

|                                    |  |  |
|------------------------------------|--|--|
|                                    | Tampón 20 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 75 mM NaCl (pH 7,0 ± 0,1)          | Lavado después de la carga   |
|                                    | 1 M NaOH   | Limpieza después del uso (después del paso de regeneración con 2 M NaCl)       |
| AEX/Q Sepharosa XL                 | 2 M NaCl   | Pre equilibramiento de la columna, regeneración de la columna                  |
|                                    | Tampón 20 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7,0 ± 0,1)                       | Equilibramiento de la columna, enjuague después de la carga, Tampón de Elución |
|                                    | 1 M NaOH   | Limpieza después del uso (después del paso de regeneración con 2 M NaCl)       |
| HIC/Fenil Sepharosa 6 Flujo Rápido | Agua para Inyección  | Enjuague de la columna previo a la carga                                       |
|                                    | Tampón 20 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 1,5 M NaCl (pH 7,0 ± 0,1)          | Equilibramiento y tampón de enjuague   |
|                                    | Tampón 20 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7,0 ± 0,1)                       | Tampón de Elución  |
|                                    | 1 M NaOH   | Limpieza de la columna después de la elución                                   |
| UF/DF                              | Tampón 10 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> conteniendo 150 mM NaCl, pH 7,0 ± 0,1 | Tampón de Diafiltración  |

AEX: Cromatografía de Intercambio aniónico; HIC: Cromatografía de interacción hidrofóbica; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: fosfato de potasio; NaCl: Cloruro de sodio; NaOH: hidróxido de sodio; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: Fosfato de sodio; Tris: Tris (hidroximetil)-aminometano; UF/DF: Ultrafiltración/Diafiltración; Por favor notar que el período de caducidad para los tampones está asignado de acuerdo al SOP.

#### 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 etapa de preparación de la inoculación o la fermentación.

El medio de cromatografía Sepharosa XLI compuesto por dextrano nativo, se elabora con pequeñas cantidades de leche en polvo descremada. El país de origen de la leche en polvo descremada es los Estados de Unidos de América y su fuente son animales considerados aptos para consumo humano o considerados sanos, que están de acuerdo con los requerimientos expuestos en la Guía CPMP revisada (EMA/410/01 Rev. 2). Se hace notar que el uso de leche en polvo descremada en la elaboración de dextrano está siendo reemplazado por material de origen no animal por el elaborador de resina. Sin embargo, el producto a granel fabricado con resina preparada con leche en polvo descremada aún es parte del inventario.

#### 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 3 y Tabla 4, respectivamente.

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



**Tabla 3 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)<br>$\geq 10^6$ 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 líticas)                        |
| 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> La estabilidad segregacional del plásmido también se conoce como retención del plásmido

**Tabla 4 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   | $\geq 10^8$ CFU/ml (Liberación)<br>$\geq 10^6$ 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)/<br>Métodos bioquímicos | Interna | Liberación                    | Resultados del registro (número por bacteria)            |
| Vitalidad (Crecimiento confluyente)                 | Métodos microbiológicos (Placas de agar y tinción de Gram)       | Interna | Reprueba periódica            | Cumple (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

Las pruebas realizadas sobre intermediarios durante la elaboración del principio activo, proteína recombinante de fusión fHbp, se proporcionan en la Tabla 5. 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 5 Pruebas sobre Fases Intermedias para la Elaboración del Granel Concentrado de Proteína recombinante de fusión fHbp**

| Prueba   | Método de Análisis                | Referencia   | Especificación  |
|--|-----------------------------------|--------------|---|
| <b>Inóculo</b>   |                                   |              |   |
| Prueba de contaminación microbiológica   | Prueba de placa de agar           | Interna      | Sin contaminación   |
| <b>Fermentación principal (Caldo de cosecha, o HB)</b>                                     |                                   |              |   |
| Prueba de contaminación microbiológica   | Prueba de placa de agar           | Interna      | Sin contaminación   |
| Contenido de Proteína  | SDS-PAGE                          | Interna      | ≥ 0,15 g/L  |
| <b>Homogeneización y centrifugación (Carga de Captura, o CAP.L)</b>                        |                                   |              |   |
| Pureza   | SDS-PAGE                          | Interna      | Para cálculo del rendimiento de etapa                       |
| Contenido de Proteína  | Ensayo de Proteína Total por BCA  | Interna      | Para cálculo de carga de columna                            |
| <b>Cromatografía de Captura (Eluato de Captura, o CAP.E)</b>                               |                                   |              |   |
| Pureza   | RP-HPLC                           | Interna      | ≥ 75%   |
| Contenido de Proteína  | RP-HPLC                           | Interna      | Para cálculo de carga de columna y del rendimiento de etapa |
| Carga biológica  | Método de filtración por membrana | Ph. Eur.     | Para información solamente                                  |
| Endotoxinas <sup>1</sup>   | Test cinético cromogénico         | Ph. Eur./USP | Para información solamente                                  |
| <b>Cromatografía de intercambio aniónico (Intercambio aniónico-No-adsorbido, o AEX.NA)</b> |                                   |              |   |
| Pureza   | RP-HPLC                           | Interna      | ≥ 85%   |
| Contenido de Proteína  | RP-HPLC                           | Interna      | Para cálculo de carga de columna y del rendimiento          |



|  |                                   |              |  |
|--|-----------------------------------|--------------|--|
|  |                                   |              | de etapa   |
| Carga biológica  | Método de filtración por membrana | Ph. Eur.     | ≤ 100 CFU/ml   |
| Endotoxinas <sup>1</sup>   | Test cinético cromogénico         | Ph. Eur./USP | Para información solamente   |
| Rendimiento de etapa <sup>2</sup>                                    | Cálculo                           | Interna      | ≥ 70%  |
| <b>Cromatografía de Interacción Hidrofóbica(HIC-Eluato, o HIC.E)</b> |                                   |              |  |
| Pureza   | RP-HPLC                           | Interna      | ≥ 88%  |
| Contenido de Proteína  | RP-HPLC                           | Interna      | Para carga de membrana y cálculo del rendimiento de etapa  |
| Carga biológica  | Método de filtración por membrana | Ph. Eur.     | ≤ 100 CFU/ml   |
| Endotoxinas <sup>1</sup>   | Test cinético cromogénico         | Ph. Eur./USP | Para información solamente   |
| Rendimiento de etapa <sup>2</sup>                                    | Cálculo                           | Interna      | ≥ 50%  |
| <b>Ultrafiltración/diafiltración (Diarretentato, o DR)</b>           |                                   |              |  |
| Pureza   | RP-HPLC                           | Interna      | Para información solamente   |
| Contenido de Proteína  | RP-HPLC                           | Interna      | Para cálculo de rendimiento de etapa y cálculo del volumen para lograr la concentración objetivo |
| Carga biológica  | Método de filtración por membrana | Ph. Eur.     | ≤ 100 CFU/ml <sup>3</sup>  |
| Endotoxinas <sup>1</sup>   | Test cinético cromogénico         | Ph. Eur./USP | Para información solamente   |
| Rendimiento de etapa <sup>2</sup>                                    | Cálculo                           | Interna      | ≥ 70%  |

BCA: Ácido Bicinconínico; CFU: Unidades formadoras de colonias; IU: Unidades Internacionales; Ph. Eur.: European Pharmacopeia; SE-HPLC: Cromatografía líquida de alta performance por exclusión de tamaño; SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio; USP: United States Pharmacopeia

Por favor notar que la terminología para pureza mediante los métodos SDS-PAGE y RP-HPLC se define en Sección control de Calidad - Especificaciones.

<sup>1</sup> Para material en proceso, los resultados de endotoxinas se informan en IU/ml; para granel concentrado, los resultados de endotoxinas se informan en IU/mg.

<sup>2</sup> Los rendimientos de etapa son valores objetivos. La especificación adecuada se definirá en fecha futura, una vez que haya sido elaborado un número suficiente de lotes.

<sup>3</sup> Basado en los datos obtenidos hasta la fecha, se aplicará un límite en campañas futuras.

## 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

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



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 los cuales 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 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.

Los parámetros críticos del proceso y los controles en proceso (AC), y los parámetros no críticos del proceso y los controles en proceso (AL), y los resultados de la validación de proceso para los procesos de fermentación, aislamiento, y purificación se proporcionan en la Tabla 6 a Tabla 11. Los tiempos de espera a  $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$  para todos los intermediarios desde captura hasta las etapas de ultrafiltración/diafiltración, para los procesos de aislamiento y purificación y adicionalmente  $20 \pm 3^{\circ}\text{C}$  para el eluato de la Cromatografía en Cerámica Hidroxiapatita se proporcionan en la Tabla 12.



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



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



**Tabla 6** Parámetros Críticos del Proceso y Controles En Proceso (AC) para el Proceso de Fermentación

| Etapa del Proceso                            | Parámetro Crítico del Proceso   | Rango de Aceptación       | Lotes    |          |          |          |
|--|---|---------------------------|----------|----------|----------|----------|
|  |   |                           | 41303803 | 41303808 | 41303809 | 41303810 |
| Semilla de fermentación<br>(Semilla cultivo) | Ausencia de contaminación microbiana<br>mediante observación microscópica | Sin contaminación visible | conforme | conforme | conforme | conforme |
| Fermentación Principal<br>(Caldo de Cosecha) |   |                           | conforme | conforme | conforme | conforme |
| <b>Control En-proceso</b>                    |   |                           |          |          |          |          |
| Inóculo<br>(Inóculo de cultivo)              | Ausencia de contaminación microbiana<br>mediante plaqueo                  | Libre de contaminación    | conforme | conforme | conforme | conforme |
| Fermentación Principal<br>(Caldo de Cosecha) |   |                           | conforme | conforme | conforme | conforme |

  
 Novartis Argentina S.A.  
 Dr. Lucie Jeronimo  
 Director Técnico  
 MN 14840

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



