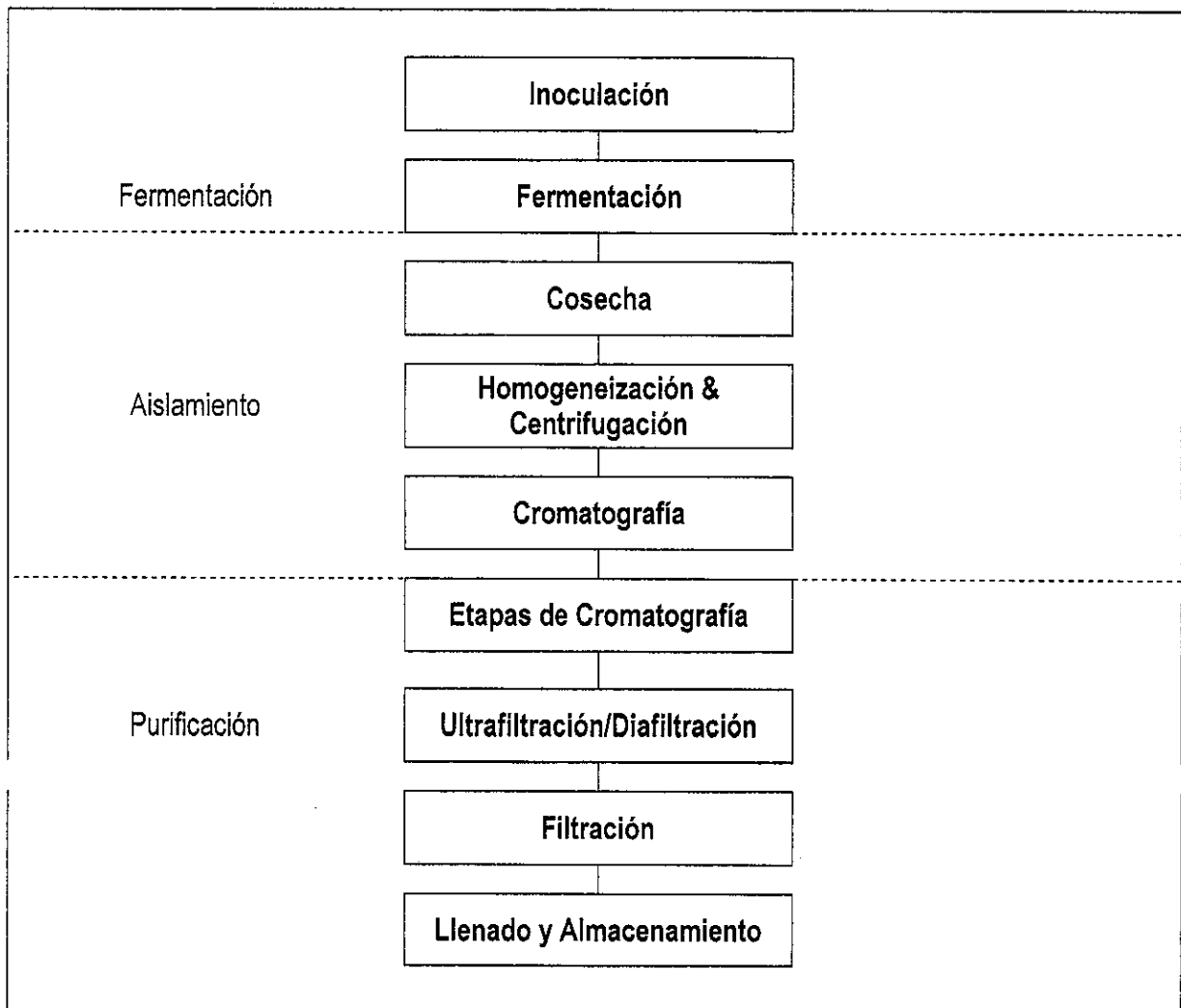
Novartis Argentina S.A.
 Dr. Lucio Jeroncio
 Director Técnico
 MN 14840



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

A continuación, se proporciona un flujograma de la producción del granel concentrado de la proteína recombinante de fusión fHbp en la Figura 4.

Figura 4 Descripción General del Proceso de Elaboración para la proteína recombinante de fusión fHbp




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

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

2.3.1 Procedimiento de Elaboración para la Semilla Maestra

Un diagrama de flujo del proceso de elaboración utilizado para producir semillas Maestra se proporciona en la Figura 5. La semilla Maestra S815P9MS01 (50 viales) fue preparada utilizando este método.

Figura 5 Procedimiento de Elaboración para Semillas Maestra

Parámetros Controlados	Proceso	Controles En-Proceso
	Semilla Parental (2 viales)	
Temp. de Incubación: 35-37°C Agitación: 250 rpm	Inoculación de 2 Botellas x 1 l conteniendo medio LB-PTK (200 ml) y solución de kanamicina 1% (0,6 ml) (cada botella inoculada con 0,5 ml de suspensión bacteriana)	Coloración de Gram (Pureza de Cultivo confirmada) Densidad Óptica (1,0-1,5) Las botellas que fallan en pureza se descartan.
Temp. de Incubación: 35-37°C Agitación: 250 rpm	Inoculación de 2 Botellas x 5 l conteniendo medio LB-PTK (1500 ml) y solución de kanamicina 1% (4,5 ml) (cada botella inoculada con 50 ml de suspensión bacteriana)	Coloración de Gram (Pureza de Cultivo confirmada) Densidad Óptica (2,0-2,5) Recuento de Colonias (Resultado de Registro) Las botellas que fallan en pureza se descartan.
Agitación	Seleccionar una botella de 5 l Agregar glicerol estéril (150 ml)	Las botellas se eligen en base a su densidad óptica más alta ¹
Agitación	Distribución en viales estériles desechables (aproximadamente 1 ml por vial)	
	Rotulado	
	Congelación (-70/-90°C)	Pruebas de liberación
	Transferencia de viales de Semilla Maestra a Congelador de Nitrógeno Líquido para almacenamiento a largo plazo	

¹ criterio de aceptación agregado en 2011

2.3.2 Procedimiento de Elaboración para la Semilla de Trabajo

Un diagrama de flujo del proceso de elaboración utilizado para producir semillas de Trabajo se proporciona en la Figura 6. La Semilla de Trabajo S815P10WS01 (300 viales) se preparó utilizando este método.

Figura 6 Procedimiento de Elaboración para la Semilla de Trabajo

Parámetros Controlados	Proceso	Controles En-Proceso
	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: 0 auto;"> Semilla Maestra (2 viales) </div>	
Temp. Incubación: 35-37°C Agitación: 250 rpm	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: 0 auto;"> Inoculación de 2 Botellas x 1 l conteniendo medio LB-PTK (200 ml) y solución de kanamicina 1% (0,6 ml) (cada botella inoculada con 1 ml de suspensión bacteriana) </div>	Coloración de Gram (Pureza de Cultivo confirmada) Densidad Óptica (1,0-1,5) Las botellas que fallan en pureza se descartan.
Temp. Incubación: 35-37°C Agitación: 250 rpm	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: 0 auto;"> Inoculación de 2 Botellas x 5 l conteniendo medio LB-PTK (1500 ml) y solución de kanamicina 1% (4,5 ml) (cada botella inoculada con 50 ml de suspensión bacteriana) </div>	Coloración de Gram (Pureza de Cultivo confirmada) Densidad Óptica (2,0-2,5) Recuento de Colonias (Registrar resultados) Las botellas que fallan en pureza se descartan.
Agitación	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: 0 auto;"> Seleccionar una botella de 5 l Agregar glicerol estéril (150 ml) </div>	Las botellas se eligen en base a su densidad óptica más alta. ¹
Agitación	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: 0 auto;"> Distribución en viales estériles desechables (aproximadamente 3 ml por vial) </div>	
	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: 0 auto;"> Rotulado </div>	
	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: 0 auto;"> Congelación (-70/-90°C) </div>	Pruebas de liberación
	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: 0 auto;"> Transferencia de viales de Semilla De Trabajo a Congelador a -80±10°C para almacenamiento a largo plazo </div>	

¹Criterio de aceptación agregado en 2011

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. Las células al final de la producción se analizaron para la integridad del plásmido. Todas las secuencias de nucleótidos evaluadas exhiben 100% de identidad con la secuencia esperada del cassette de expresión para la proteína recombinante de fusión fHbp. Estos resultados demuestran que la estabilidad genética de la cepa de producción se mantiene todo a lo largo de la ampliación de cultivo a la escala de producción de 3000 litros.

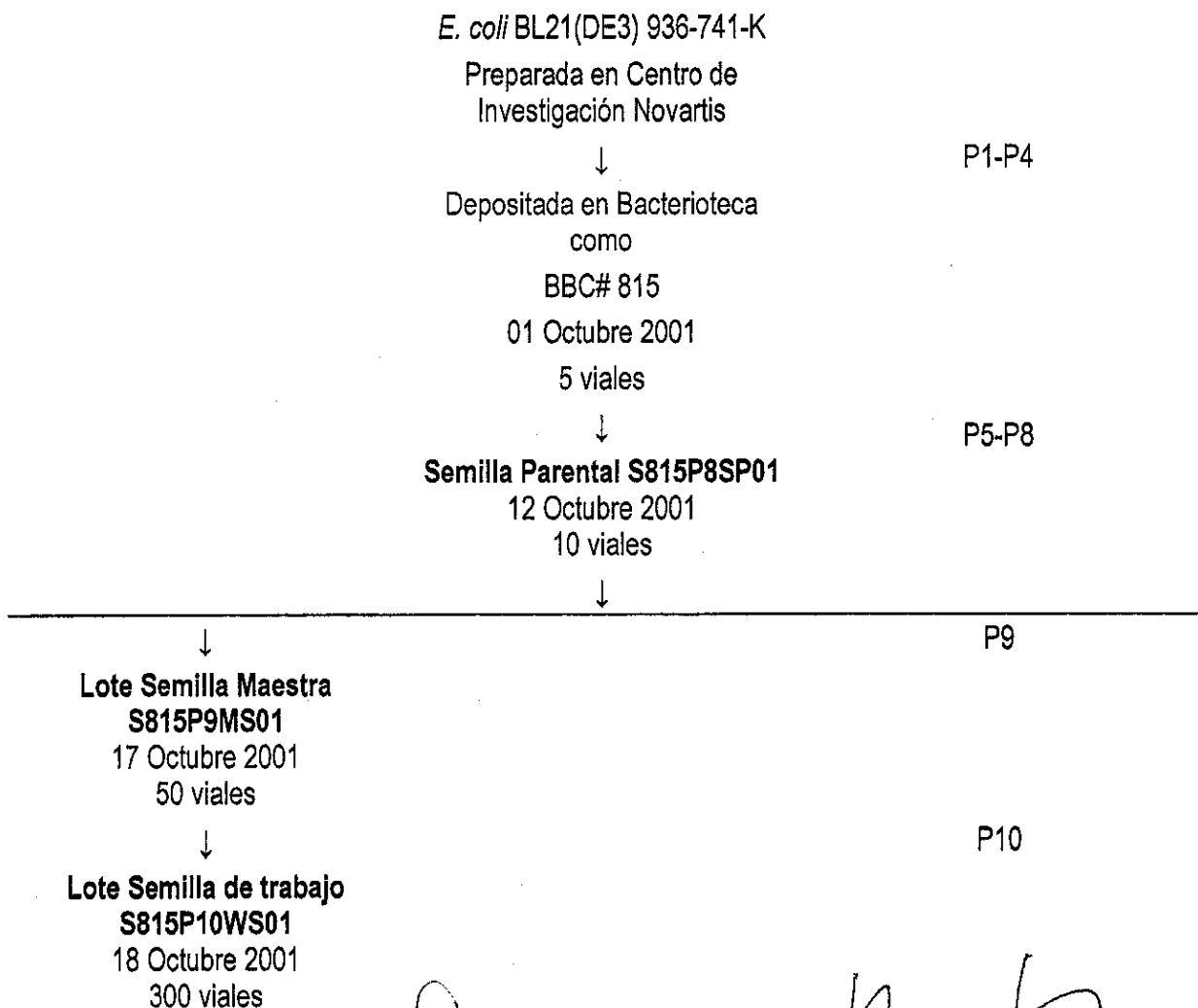
2.4 Control de Materiales
2.4.1 Fuente-Historia-Semilla


El constructo genético utilizado para la expresión bacteriana de la proteína recombinante de fusión fHbp de *Neisseria meningitidis* (*N. meningitidis*) fue generado por tecnología estándar de ADN recombinante. La expresión proteica de la proteína recombinante de fusión fHbp se realizó en células de *Escherichia coli* (*E. coli*) utilizando un sistema de vector plasmídico de expresión extracromosómica inducido por isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG).


2.4.2 Sistema de Banco de Semillas, Caracterización y Pruebas

Los antecedentes de pasaje de las semillas Maestra y de Trabajo para *Escherichia coli* BL21(DE3) 936-741-K) en uso al momento de escritura del informe se proporcionan en Figura 7

Figura 7 Antecedentes de pasaje de *E. coli* BL21(DE3) 936-741-K (BBC#815)




 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

2.4.3 Elaboración de Rutina

Los medios y soluciones utilizados en las etapas de inoculación y fermentación para la elaboración del granel concentrado de proteína recombinante de fusión fHbp se proporcionan en la Tabla 1. Un resumen de los tampones y soluciones utilizadas en las etapas de homogeneización, centrifugación, aislamiento, y purificación se proporciona en Tabla 2.


Tabla 1 Medios y Soluciones Utilizados en las Etapas de Inoculación y Fermentación para el Proceso de Elaboración de la proteína recombinante de fusión fHbp

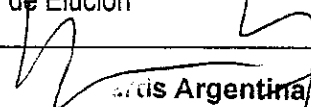
Medio/Solución	Descripción	Uso
M1269 suplementado con sulfato de kanamicina y clorhidrato de tiamina	Medio 1269 suplementado con 30 µg/ml de sulfato de kanamicina y 10 µg/ml clorhidrato de tiamina	Inoculación de botellas de cultivo con semilla de Trabajo
Medio de Fermentación de Semilla (M1269 suplementado con sulfato de kanamicina, clorhidrato de tiamina, y PPG)	Medio 1269 suplementado con 30 µg/ml de sulfato de kanamicina, 10 µg/ml clorhidrato de tiamina, y 0,1 ml/l de PPG	Fermentación de Semilla a escala de 90 l
Medio Principal de Fermentación	Solución de 38 g/l glicerol, 7 g/l sulfato de amonio, 4 g/l fosfato diácido de sodio, y 7 g/l de sulfato de potasio, 0,1 ml/l PPG, 2 g/l sulfato de magnesio, 10µg/ml clorhidrato de tiamina, y 0,01 ml/l 1000× solución de elementos traza	Fermentación Principal a escala de 3000 l
Medio Principal de Fermentación, suplementado con IPTG	Medio Principal de Fermentación suplementado con 1 mM IPTG	Inducción proteica

IPTG: Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido; PPG: Polipropilenglicol

Tabla 2 Composición de Tampones Utilizados en Procesos de Homogeneización, Solubilización, Aislamiento y Purificación

Etapas de Aislamiento o Purificación /Resina	Composición	Propósito
Homogeneización y Centrifugación	Tampón 20 mM NaH ₂ PO ₄ (pH 7,0 ± 0,1)	Resuspensión de la pasta de células previo a la homogeneización y después de centrifugación
Cromatografía de Captura/ SP Sepharosa Flujo Rápido	Agua para Inyección	Enjuague de la columna previo a la carga
	2 M NaCl	Pre equilibramiento de la columna, regeneración de la columna
	Tampón 20 mM NaH ₂ PO ₄ (pH 7,0 ± 0,1)	Equilibramiento de la columna, enjuague después de la carga
	Tampón 20 mM NaH ₂ PO ₄ + 150 mM NaCl (pH 7,0 ± 0,1)	Tampón de Elución


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

