

Tabla 13 Resultados para ADN, Validación de la purificación

Intermediario	Resultados de ADN			
	Corridos Comerciales			
CAP	CAP.L	B042433	B043449	B043450
	CAP.E	357000 mg 12,3 mg	425000 mg 18,4 mg	304000 mg 14,2 mg
Logaritmo de reducción en etapa de Captura (CAP.L a CAP.P) Criterio de Aceptación: ≥ 4 logaritmos				
AEX.NA Criterio de Aceptación: ≤ 10 mg				
HIC.E: Criterio de Aceptación: ≤ 1 mg				
CB				
CB (ADN/Proteína), Criterio de Aceptación: ≤ 10 pg/ μ g				

AEX.NA: Cromatografía de intercambio aniónico-No-Adsorbido; CAP.E: Eluato de Captura; CAP.L Carga de captura; CB Granel concentrado; HIC.E: Eluato de Cromatografía de Interacción Hidrofóbica
Valores informados en mg a menos que se note lo contrario.

Las áreas sombreadas representan ya se logaritmos de reducción o resultados para el granel concentrado, calculado en pg/ μ g.

¹ Promedios de los valores calculados en pg ADN/ μ g Proteína $< 1,3$ pg/ μ g



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

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

Tabla 14 Resultados para HCP mediante ELISA, Validación de la purificación

Intermediario		Resultados de HCP					
		Corridas Comerciales					
CAP	CAP.L	B042433	B043447	B043449	B043450		
	CAP.E	174000 mg 178 mg	131000 mg < 208 mg	156000 mg 224 mg	152000 mg 199 mg		
logaritmo reducción etapa de Captura (CAP.L a CAP.E) Criterio de Aceptación: ≥ 3 logaritmos		3 logaritmos	> 3 logaritmos	3 logaritmos	3 logaritmos		
AEX.NA: Criterio de Aceptación: ≤ 100 mg		27,5 mg	15,6 mg	22,1 mg	26,4 mg		
CB		5,47 mg	3,28 mg	5,19 mg	4,51 mg		
CB (HCP/Proteína: Criterio de Aceptación: ≤ 200 ppm)		41 ppm	34 ppm	38 ppm	52 ppm		

AEX.NA: Cromatografía de Intercambio Aniónico -No-Adsorbido; CAP.E: Eluato de Captura; CAP.L: Carga de captura; CB: granel concentrado; ppm: partes por millón
Los valores se informan en mg a menos que se especifique otra cosa. Las áreas sombreadas representan o bien la reducción de logaritmo o bien resultados para granel concentrado, calculados en ppm.

Tabla 15 Resultados para Endotoxinas, Validación de la purificación

Intermediario		Cantidad Total de Endotoxinas (IU x 10 ⁶)					
		Corridas Comerciales					
CAP.E		B042433	B043447	B043449	B043450		
		28600 IU x 10 ⁶ 0,13 IU x 10 ⁶	12600 IU x 10 ⁶ < 0,09 IU x 10 ⁶	14200 IU x 10 ⁶ 0,13 IU x 10 ⁶	15000 IU x 10 ⁶ < 0,10 IU x 10 ⁶		
AEX.NA		5 logaritmos	> 5 logaritmo	5 logaritmos	> 5 logaritmos		
Reducción de logaritmo de la etapa AEX (CAP.E a AEX.NA)		< 0,4 IU x 10 ⁶	< 0,3 IU x 10 ⁶	< 0,4 IU x 10 ⁶	< 0,3 IU x 10 ⁶		
CB		< 0,003 IU/μg	< 0,003 IU/μg	< 0,003 IU/μg	< 0,003 IU/μg		

CB (Endotoxina/Proteína): Criterio de Aceptación: $\leq 0,003$ IU/μg
AEX.NA: Cromatografía de Intercambio Aniónico -No-Adsorbido; CAP.E: Eluato de captura; CB: granel concentrado; DR: Diarrefentato

Los valores se informan en IU x 10⁶ a menos que se especifique otra cosa. Las áreas sombreadas representan o bien resultados para granel concentrado, calculados en IU/μg.

Tabla 16 Resultados para IPTG, Validación de la purificación

Intermediario	Resultados de IPTG (gramos)			
	B042433	B043447	B043449	B043450
IPTG agregado durante la fermentación principal	715 g	715 g	715 g	715 g
CAP.E	< 1,92 g	< 2,08 g	< 2,28 g	< 2,23 g
Reducción de logaritmo a la preparación de CAP.L + Etapa de captura (cantidad de inicio introducida al proceso hasta CAP.E): Criterio de Aceptación: ≥ 2 logaritmo	> 3 logaritmos	> 3 logaritmos	> 2 logaritmos	> 3 logaritmos
CB	< 0,80 g	< 0,60 g	< 0,84 g	< 0,60 g
CB: Criterio de Aceptación: ≤ 10 ppm	< 10 ppm	< 10 ppm	< 10 ppm	< 10 ppm

CAP.E: Eluato de captura; CAP.L: Carga de captura; CB: granel concentrado; Isopropil β -D-1-fogalactopiranosido; ppm: partes por millón

Los valores se informan en gramos (g) a menos que se especifique otra cosa. Las áreas sombreadas representan o bien la reducción de logaritmo o bien resultados para granel concentrado, calculados en ppm.

Tabla 17 Resultados para PPG, Validación de la purificación

Intermediario	Resultados de PPG (kg)			
	B042433	B043447	B043449	B043450
Cantidad Total de PPG ¹ introducida en el proceso	1,3 kg	1,5 kg	2,0 kg	1,2 kg
PPG teórico en proceso de fermentación	1,3 kg	1,5 kg	2,0 kg	1,2 kg
CAP.E	< 0,002 kg	< 0,002 kg	< 0,002 kg	< 0,002 kg
Reducción de logaritmo a la preparación de CAP.L + Etapa de captura (cantidad de inicio introducida al proceso hasta CAP.E): Criterio de Aceptación: ≥ 3 logaritmo	> 3 logaritmos	> 3 logaritmos	> 3 logaritmos	> 3 logaritmos
CB	< 0,0008 kg	< 0,0006 kg	< 0,0008 kg	< 0,0006 kg
CB: Criterio de Aceptación: ≤ 10 ppm	< 10 ppm	< 10 ppm	< 10 ppm	< 10 ppm

CAP.E: Eluato de captura; CAP.L: Carga de captura; CB: granel concentrado; PPG: polipropilenglicol

Los valores se informan como kg a menos que se especifique otra cosa. Las áreas sombreadas representan reducción de logaritmo o resultados para granel concentrado, calculados en ppm.

¹ Cantidad total de PPG incluye: PPG agregado al medio de fermentación de semilla, medio principal de fermentación y durante fermentación principal

Control de Biocarga

El ingreso de biocarga en las soluciones de proceso/producto se controla vía las instalaciones, equipamiento, y procesos designados para mantener bajos niveles de Biocarga durante la elaboración. Los límites de acción se han establecido en base a los resultados de las campañas 2009 y 2010.

Vida Útil de la Resina

Para establecer la máxima vida útil de la columna, se llevó a cabo un estudio de duración de la resina de la proteína recombinante de fusión fHbp de pasos cromatográficos, por el uso de un modelo calificado de reducción a escala y muestras de intermediarios recolectadas durante la campaña de 2009 y 2010 llevada a cabo en Sandoz. El modelo reducido a escala llevado a cabo con estos intermediarios se ha calificado para comparabilidad con el proceso a escala completa. El estudio se llevó a cabo con nuevas resinas cromatográficas para captura, intercambio aniónico, y cromatografía por interacción hidrofóbica. Con base en los resultados, la reutilización de resina se demuestra como segura para todas las resinas cromatográficas hasta 30 operaciones.


Vida Útil de la Membrana

Las membranas utilizadas para los pasos de filtración UF/DF se reutilizan durante cada campaña para la elaboración a granel de la proteína recombinante de fusión fHbp. El desempeño de las membranas se comprueba antes de cada lote y se compara con nuevas membranas por una prueba neta de permeabilidad en agua de acuerdo con las recomendaciones del proveedor. Las membranas se descargan una vez que se completa cada campaña.

Validación del Transporte

El granel concentrado de la proteína recombinante de fusión fHbp se congela a $\leq -15^{\circ}\text{C}$ en el sitio Sandoz, en Kundl, Austria, y se trasladan vía camiones con control de temperatura a Novartis Vaccines and Diagnostics, ubicado en Rosia, Italia, para el proceso de elaboración adicional. Todas las cargas se transportan con dos monitores de temperatura en el producto y una sonda de temperatura en el camión. Para confirmar que el granel con control de temperatura se mantenga a $\leq -15^{\circ}\text{C}$ (punto de inicio -20°C) durante el transporte, se llevó a cabo una validación del traslado.

Una ruta representativa se seleccionó como representativa de todas las otras rutas de traslado. Se llevaron a cabo tres operaciones de mapeo térmico, que consistían en dos cargas a escala completa y una carga a escala reducida, en tres trailers refrigerados. El estudio se llevó a cabo en febrero de 2009, por el uso de registradores automáticos de la temperatura calibrados y certificados. Se cumplieron todos los criterios de aceptación.


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. 11321
Apoderado

3) CONTROL DE CALIDAD - METODOS CONTROL

3.1 Especificaciones

Se proporciona en la tabla a continuación una síntesis de las pruebas y especificaciones para liberación del granel concentrado de la proteína recombinante de fusión fHbp. Todas las pruebas, con la excepción de HCP/ELISA y Osmolaridad, se llevan a cabo por cuenta de Sandoz. La liberación final del granel concentrado para elaboración adicional se lleva a cabo por cuenta de Novartis Vacunas & Diagnósticos.

Con base en un pedido de AFSSAPS posterior a la reunión y discusiones internas del día 24-Oct-2008, el término "integridad" ha sido reemplazado por "pureza" para los análisis llevados a cabo vía SE-HPLC, en alineación con la directriz Q6B de ICH Q6B. No se han hecho cambios a la terminología para las valoraciones por RP-HPLC y SDS-PAGE. La terminología propuesta se detalla en la Tabla 19.

Tabla 18 Especificaciones de Liberación para el Granel Concentrado de la proteína recombinante de fusión fHbp

Prueba	Método de Análisis	Referencia	Especificación
Pureza	SDS-PAGE	Interna	≥ 88%
Pureza	SE-HPLC	Interna	≥ 90%
Contenido de Proteínas	Valoración de Proteínas Totales BCA	Interna	900-2700 µg/ml
Identidad	Western Blot	Interna	Positiva
HCP/Proteína ¹	ELISA/cálculo	Interna	≤ 100 ppm
Osmolaridad ¹	Osmometría, punto de congelamiento	Ph. Eur./USP	240-360 mOsm/kg
Endotoxina/Proteína	Prueba cromogénica cinética/cálculo	Ph. Eur./USP	≤ 0,16 IU/µg
Biocarga	Filtración de membrana	Ph. Eur./USP	≤ 10 CFU/100 ml ²
pH	Potenciometría	Ph. Eur./USP	6,5-7,5
Conductividad	Potenciometría	Ph. Eur./USP	15,000-17,300 µS/cm

BCA: Acido Bicinonínico; CFU: Unidades de Formación de Colonias; ELISA: Valoración Inmunoabsorbente Vinculada con Enzimas; IU: Unidades Internacionales; µS: Micro-Siemens; mOsm: Milli-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-poliacrilamida; USP: Farmacopea de los Estados Unidos

¹ La prueba se lleva a cabo por cuenta de Novartis Vacunas & Diagnósticos.

² La especificación para la Biocarga de ≤ 15 CFU/100 ml será reducido a ≤ 10 CFU/100 ml y se aplicará comenzando desde la campaña 2013.


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

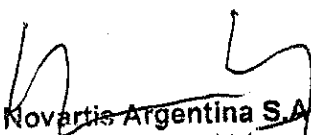

Novartis Argentina S.A.
 Farm. Sergio Imirtzian
 Gte. de Asuntos Regulatorios
 Codirector Técnico - M.N. 11521
 Aperturados

Tabla 19 Fundamentos para el Uso de Terminología para Pureza

Método de Análisis	Descripción General de Medición	Nomenclatura Corriente	Nomenclatura Propuesta	Fundamentos para la Selección de la Terminología Utilizada
SE-HPLC	Área porcentual del pico de antígenos con respecto al área total del cromatograma	Integridad	Pureza	La pureza del antígeno con respecto a formas agregadas/degradadas y a impurezas del proceso de proteínas. El término "Pureza" se seleccionó dado su extenso significado que incluye, pero sin limitación, "integridad".
RP-HPLC	Área porcentual del pico de antígenos con respecto al área total del cromatograma	Pureza	Pureza	La pureza del antígeno con respecto a las formas degradadas y a impurezas del proceso de proteínas
SDS-PAGE	Intensidad porcentual de la banda de antígenos con respecto a la intensidad de las bandas totales en el gel	Pureza	Pureza	La pureza del antígeno con respecto a las formas degradadas y a impurezas del proceso de proteínas

RP-HPLC: Cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa; SE-HPLC: Cromatografía líquida de alto rendimiento con exclusión de tamaño; SDS-PAGE: gel de dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida
 Nota: RP-HPLC se utiliza para la prueba de controles durante el proceso para la proteína recombinante de fusión THp.

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
 Aprobado



3.2 Procedimientos Analíticos

Se describen en las siguientes tablas procedimientos analíticos para el granel concentrado e intermediarios de la proteína recombinante de fusión fHbp.

Tabla 20 Biocarga

<p>Descripción de la Valoración</p>	<p>Valoración de Sandoz, para controles durante el proceso y liberación del granel concentrado:</p> <p>Un volumen de 100 ml del granel concentrado se filtra a través de un filtro de membrana estéril de 0,45µm. Luego, el filtro se enjuaga 3 veces con 100 ml de solución estéril de cloruro de sodio-peptona. El filtro se transfiere asépticamente a agar de soja tríptica para el crecimiento de bacterias aeróbicas, levaduras, y moldes. El tampón de peptona sirve como un control negativo diario. La incubación se lleva a cabo durante no menos que 7 días a 30 ± 2°C.</p> <p>Valoración de Novartis, para estabilidad de granel concentrado:</p> <p>Un volumen especificado de muestra de prueba se filtra a través de un filtro de membrana estéril de 0,45 µm. Luego, el filtro se enjuaga 3 veces con 100 ml de Solución de Enjuague, y se transfiere asépticamente a placas TSA y SDA. La Solución de Enjuague filtrada de la misma manera que las Muestras de Prueba sirve como el control negativo. La incubación se lleva a cabo a 30-35°C durante 3-5 días para las placas TSA y a 20-25°C durante 5-7 días para las placas SDA. Al final del período de incubación, se cuentan las colonias formadas sobre las placas. Si se detecta crecimiento microbiano, los contaminantes se identifican e investigan. La prueba se considera válida si el control negativo no muestra crecimiento.</p>
<p>Consistencia a Farmacopeas</p>	<p>Valoración de Sandoz:</p> <p>Ph. Eur. Capítulo 2.6.12 Examinación Microbiana de Productos no Estériles: Pruebas de Enumeración Microbiana [Método de Prueba: Recuentos Microbianos Aeróbicos Totales (TAMC)]</p> <p>Valoración de Novartis:</p> <p>Ph. Eur. Capítulo 2.6.12 Examinación Microbiológica de Productos no Estériles: Pruebas de Enumeración Microbiana</p> <p>USP Capítulo <61> Examinación Microbiológica de Productos no Estériles: Pruebas de Enumeración Microbiana</p>

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

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

Tabla 21 Conductividad

Muestras de Prueba	Granel Concentrado
Estándares y Controles de Referencia	Soluciones Estándares de Conductividad Certificada NIST y PTB para Calibración
Descripción de la Valoración	<p>Valoración de Sandoz:</p> <p>La célula constante en el conductímetro se calibra por el uso de la solución estándar más cercano a la conductividad de la solución a medir. La muestra de prueba se vierte en el recipiente y las sondas de temperatura y conductividad se colocan en la solución de prueba y se mide la conductividad. La sonda se enjuaga con agua desionizada entre las muestras de prueba. Se toma una lectura simple para cada muestra a temperatura ambiente. El análisis es válido si la conductividad de la solución estándar de referencia está dentro de $\pm 5\%$ del valor certificado, a menos que se especifique lo contrario por parte del fabricante.</p>
Consistencia a Farmacopeas	Ph. Eur. Capítulo 2.2.38 Conductividad USP <645> Conductividad en Agua

Tabla 22 Endotoxina

Descripción de la Valoración	<p>Valoración de Sandoz (para controles durante el proceso y liberación del granel concentrado) y Valoración de Novartis (para la estabilidad del granel concentrado):</p> <p>Se lleva a cabo en la prueba de rutina una prueba de inhibición/aumento. Las muestras se diluyen y los pocillos que contienen muestras se enriquecen con una cantidad conocida de endotoxina por propósitos de revisión de factores interferentes. La curva estándar se prepara a partir de una solución estándar de endotoxina de control (CSE) incluida en el kit comercial. Para generar la curva estándar, se llevan a cabo cuatro diluciones seriales en diez veces de CSE, comenzando en una concentración de CSE de 5 IU/ml (Valoración de Sandoz) o 50 UI/ml (Valoración de Novartis).</p> <p>La muestra y las diluciones de la curva estándar y el control negativo (agua o tampón usado para la preparación de la muestra) se siembran en una placa de microtitulación de 96 pocillos y se preincuban antes de la adición del reactivo LAL a cada pocillo durante 10 minutos a $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Luego de la adición del reactivo LAL, las placas se agitan durante 30 segundos a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ antes</p>
-------------------------------------	---

Novartis Argentina S.A.
Dr. Lucio Jeronic
Director Técnico
MN 74840

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


Tabla 21 Conductividad

Muestras de Prueba	Granel Concentrado
Estándares y Controles de Referencia	Soluciones Estándares de Conductividad Certificada NIST y PTB para Calibración
Descripción de la Valoración	<p>Valoración de Sandoz:</p> <p>La célula constante en el conductímetro se calibra por el uso de la solución estándar más cercano a la conductividad de la solución a medir. La muestra de prueba se vierte en el recipiente y las sondas de temperatura y conductividad se colocan en la solución de prueba y se mide la conductividad. La sonda se enjuaga con agua desionizada entre las muestras de prueba. Se toma una lectura simple para cada muestra a temperatura ambiente. El análisis es válido si la conductividad de la solución estándar de referencia está dentro de $\pm 5\%$ del valor certificado, a menos que se especifique lo contrario por parte del fabricante.</p>
Consistencia a Farmacopeas	Ph. Eur. Capítulo 2.2.38 Conductividad USP <645> Conductividad en Agua

Tabla 22 Endotoxina

Descripción de la Valoración	<p>Valoración de Sandoz (para controles durante el proceso y liberación del granel concentrado) y Valoración de Novartis (para la estabilidad del granel concentrado):</p> <p>Se lleva a cabo en la prueba de rutina una prueba de inhibición/aumento. Las muestras se diluyen y los pocillos que contienen muestras se enriquecen con una cantidad conocida de endotoxina por propósitos de revisión de factores interferentes. La curva estándar se prepara a partir de una solución estándar de endotoxina de control (CSE) incluida en el kit comercial. Para generar la curva estándar, se llevan a cabo cuatro diluciones seriales en diez veces de CSE, comenzando en una concentración de CSE de 5 IU/ml (Valoración de Sandoz) o 50 UI/ml (Valoración de Novartis).</p> <p>La muestra y las diluciones de la curva estándar y el control negativo (agua o tampón usado para la preparación de la muestra) se siembran en una placa de microtitulación de 96 pocillos y se preincuban antes de la adición del reactivo LAL a cada pocillo durante 10 minutos a $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Luego de la adición del reactivo LAL, las placas se agitan durante 30 segundos a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ antes</p>
-------------------------------------	---

Novartis Argentina S.A.
Dr. Lucio Jeroncio
Director Técnico
MN 74840

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





	de la medición. La absorbancia se lee a una longitud de onda de 405 nm y las concentraciones de muestra se calculan a partir de los tiempos de reacción respectivos contra una curva estándar. Se verifican los criterios adecuados de idoneidad del sistema para confirmar la validez de la corrida analítica.
Consistencia a Farmacopeas	Valoraciones de Sandoz y Novartis: Ph. Eur. Capítulo 2.6.14 Endotoxinas Bacterianas USP-NF <85> Prueba de Endotoxinas Bacterianas

Tabla 23 Proteínas Residuales de las Células Huésped

Muestras de Prueba	Granel Concentrado
Descripción de la Valoración	<p>Para generar la curva estándar, se agregan seis concentraciones del estándar de referencia de HCP de <i>E. coli</i> HCP proporcionado en el kit comercial a la placa de microtitulación por triplicado, en 0, 1, 3, 12, 40, y 100 ng/ml. Un Control Positivo separado, pET de <i>E. coli</i> se diluye en tampón a una concentración predeterminada para el lote de control, y se agrega por triplicado a la placa de microtitulación. Se diluyen muestras de prueba en un tampón de dilución de muestra a una concentración que cae dentro del rango validado. Las muestras de prueba correspondientes se enriquecen con control positivo de HCP de <i>E. coli</i>. Las muestras de prueba y las muestras enriquecidas correspondientes se agregan por cuadruplicado a la placa de microtitulación. La placa se incuba sobre el agitador de placas a 20-25°C durante 90 ± 2 minutos. Luego de la incubación, los pocillos se lavan cuatro veces con tampón de lavado. Luego, se agrega sustrato de TMB a los pocillos, y la placa se incuba a 20-25°C durante 30 ± 1 minuto a oscuras. La reacción se termina por la adición de una solución quelante a todos los pocillos. La absorbancia de cada pocillo se lee en una longitud de onda doble de 450/590-630 nm, y se promedia para cada grupo de resultados. Las densidades ópticas (OD) para cada estándar de referencia se utilizan para construir una curva estándar, por el uso de un ajuste logístico de 4 parámetros. La absorbancia de las muestras de prueba se interpola de la curva estándar. La cantidad de sustrato hidrolizado es directamente proporcional a la concentración de HCP en la muestra. Se verifican los criterios adecuados de idoneidad del sistema para confirmar la validez de la corrida analítica.</p>
Consistencia a Farmacopeas	No aplicable


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

