

**Tabla 20 Validación de Conductividad**

Validación de Conductividad	
<b>Parámetro Probado</b>	
No aplicable	La prueba de conductividad se lleva a cabo como para Ph. Eur. Capítulo 2.2.38 Conductividad y USP <645> Conductividad en Agua. Dado que el método de prueba es del compendio y la conductividad es un atributo inherente, no se requiere ni se lleva a cabo validación específica del producto, como para Sandoz SOP interno, <i>Validación de Métodos Analíticos para Biofarmacéuticos</i> .

**Tabla 21 Resultados para la Verificación del Método para Endotoxina (Valoración de Sandoz)**

Parámetro Probado	Descripción de la Prueba de Validación	Criterios de Aceptación de Validación	Resultados de Validación
Inhibición/Mejora para el Granel Concentrado	La inhibición y mejora se evaluaron en tres lotes del Granel Concentrado y matrices de muestra de tres lotes de muestras intermedias de proceso de Cromatografía I, II y III y UF/DF 2. Tres diluciones cada muestra probada por cuadruplicado se enriquecieron con 0,5 EU/ml de endotoxina y se compararon con muestras no enriquecidas contra una curva estándar. Se calculó la recuperación de muestras enriquecidas.	La recuperación porcentual de muestras del Granel Concentrado enriquecidas con 0,5 EU/ml de endotoxina debe caer entre 50-200%.	La recuperación porcentual osciló de 109-124%, 107-138%, y 104-108%, para los Lotes del Granel Concentrado B006900, B006901, y B006902, respectivamente.
Inhibición/Mejora para Pasos Intermedios (Soluciones de Proceso)			La recuperación porcentual osciló de 50-146% para Cromatografía I (Operaciones 1 y 2), 111-142% para Cromatografía II, 42-156% para Cromatografía III, y 38-141% para UF/DF 2 para los tres lotes probados.

EU: Unidades de endotoxina

 Novartis Argentina S.A.  
 Dr. Lucio Jeroncia  
 Director Técnico  
 M.N. 14840

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

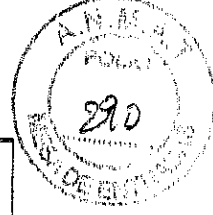



**Tabla 22 Resultados de Validación para Endotoxina (Valoración de Novartis)**

Parámetros Probados	Descripción de la Prueba de Validación	Criterios de Aceptación de la Validación	Resultados de la Validación
Repetibilidad	Tres lotes del Granel Concentrado se probaron por triplicado por dos operadores. Las muestras se enriquecieron con 0,5 IU/ml de endotoxina y se compararon con muestras no enriquecidas contra una curva estándar de diez puntos. Se calculó la recuperación de muestras enriquecidas.	CV % < 20% para cada operador, para cada placa, para cada lote.	<ul style="list-style-type: none"> <li>CV % para Operador 1 = 5,0% y 4,5% para Placas 1 y 2 para el Lote RS14-03-01, 2,2% y 4,0% para Placas 1 y 2 para el Lote RS14-05-01, y 2,7% y 5,8% para Placas 1 y 2 para el Lote TRFASEII02</li> <li>CV % para Operador 2 = 2,1% y 1,2% para Placas 1 y 2 para el Lote RS14-03-01, 3,6% y 10,6% para Placas 1 y 2 para el Lote RS14-05-01, y 3,6% y 2,5% para Placas 1 y 2 para el Lote TRFASEII02.</li> </ul>
Precisión de Intermediarios	Tres lotes del Granel Concentrado se probaron por triplicado por dos operadores. Las muestras se enriquecieron con 0,5 IU/ml de endotoxina y se compararon con muestras no enriquecidas contra una curva estándar de diez puntos. Se calculó la recuperación de muestras enriquecidas.	CV % <25% para resultados combinados por dos operadores.	El CV% combinado fue 10,4%, 9,6%, y 15,0%, para los Lotes RS14-03-01, RS14-05-01, y TRFASEII02, respectivamente.
Exactitud	La exactitud se calcula por el uso de los resultados del estudio de Repetibilidad/Precisión de Intermediarios.	La recuperación porcentual debe caer entre 50-200% del valor teórico.	La recuperación porcentual osciló de 68,9% a 103,2% para los tres lotes.

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

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





<b>Especificidad</b>	La especificidad se calcula con base en los Resultados del Estudio de Exactitud.	Recuperación aceptable de CSE enriquecida para Exactitud.	La recuperación de CSE enriquecido para exactitud fue aceptable para cada lote, demostrando así especificidad.
<b>Linealidad</b>	La linealidad se determinó por la preparación de seis curvas de calibración de seis puntos (cada curva por duplicado). Luego del desarrollo de las reacciones, se llevaron a cabo regresiones lineales sobre las curvas y se determinó el coeficiente de correlación, <i>r</i> .	Coefficiente de correlación de la curva ( <i>r</i> ) > 0,980	<i>r</i> > 0,999 para las tres curvas
<b>Límite de Cuantificación (LOQ)</b>	El LOQ se estableció con base en los datos del estudio de linealidad.	El LOQ se estableció como el punto más bajo de la curva estándar.	LOQ = 0,005 IU/ml

CV% : Coeficiente porcentual de variación; CSE: Endotoxina Estándar de Control

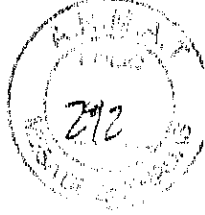
**Tabla 23 Resultados de Validación para las Proteínas Residuales de las Células Huésped**

<b>Parámetros Probados</b>	<b>Descripción de la Prueba de Validación</b>	<b>Criterios de Aceptación de la Validación</b>	<b>Resultados de la Validación</b>
Repetibilidad	Seis repeticiones de dos intermediarios durante el proceso y el granel concentrado de un lote único se probaron por el mismo operador.	CV % ≤ 15% para seis repeticiones del Lote 36438204, para UF/DF 1 y Cromatografía I, y el Lote del Granel Concentrado 48201405res.	CV % fue 8,9%, y 1,9%, para el Lote 36438204 UF/DF 1y Cromatografía I, respectivamente, y 4,6% para el Lote 48201405res.





<p>Precisión de Intermediarios</p>	<p>Tres lotes de granel concentrado, UF/DF 1, y Cromatografía I se evaluaron por dos operadores diferentes tres días diferentes.</p>	<p>CV % &lt; 20% (resultados combinados de ambos operadores), para tres lotes de UF/DF 1, Cromatografía 1, y Granel Concentrado de proteína recombinante NadA.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CV% (combinado) fue 18,4, 8,1, y 10,1 para UF/DF 1 de Lotes 36438203, 36438204, y 36438206, respectivamente;</li> <li>• CV% (combinado) fue 5,0, 5,4, y 4,5 para Cromatografía I de Lotes 48201403, 48201404, y 48201406, respectivamente</li> <li>• CV% (combinado) fue 4,9, 3,9, y 4,9 para el Granel concentrado de Lotes 48201404res, 48201405res, y 48201406res</li> </ul>
<p>Exactitud</p>	<p>Muestras del Estudio de Precisión de Intermediarios se enriquecieron con 20 ng/ml de estándar de referencia de HCP de E. coli y se evaluaron por la recuperación porcentual de muestras enriquecidas.</p>	<p>La recuperación porcentual está entre 75-125% para muestras de precisión de intermediarios enriquecidas con 20 ng/ml del estándar de referencia de</p>	<p>La recuperación porcentual fue 91-119% para los tres lotes de UF/DF 1, 89-108% para los tres lotes de Cromatografía I, y 88-105% para los lotes de Granel concentrado.</p>
<p>Especificidad</p>	<p>Muestras del Estudio de Precisión de Intermediarios se enriquecieron con 20 ng/ml de estándar de referencia de HCP de E. coli y se evaluaron por la recuperación porcentual de muestras enriquecidas.</p>	<p>No se demostró interferencia de los componentes de la matriz por los resultados de la validación de exactitud, con una recuperación de 75-125% de muestras enriquecidas con 20ng/ml del estándar de referencia de HCP de E. coli.</p>	<p>Véanse los resultados para Exactitud</p>
<p>Linealidad</p>	<p>Curvas estándares y resultados de prueba (operadores diferentes y días diferentes) del Estudio de Precisión de Intermediarios se evaluaron para ajuste y linealidad.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Desviación porcentual promedio de OD medida a partir de la OD calculada <math>\leq 20\%</math></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Desviación porcentual promedio de la calculada osciló de -5,2 a 5,1</li> <li>• <math>r^2</math> osciló de 0,9996 a 1,000</li> </ul>






			<ul style="list-style-type: none"> <li><math>r^2</math> para cada curva estándar debe ser <math>&gt; 0,9900</math>.</li> </ul>	
Límite de Detección (LOD)	Validación llevada a cabo por el fabricante del kit.		Dos desviaciones estándar bajo la media del estándar de cero.	LOD = 200 pg/ml, con base en la validación del kit.
Límite de Cuantificación (LOQ)	Validación llevada a cabo por el fabricante del kit.		La cantidad más baja de E. coli que cumple los criterios de aceptación de CV % $< 20\%$ .	LOQ $< 1$ ng/ml, con base en la validación del kit.
Rango	Con base en los resultados de Precisión de Intermedarios, Exactitud, y Especificidad.		Los criterios de aceptación para linealidad, exactitud, precisión, y LOQ deben cumplirse sobre el rango de análisis.	El rango abarca de 1 a 100 ng/ml.

CV%: Coeficiente porcentual de variación; OD: Densidad Óptica

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

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

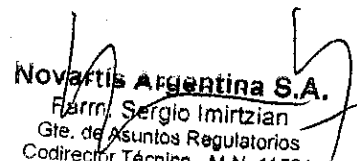




**Tabla 24 Resultados de Validación para Identidad por Western Blot**

Parámetro Probado	Descripción de la Prueba de Validación	Criterios de Aceptación de la Validación	Resultados de la Validación
Especificidad	La matriz de muestra para el Granel Concentrado se analiza con y sin 1µg de proteína recombinante NadA enriquecida.	<ul style="list-style-type: none"> <li>La muestra de matriz blanco no debe mostrar ninguna banda que migre en forma comparable al estándar de proteína recombinante NadA.</li> <li>Para muestras enriquecidas con proteína recombinante NadA, tres bandas principales deben estar visibles y la migración deber comparable al estándar de proteína recombinante NadA.</li> <li>Para muestras de proteína recombinante NadA, no debe estar visible ninguna banda.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>La matriz blanco y las muestras no exhibieron bandas con patrones de migración comparables al estándar de proteína recombinante NadA</li> <li>Se observaron bandas principales para el tampón enriquecido con proteína recombinante NadA con migración comparable al estándar.</li> </ul>

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

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





**Tabla 25 Resultados de Calificación para Osmolaridad**

Parámetro Probado	Descripción de la Prueba de Validación	Criterios de Aceptación de la Validación	Resultados de la Validación
Precisión de Intermediarios	Tres lotes del granel concentrado se evaluaron por dos operadores diferentes tres días diferentes.	El CV% combinado para tres lotes de proteína recombinante NadA, por dos operadores, tres días diferentes, luego de tiempos de espera a temperatura ambiente de 1, 2, y 4 horas antes de la prueba, debe ser < 7%.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CV % (combinado): 0,6 para el Lote No. 48201404</li> <li>• CV % (combinado): 0,4 para el Lote No. 48201405</li> <li>• CV % (combinado): 0,5 para el Lote No. 48201406</li> </ul>

CV%: Coeficiente porcentual de variación

**Tabla 26 Resultados de Calificación para pH**

Parámetros Probados	Descripción de la Prueba de Validación	Criterios de Aceptación de la Validación	Resultados de la Validación
Precisión de Intermediarios	Tres lotes del granel concentrado se evaluaron por dos operadores diferentes tres días diferentes.	El CV% combinado para cada uno de los tres lotes de proteína recombinante NadA, por dos operadores, tres días diferentes, luego de tiempos de espera a temperatura ambiente de 1, 2, y 4 horas antes de la prueba, deben ser < 3%.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CV % (combinado): 1,2 para el Lote No. 48201404</li> <li>• CV % (combinado): 0,6 para el Lote No. 48201405</li> <li>• CV % (combinado): 0,8 para el Lote No. 48201406</li> </ul>

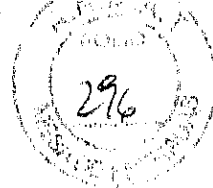
 Novartis Argentina S.A.  
 Dr. Lucio Jeroncio  
 Director Técnico  
 MN 14840


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




**Tabla 27 Resultados de Validación para el Método Micro-BCA de Placas de Microtitulación para la Concentración de Proteínas (Sandoz)**

Parámetros Probados	Descripción de la Prueba de Validación	Criterios de Aceptación de la Validación	Resultados de la Validación
Especificidad	La influencia de los componentes del tampón se evaluó sobre las muestras de la matriz de Cromatografía II, II, y III, UF/DF 1, y Granel Concentrado.	La concentración calculada de proteína en tampones blanco debe estar por debajo del estándar de calibración más bajo.	Criterios de aceptación cumplidos.
Linealidad	La linealidad se determinó a partir de las curvas de calibración preparadas para el Estudio de Exactitud.	$r^2 \geq 0,99$	$r^2 = 0,9966$ y $0,9961$ para curvas de calibración generadas por los Operadores 1 y 2, respectivamente.
Exactitud	Muestras de matriz de Cromatografía II, II, y III; e intermedios de proceso de UF/DF 1 se enriquecieron con proteína recombinante NadA en una concentración, y UF/DF 2/ Granel Concentrado en tres concentraciones. Todas las muestras se llevaron a cabo por triplicado.	Recuperación porcentual media 70-130%.	La recuperación promedio osciló de 111-120%.
Repetibilidad	Los resultados del Estudio de Exactitud se evaluaron para Repetibilidad.	CV % < 15%	CV % osciló de 0,5% a 8,9%.
Precisión de Intermedios	Los resultados del Estudio de Exactitud y Repetibilidad se evaluaron para la Precisión de Intermedios.	CV % $\leq$ 15% para cada operador; la diferencia porcentual relativa entre ambos operadores $\leq$ 10%.	El CV% más elevado fue 8,9% y 5,5% para los Operadores 1 y 2, respectivamente; la diferencia porcentual relativa -4,6 a 5,5%.





**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



Rango	El rango se determinó a partir de los resultados de los Estudios de Linealidad, Exactitud, y Precisión.	Establecidos con base en los resultados de linealidad, precisión, y exactitud de la validación.	Osciló de 15-40 µg/ml
Resistencia	El elaborador del kit ha evaluado el kit para la variación lote a lote en reactivos y materiales de referencia, así como también en sustancias interferentes. Novartis ha evaluado la interferencia de la matriz.	Incluidos como parte de la validación del método.	Se cumplen todos los criterios.

  
 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





**Tabla 28 Resultados de Validación para el Método Micro-BCA de Tubos de Ensayo para Concentración de Proteínas (Valoración de Novartis)**

Parámetros Probados	Descripción de la Prueba de Validación	Criterios de Aceptación de la Validación	Resultados de la Validación
Especificidad	Una matriz sintética se preparó por triplicado, compuesta por sustancias probablemente interferentes del proceso de elaboración del principio activo, en los peores casos de concentraciones.	Diferencia entre la absorbancia promedio a 562 nm para el blanco y la matriz sintética $\leq 0,0500$ .	La diferencia entre la absorbancia promedio para el blanco y la matriz sintética fue 0,009.
Linealidad	Seis repeticiones de una curva estándar de BSA de cinco puntos se prepararon y evaluaron para linealidad. Se prepararon seis repeticiones de diluciones seriales de muestra a través de las concentraciones en el rango lineal de valoración.	$r^2 > 0,995$	$r^2 = 0,998$ para el estándar y 0,9995 para la muestra.
Exactitud	Muestras de los tres lotes del Granel Concentrado se diluyeron por triplicado a niveles inferiores al punto más bajo sobre la curva estándar, luego se enriquecieron con cantidades variables de BSA. Se calculó la recuperación de muestras enriquecidas.	La recuperación porcentual promedio para las muestras de los tres lotes enriquecidos con BSA 5, 10 y 15 $\mu\text{g/ml}$ debería ser 80-120%.	Rango de recuperación porcentual: 96-102%, 94-101%, y 93-104%, para Lotes TRFASEI02, RS14-03-01, y RS14-05-01, respectivamente.
Repetibilidad	Se evaluaron seis repeticiones de un lote único de granel concentrado.	$\text{CV} \% \leq 5\%$ para análisis de seis repeticiones en una sesión analítica única.	$\text{CV} \% = 2,0\%$

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

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





<p>Precisión de Intermediarios</p>	<p>Parte 1: Tres lotes del granel concentrado se evaluaron por dos operadores diferentes tres días diferentes. Se evaluó la variabilidad en ciertos parámetros de operación. Parte 2: Muestras de dos lotes se diluyeron a niveles en las partes más bajas y más elevadas de la curva estándar. Se evaluó la variabilidad en ciertos parámetros de operación.</p>	<p>El CV% combinado para los lotes r proteína recombinante NadA por operadores múltiples debe ser &lt;7%.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Parte 1: CV % (combinado) = 5,4%, 6,6%, y 2,6%, para los Lotes N° TRFASEII02, RS14-03-01, y RS14-03-01, y RS14-05-01, respectivamente.</li> <li>• CV% (combinado) 2% y 3% para los Lotes 48201402 y 48201403, respectivamente.</li> </ul>
<p>Rango</p>	<p>El rango se determinó a partir de los resultados de los Estudios de Linealidad, Precisión, y Exactitud.</p>	<p>Establecidos con base en los resultados de linealidad, precisión, y exactitud de la validación.</p>	<p>Rango de 5-20 µg/ml.</p>
<p>Resistencia</p>	<p>Se llevaron a cabo estudios de resistencia con respecto al tiempo de incubación y a la temperatura de la muestra. 1) Las muestras se incubaron hasta 10 minutos más que los 60 minutos requeridos por el SOP. 2) Las muestras se incubaron a 60 ± 5°C.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La diferencia entre las concentraciones de proteínas de muestra en los tiempos de incubación de 60-65-70 minutos no fue mayor que la diferencia máxima para la prueba de precisión de intermediarios para el Lote RS14-05-01 (99,7 µg/ml).</li> <li>• La diferencia entre las concentraciones de proteínas de muestra a las temperaturas de incubación de 55-60°C y 60-65°C no fue mayor que la diferencia máxima para la prueba de precisión de intermediarios para el Lote RS14-05-01 (99,7 µg/ml).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Las diferencias máximas entre resultados a 60-65 y 65-70 minutos fueron de 2,3 y 47,6 µg/ml, respectivamente.</li> <li>• Las diferencias máximas entre resultados a 55-60°C y 60-65°C fueron de 65,2 y 3,4 µg/ml, respectivamente.</li> </ul>

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

