

Tabla 7 Parámetros No Críticos del Proceso y Controles En Proceso (AL) para el Proceso de Fermentación

Etapa del Proceso	Parámetro No Crítico del Proceso	Rango de Aceptación	Lotes		
			41303803	41303808	41303809
Preparación del inóculo (Inóculo)	Temperatura	35-37°C	35.5-36.5°C	35.5-36.5°C	35.5-36.5°C
	Densidad Óptica (OD) a la transferencia	1,0-2,0	1,31	1,31	1,46
Semilla fermentación (cultivo de Semilla)	pH del medio antes de la esterilización	6,3-6,7	6,4	6,4	6,5
	Temperatura	33-37°C	34,7-35,4°C	34,5-35,0°C	34,7-35,0°C
	Oxígeno Disuelto (DO)	≥ 10%	81%	79%	78%
	Densidad Óptica (OD) a la transferencia	0,9-2,2	1,2	1,2	1,3
Fermentación Principal (Caldo de Cosecha)	pH	6,3-6,8	6,48-6,54	6,46-6,54	6,43-6,55
	Temperatura	34-38°C	34,9-35,2°C	34,8-35,2°C	34,8-35,1°C
	Oxígeno Disuelto (DO)	≥ 10%	27%	27%	28%
	Densidad Óptica (OD) a la inducción	3-7	4,3	4,9	4,6
	Tiempo de corrida después de la inducción con IPTG	5,8-6,2 horas	6,0 horas	6,0 horas	6,0 horas
	Control En-proceso	Límite de Acción			
Fermentación Principal (Caldo de Cosecha)	Contenido de Proteína por SDS-PAGE	≥ 0,15 g/L	0,21 g/L	0,18 g/L	0,15 g/L

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



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



Tabla 8 Parámetros Críticos del Proceso y Controles en Proceso para el Proceso de Aislamiento (Etapa de captura)

Etapa del Proceso	Parámetro Crítico del Proceso	Rango de Aceptación	Lotes	
			36438806	36438807
CAP.L ¹	Proporción de Carga de Columna	Carga de Columna: ≤ 30 mg TP/ml resina ²	25,7 mg TP/ml resina	21,9 mg TP/ml resina
	Control En-proceso	Criterio de aceptación		
CAP.E	Pureza	SDS-PAGE ³ : ≥ 70%	87,2%	85,3%

CAP.E: Eluato de captura; CAP.L: Carga de captura; SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio; TP: Total Proteína

¹ El material utilizado en la etapa de carga de captura es el homogenato clarificado (HGC) después de la filtración en profundidad.

² Por favor notar que al momento de validación del proceso, la carga de captura se determinó en base a los valores de contenido ensayo de Proteína Total del Ácido Bicinconínico (BCA)

³ Por favor notar que SDS-PAGE ha sido reemplazado por el ensayo de RP-HPLC para la campaña 2009. En base a validación cruzada/comparación de métodos, la nueva especificación para RP-HPLC es ≥ 75 % para la campaña 2010.

Tabla 9 Parámetros Críticos del Proceso y Controles En Proceso (AC) para el Proceso de Purificación (Etapa AEX)

Etapa del Proceso	Parámetro Crítico del Proceso	Rango de Aceptación	Lotes	
			36438806	36438807
AEX.L	Proporción de carga de Columna	Carga de Columna: ≤ 17 (mg TP/ml resina) ¹	7,1 mg TP/ml resina	6,6 mg TP/ml resina
	Control En-proceso	Criterio de aceptación		
AEX.NA	Pureza	SDS-PAGE ² : ≥ 80%	92,3%	90,2%

Novartis Argentina S.A.

Earm. Sergio Imirzian
Gte. de Asuntos Regulatorios
Codirector Técnico - M.N. 11521
Apoderado

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

AEX.L: Carga de Cromatografía de Intercambio Aniónico; AEX.NA: Cromatografía de Intercambio Aniónico -No-Adsorbido; SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio; TP: Proteína Total
Por favor notar que el tiempo de la validación del proceso, AEX.L se determinó en base a los valores de contenido por el ensayo de Proteína Total del Ácido Bicinconínico (BCA). El ensayo de BCA fue reemplazado por el ensayo RP-HPLC para la campaña 2010. En base a validación cruzada/comparación de métodos, la nueva especificación para RP-HPLC es ≤ 15 mg de proteína recombinante de fusión rHbp /ml de resina para la campaña 2010.
² Por favor notar que SDS-PAGE fue reemplazado por el ensayo RP-HPLC para la campaña 2010. En base a validación cruzada/comparación de métodos, la nueva especificación para RP-HPLC es ≥ 85 % para la campaña 2010.

En base a validación cruzada/comparación de métodos, la nueva especificación para RP-HPLC es ≥ 85 % para la campaña 2010.



Tabla 10 Parámetros Críticos del Proceso y Controles En Proceso (AC) para el Proceso de Purificación (Etapa HIC)

Etapa del Proceso	Parámetro Crítico del Proceso	Rango de Aceptación	Lotes	
			36438806	36438807
HIC.L	Proporción de carga de Columna	Carga de Columna: 2-8 mg TP/ml resina ¹	3,0 mg TP/ml resina	2,7 mg TP/ml resina
Elución HIC	Inicio del Pico de recolección	Después de elevación de 0,2-0,3 CV a UV 280 nm	0,34	0,34
	Control En proceso	Criterio de aceptación		
HIC.E	Pureza	SDS-PAGE: $\geq 88\%^2$	94,8%	95,3%

CV: volumen de columna; HIC.E: Eluato de Cromatografía de Interacción Hidrofóbica; HIC.L: Carga de Cromatografía de Interacción Hidrofóbica; SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio; TP: Proteína Total

¹ Por favor notar que el tiempo de la validación del proceso, HIC.L se determinó en base a los valores de contenido por el ensayo de Proteína Total del Ácido Bicinoninico (BCA). El ensayo de BCA fue reemplazado por el ensayo RP-HPLC para la campaña 2010. En base a validación cruzada/comparación de métodos, la nueva especificación para RP-HPLC es 2-7 mg de proteína recombinante de fusión fHbP/ml de resina para la campaña 2010

² Por favor notar que SDS-PAGE fue reemplazado por el ensayo RP-HPLC para la campaña 2010. En base a validación cruzada/comparación de métodos, la nueva especificación para RP-HPLC permaneció en $\geq 88\%$ para la campaña 2010.

Tabla 11 Homogeneidad del Granel Final –Validación del Llenado

Muestra	Prueba/Especificación	Lotes
Comienzo de Llenado	Contenido de Proteína por Ensayo de Proteína Total por BCA ¹ : 0,9-2,7 mg/ml	36438806
Miada de Llenado		36438807
Final de Llenado		
	Promedio	1,177
	SD	0,028
	% CV: $\leq 20\%$	2,8

BCA: Ácido Bicinoninico; CB: Granel Concentrado; % CV: Porcentaje del Coeficiente de Variación; SD: Desviación Estándar

¹ Por favor notar que el contenido de proteína fue determinado utilizando el ensayo de microtitulación en placa de Sandoz.



Tabla 12 Tiempo de Espera de Intermediarios (Etapa de captura hasta etapa de UF/DF)

Etapa del Proceso	Parámetro crítico del proceso	Prueba/Especificación	Lotes			
			B042433	B043447	B043449	B043450
CAP.E	Tiempo de espera (5±3°C)	Pureza por RP-HPLC ≥ 75 %, Sin tendencia evidente, para Días 0-5	88	88	87	88
			89	88	87	89
			88	89	88	88
			89	88	89	88
			1,39	1,14	1,25	1,03
	Tiempo de espera (5±3°C)	Contenido de Proteína por RP-HPLC Sin tendencia evidente, para Días 0-5	1,39	1,14	1,26	1,05
			1,37	1,13	1,27	1,03
			1,41	1,12	1,25	1,14
			93	93	93	93
			93	93	93	93
	Tiempo de espera (5±3°C)	Pureza por RP-HPLC ≥ 85 %, Sin tendencia evidente, para Días 0-5	93	93	93	93
			93	92	93	92
			93	93	93	92
			93	93	92	95
			93	93	94	94
Tiempo de espera (5±3°C)	Pureza por SE-HPLC Sin tendencia evidente, para Días 0-5	1,23	0,92	1,08	0,88	
		1,23	0,92	1,14	1,01	
		1,18	0,94	1,15	0,89	
		1,23	0,93	1,11	0,90	
		97	98	98	97	
Tiempo de espera (5±3°C)	Pureza por RP-HPLC ≥ 88 %, Sin tendencia evidente, para días 0-5	97	98	98	97	
		97	97	97	97	
		97	98	97	97	
		98	98	95 ²	98	
		98	98	98 ⁴	98	

Novartis Argentina S.A.
Dr. Lucio Jeronice
Director Técnico

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



		3 días	98	98	98	98	98
		5 días	98	98	98	98	98 ⁴
	Contenido de Proteína por RP-HPLC	0 ¹	0,75	0,54	0,74	0,51	0,51
	Sin tendencia evidente, para días 0-5	1 días	0,73	0,52	0,73	0,50	0,50
		3 días	0,73	0,54	0,72	0,49	0,49
		5 días	0,73	0,54	0,73	0,49	0,49
	Pureza por RP-HPLC	0 ¹	97	97	97	97	97
	Sin tendencia evidente, para días 0-5	1 días	97	98	98	98	98
		3 días	97	97	97	97	97
		5 días	97	97	97	97	97
	Pureza por SE-HPLC	0 ¹	97	98	98 ²	98 ³	98 ³
	Sin tendencia evidente, para días 0-5	1 días	97	98	98	98	98
		3 días	98	98	98	98	98
		5 días	98	98	98 ²	98	98
	Contenido de Proteína por RP-HPLC	0 ¹	1,74	1,71	1,77	1,72	1,72
	Sin tendencia evidente, para días 0-5	1 días	1,70	1,74	1,79	1,69	1,69
		3 días	1,75	1,73	1,72	1,85	1,85
		5 días	1,71	1,71	1,76	1,64	1,64

DR

Novartis Argentina S.A.
Dr. Lucía Jeronimo
Director Técnico

CAP.E: Eluato de captura; AEX.NA: Cromatografía de Intercambio Aniónico -No-Adsorbido; HIC.E: Eluato de Cromatografía de Interacción Hidrofóbica; DR: Diarretentato; RP-HPLC: Cromatografía líquida de alta performance en fase reversa; SE-HPLC: Cromatografía líquida de alta performance por exclusión de tamaño

¹ Día 0 corresponde a los datos del control en proceso realizado durante la elaboración de rutina.

² El análisis falló debido a que no se cumplió el criterio SST. El análisis se repitió utilizando muestras congeladas.

³ Resultado no disponible debido a que la muestra no fue analizada por una falla de operador durante el reinicio del sistema después de un corte de energía eléctrica.

⁴ El análisis falló debido a que no se cumplió el criterio SST. Para B043449 la prueba de la muestra del día se realizó el día 2. Para B043450 la prueba de la muestra del día 5 se realizó el día 6.

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

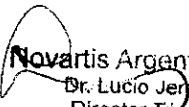


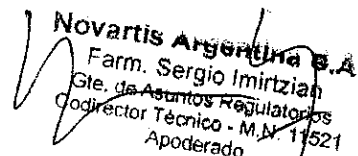
Validación de la Depuración

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

Para cada impureza, se realizó un análisis preliminar de datos históricos (incluyendo datos a partir de un total de tres lotes de consistencia y tres lotes comerciales de 2009) para identificar las etapas críticas involucradas en la reducción de contaminantes y para establecer el criterio de aceptación de la validación del proceso. El estudio de validación de la purificación se realizó luego utilizando cuatro lotes comerciales elaborados como parte de la campaña 2010; los resultados de las validaciones de purificación para cada impureza se proporcionan en la Tabla 13 a Tabla 17.

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.


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


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

