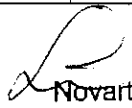




	1°C antes de la medición. La absorbancia se lee a una longitud de onda de 405 nm y las concentraciones de muestra se calculan a partir de los tiempos de reacción respectivos contra una curva estándar. Se verifican los criterios adecuados de idoneidad del sistema para confirmar la validez de la corrida 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 9 Proteínas Residuales de las Células Huésped

Muestras de Prueba	Granel Concentrado
Descripción de la Valoración	<p>Valoración de Novartis:</p> <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.</p> <p>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 Jeroncic
 Director Técnico
 MN 14840

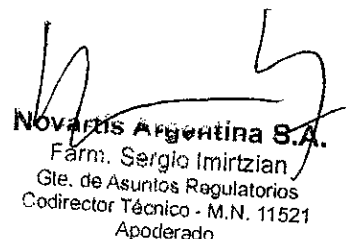

Novartis Argentina S.A.
 Farm. Sergio Imirtzian
 Gte. de Asuntos Regulatorios
 Codirector Técnico • M.N. 11521
 Apoderado

Tabla 10 Identidad por Western Blot

Muestras de Prueba	Granel Concentrado
Descripción de la Valoración	<p>Valoración de Sandoz:</p> <p>Se opera un western blot con anticuerpos policlonales dirigidos contra la proteína recombinante NadA. Las concentraciones de muestra y estándar se ajustan a una concentración nominal, se tratan con un agente reductor, y se calientan. Un volumen especificado para la muestra y el estándar, igual a aproximadamente 1,6 µg de proteína se carga sobre el gel de poliacrilamida; el estándar de proteína recombinante NadA sirve como el estándar de identidad en el análisis de western blot. Un segundo volumen del estándar, con una menor cantidad de proteína (aproximadamente 4% de la cantidad nominal de proteína), se carga sobre el gel para llevar a cabo una prueba de sensibilidad. El tampón de muestra se aplica a los geles como muestra blanco.</p> <p>Las muestras se aplican al gel por duplicado. Además, se cargan un marcador del peso molecular, estándares, y blancos, sobre un gel de poliacrilamida y se separan por electroforesis (separación en un campo eléctrico). Luego de la electroforesis, cada gel se transfiere sobre una membrana de transferencia, transfiriendo las proteínas separadas. Luego, los <i>blots</i> se sondan con anticuerpos policlonales anti-proteína recombinante NadA. El anticuerpo secundario se agrega, seguido por una serie de pasos de lavado y la solución de desarrollo, que contiene el sustrato para la tinción basada en enzimas de las bandas de proteína específicas.</p> <p>Los Western Blots están cualitativamente evaluados por la comparación visual de las bandas para las hileras estándar, blanco y de muestra. La identidad de la proteína recombinante NadA se confirma cuando una banda a la misma migración en la muestra de referencia es visible. 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 Jeronic
 Director Técnico
 MN 14840



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


Tabla 11 Osmolaridad

Muestras de Prueba	Granel Concentrado
Descripción de la Valoración	Valoración de Novartis: Se seleccionan y utilizan dos estándares de calibración para la calibración del instrumento. Se miden cuatro viales del control positivo adecuado y de las muestras de prueba; la primera medición para cada grupo se utiliza para enjuagar la máquina y no se incluye en los cálculos. Los resultados se informan como el promedio de las tres mediciones. El análisis es válido si el control positivo está dentro de ± 4 mOsm/kg del rango de titulación teórico.
Consistencia a Farmacopeas	Ph. Eur. Capítulo 2.2.35 Osmolaridad USP <785> Osmolaridad y Osmolaridad



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



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

Tabla 12 pH

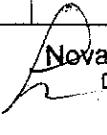
<p>Descripción de la Valoración</p>	<p>Valoración de Sandoz, para liberación del granel concentrado:</p> <p>El medidor del pH se calibra con un mínimo de dos tampones estándar de modo tal que la medición de pH cae dentro del rango definido por los estándares. El electrodo se lava antes de la inmersión en cada solución estándar. Luego de la calibración, se lleva a cabo una prueba de control por el uso de tampones de calibración y al menos un tampón adicional. La calibración se considera válida si las lecturas del estándar de control están dentro de un rango de tolerancia de $\pm 0,02$ unidades de pH según lo comparado con el valor certificado para cada estándar. Una lectura simple se toma para cada muestra a temperatura ambiente (23-25°C) para determinar el pH.</p> <p>Valoración de Novartis, para estabilidad del granel concentrado:</p> <p>El medidor del pH se calibra en tres puntos estándar, por ej., pH 4, pH 7, y pH 10; el electrodo se lava antes de la inmersión en cada solución de tampón estándar. Luego de la calibración, se lleva a cabo una prueba de control por el uso de estándares de pH 9 y pH 6. La calibración se considera válida si las lecturas del estándar de control están dentro de un rango de tolerancia de $\pm 0,02$ unidades de pH según lo comparado con el valor certificado para cada estándar.</p> <p>Para cada muestra, se toman tres lecturas de pH, y se calculan la media, la desviación, y el coeficiente porcentual de variación (CV %). Todas las lecturas de pH se toman en un rango de temperatura de 23-25°C. Se verifican los criterios adecuados de idoneidad del sistema para confirmar la validez de la corrida analítica.</p>
<p>Consistencia a Farmacopeas</p>	<p>Ph. Eur. Capítulo 2.2.3 Determinación Potenciométrica del pH USP <791> pH</p>


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

Tabla 13 Concentración de Proteínas

Descripción de la Valoración	<p>Prueba en Tubo de Ensayo llevada a cabo por Sandoz, para liberación del granel concentrado y por Novartis, para estabilidad del granel concentrado:</p> <p>Los estándares de referencia BSA se diluyen en agua para dar cuatro concentraciones para la curva estándar: 20, 15, 10, y 5 µg/ml. Todas las muestras del granel concentrado de proteína recombinante NadA se colocan a temperatura ambiente, se diluyen en agua para ajustar al rango de concentración de la curva estándar. Además, una muestra de prueba se enriquece con BSA 5 µg/ml para cada dilución probada; la muestra enriquecida sirve como un control de la adecuación del sistema (control de recuperación).</p> <p>Reactivos de Trabajo A (mezcla de carbonato de sodio, bicarbonato de sodio y tartrato de sodio), B (BCA 4% en agua), y C (pentahidrato de sulfato cúprico en agua 4%) se agregan a los tubos para todas las muestras (estándares, blancos, muestras de prueba y muestras de prueba más enriquecimiento), se agitan, e incuban a 60°C durante 60 ± 2 minutos. Todas las muestras se preparan por duplicado. Luego, los tubos se enfrían a temperatura ambiente durante 20 ± 2 minutos y se lee la absorbancia a 562 nm luego de llevar a cabo el autocero con el blanco. Se prepara una curva estándar lineal, se traza la lectura de absorbancia promedio para cada estándar BSA contra su concentración correspondiente, en µg/ml. La concentración de proteínas se determina por calibración externa a partir de la curva estándar de BSA. Se verifican los criterios adecuados de idoneidad del sistema para confirmar la validez de la corrida analítica.</p> <p>Valoración de Placas de Microtitulación llevada a cabo por Sandoz, para controles durante el proceso:</p> <p>Se diluyen estándares BSA en agua para dar dos concentraciones a 30 y 40 µg/ml. Los estándares de referencia BSA para la curva estándar se preparan a partir de estas dos soluciones, que se diluyen a 20, 15, 10, y 5 µg/ml. Todas las muestras de sobrenadante de proteína recombinante NadA luego de centrifugación/filtración se dializan antes del análisis, luego se llevan a volumen en agua, para ajustarse al rango de concentración de la curva estándar. Cada dilución estándar BSA y el blanco se agrega por duplicado a los pocillos. Cada muestra diluida se agrega por triplicado los pocillos adecuados.</p>
-------------------------------------	---


Novartis Argentina S.A.
 Dr. Lucio Jeroncio
 Director Técnico
 MN 14940


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

