

Tabla 29 Resultados de Validación para la Transferencia del Método Analítico para la Concentración de Proteínas del Método Micro-BCA de Tubos de Ensayo de Novartis a Sandoz

Parámetros Probados	Descripción de la Prueba de Validación	Criterios de Aceptación de la Validación	Resultados de la Validación
Reproducibilidad	Tres lotes del Granel Concentrado se evaluaron por dos operadores diferentes dos días diferentes.	<ul style="list-style-type: none"> • CV % para ambos operadores en cada laboratorio ≤ 7 %, para cada lote. • CV % combinado para todos los operadores, en ambos laboratorios ≤ 10 %, para cada lote. • $p > 0,01$ para la prueba t de Student para cada análisis combinado en laboratorio o si la alta precisión de resultados, s i CV% y la diferencia entre las medias de laboratorio es $\leq 10\%$. 	<ul style="list-style-type: none"> • CV% combinado para dos operadores en el laboratorio de Novartis: 2,4, 2,4, y 3,1%, y para el laboratorio de Sandoz: 3,0, 3,4, y 3,2%, para B006900, B006901, y B006902, respectivamente. • CV% combinado para todos los operadores: 2,6, 3,2, y 3,3% para Lotes B006900, B006901, y B006902, respectivamente. • $\text{prob} > t = 0,73, 0,12, 0,18$ para Lotes B006900, B006901, y B006902, respectivamente. • diferencia porcentual entre las medias de laboratorio: 0,56, 2,86, y 2,63%, para Lotes B006900, B006901, y B006902, respectivamente.

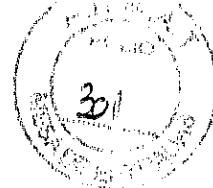
Novartis Argentina S.A.
Dr. Lucio Jeroncio
Director Técnico
MN 14840

Novartis Argentina S.A.
Farm. Sergio Imirtzian
Gte. de Asuntos Regulatorios
Codirector Técnico - M.N. 11521
ApederBd0



Tabla 30 Resultados de Validación para RP-HPLC

Parámetros Probados	Descripción de la Prueba de Validación	Criterios de Aceptación de la Validación	Resultados de la Validación
Especificidad	Matrices de muestra de Cromatografía II, y III; UF/DF; y granel concentrado se analizan enriquecidas y no enriquecidas con proteína recombinante NadA.	Sin interferencia de los componentes de matriz.	Sin interferencia de los componentes de matriz observada para el contenido, pureza, o integridad.
Linealidad	Se evaluaron tres repeticiones de siete diluciones del estándar de referencia de proteína recombinante NadA.	El coeficiente de correlación (r) debe ser $\geq 0,990$ para el contenido.	r = 0,9980
Exactitud	La exactitud de los resultados del contenido determinada a partir de los datos de linealidad y del enriquecimiento de las matrices durante el proceso (Cromatografía I y II; y UF/DF) comparada con la del contenido teórico.	<p>$r \geq 0,990$ e intersección "y" < 10% del área de pico promedio del estándar de referencia de 0,125 µg/ml. Para el contenido, la recuperación porcentual debe estar entre 90-110% para concentraciones del estándar de referencia que oscilan de 0,050 a 0,250 mg/ml y entre 80-120% para una concentración de 0,025 mg/ml.</p> <p>Para el contenido, la recuperación porcentual debe estar entre 80-120% para las concentraciones de muestras durante el proceso que oscilan de 0,050 a 0,250 mg/ml, y entre 70-130% para una concentración de 0,025 mg/ml.</p>	<p>r=0,9998; intersección "y": -0,577 para el contenido, pureza, e integridad.</p> <p>Para el contenido, todas las recuperaciones porcentuales cumplen la especificación excepto por las muestras a 0,025 mg/ml. La fórmula de cálculo se modificó para alinearse con el software; se cumplieron todos los criterios de aceptación.</p>



Límite de Detección (LOD)	Se evaluaron seis repeticiones en tres diluciones del estándar de referencia de proteína recombinante NadA.	Para pureza e integridad, Proporción S/N ≥ 3	LOD = 0,0025 mg/ml (Proporción S/N = 99).
Límite de Cuantificación (LOQ)	Se evaluaron seis repeticiones en tres diluciones del estándar de referencia de proteína recombinante NadA.	Para pureza e integridad, Proporción S/N ≥ 10	LOQ = 0,0025 mg/ml (Proporción S/N = 99).
Rango	El rango se determinó a partir de los resultados de los estudios de linealidad, exactitud, y precisión.	Deben satisfacerse los criterios para linealidad, exactitud, y precisión.	Para el contenido, el rango es 0,025-0,250 mg/ml para el estándar de referencia de proteína recombinante NadA y 0,125-0,250 para muestras durante el proceso. Para pureza e integridad, el rango es 0,025-0,250 mg/ml para el estándar de referencia y 0,125-0,250 para muestras durante el proceso.

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



<p>Repetibilidad</p>	<p>Se evaluaron los datos de desviación estándar a partir del estudio de linealidad, muestras de control durante el proceso, y a partir de datos de los estudios de enriquecimiento de matrices durante el proceso.</p>	<p>Para el contenido si 1) RSD% \leq 5% para todas las concentraciones sobre 0,025 mg/ml y RSD \leq 10% para la concentración a 0,025 mg/ml del estándar de referencia; 2) matrices durante el proceso enriquecidas con estándar de referencia, RSD \leq 5% para el nivel 0,100 y 0,200 mg/ml y RSD \leq 10% para el nivel 0,025 mg/ml; y 3) muestras de elaboración durante el proceso, RSD \leq 10% para concentraciones $<$ 0,5 mg/ml y la RSD \leq 5% para concentraciones \geq 0,5 mg/ml. Para la pureza e integridad, RSD \leq 5% para muestras $>$ 50% y RSD \leq 10% para muestras con pureza e integridad \leq 50%</p>	<p>Se cumplieron todos los criterios para el contenido, pureza e integridad.</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

<p>Precisión de Intermediarios</p>	<p>Se evaluaron seis muestras durante el proceso (Cromatografía I y II y UF/DF) por dos operadores.</p>	<p>Para el contenido, 1) RSD \leq 5% para purezas > 50% y RSD \leq 10% para purezas \leq 50%; 2) RSD \leq 5% para integridad > 50% y RSD \leq 5% para integridad \leq 50%; y 3) RSD \leq 10% para concentraciones de proteína < 0,500 mg/ml y RSD \leq 5% para concentraciones \geq 0,500 mg/ml. Además, la diferencia en integridad relativa y pureza relativa entre los dos operadores debe ser \leq 5%, y \leq 10% para el contenido.</p>	<p>Se cumplieron todos los criterios de aceptación.</p>
<p>Resistencia</p>	<p>La valoración se evaluó por la resistencia de los parámetros operacionales (por ej., caudal de flujo), la temperatura de muestras, y el número de ciclos de congelamiento/descongelamiento permitibles. La estabilidad de muestras se evaluó por el análisis de muestras 24 a 72 horas después de cada preparación, por triplicado.</p>	<p>Para la pureza e integridad, la diferencia relativa porcentual promedio al Tiempo 0 debe ser \leq 5% para el estándar de referencia. Para el contenido, la diferencia relativa porcentual promedio al Tiempo 0 debe ser 85-115% para el estándar de referencia.</p>	<p>Para el contenido, pureza, e integridad, el estándar de referencia puede almacenarse a 2-8°C en el automuestreador durante hasta 72 horas.</p>

RSD: Desviación Estándar Relativa; S/N: Proporción Señal:Ruido


 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

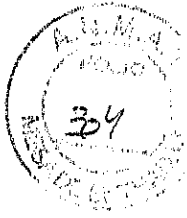
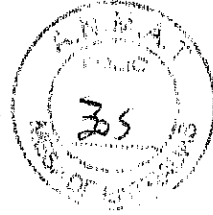


Tabla 31 Resultados de Validación para Pureza/Integridad por SDS-PAGE (Valoración de Sandoz)

Parámetros Probados	Descripción de la Prueba de Validación	Criterios de Aceptación de la Validación	Resultados de la Validación
Especificidad	Muestras de tampones de UF/DF, Cromatografía, y UF/DF/granel concentrado se enriquecieron con estándar en una concentración y se sometieron a electroforesis con tampones no enriquecidos y estándar.	Las muestras de blanco no mostraron ninguna banda que migrara comparablemente con el estándar. En hileras cargadas con la matriz de muestra enriquecida, tres bandas principales deben estar visibles y la migración debe ser comparable al estándar.	Criterios de aceptación cumplidos.
Linealidad	Se evaluó una curva estándar de ocho puntos.	El coeficiente de correlación (r) > 0,950.	$r = 0,974$
Exactitud	La muestra se operó en ocho diluciones. Las bandas sobre el gel teñido se cuantificaron por densitometría. Los resultados se evaluaron por análisis de regresión lineal.	La intensidad de la primera banda menor de estándar a 10 µg y la banda principal de tampón enriquecido a 0,6 µg debe ser comparable.	La banda principal de tampón enriquecido diluido fue comparable a la banda menor de estándar, con base en una comparación visual.
Límite de Detección (LOD)	Descrito en la Tabla 32.	Proporción S/N del estándar de calibración menor > 5	LOD = 0,5 µg (Proporción S/N = 37).
Límite de Cuantificación (LOQ)	Descrito en la Tabla 32.	Proporción S/N del estándar de calibración menor > 10	LOQ = 1,5 µg (Proporción S/N = 110).
Rango	Los resultados del Estudio de Linealidad se evaluaron para determinar el rango.	Debe abarcar de 15% a 100% de pureza. Deben satisfacerse los criterios para linealidad.	El rango abarca de 100% (10 µg) a 1,5% (1,5 µg) de pureza.

Novartis Argentina S.A.
 D. Sergio Peronec
 Director Técnico
 MN 14846

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



<p>Repetibilidad</p>	<p>La muestra de sobrenadante anterior a tampones de UF/DF 1, Cromatografía I, y granel concentrado se enriquecieron con tres concentraciones de estándar y se analizaron por triplicado.</p>	<p>CV % < 10%</p>	<p>Para el sobrenadante, CV% osciló de 0,6-1,1 para integridad y 1,2-1,5 para pureza Para Cromatografía I, CV% osciló de 0,4-1,3 para integridad y 0,9-1,5 para pureza Para el granel concentrado, CV% osciló de 0,4-1,1 para integridad y 0,9-1,6 para pureza</p>
<p>Precisión de Intermediarios</p>	<p>La muestra de sobrenadante anterior a tampones de UF/DF 1, Cromatografía I, y granel concentrado se enriquecieron con tres concentraciones de estándar por dos operadores diferentes dos días diferentes.</p>	<p>CV% < 15% para análisis cúadruple.</p>	<p>Para el sobrenadante, CV% osciló de 0,5-1,2 para integridad y 1,0-2,3 para pureza Para Cromatografía I, CV% osciló de 0,9-1,0 para integridad y 1,1-1,4 para pureza Para el granel concentrado, CV% osciló de 0,3-1,21 para integridad y 0,8-1,9 para pureza</p>
<p>Resistencia</p>	<p>Se llevaron a cabo estudios para evaluar parámetros tales como estabilidad de solución de parámetros de tinción, variación de geles de lote a lote, y hardware y software del densitómetro.</p>	<p>Incluidos como parte de la validación del método.</p>	<p>Se cumplen todos los criterios.</p>

S/N: Proporción Señal/Ruido; CV%: Coeficiente porcentual de variación.

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

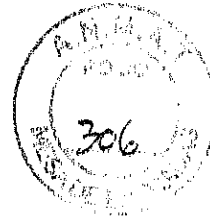


Tabla 32 Resultados de Validación para Cuantificación por SDS-PAGE (Valoración de Sandoz)

Parámetros Probados	Descripción de la Prueba de Validación	Criterios de Aceptación de la Validación	Resultados de la Validación
Especificidad	El caldo de fermentación se enriquece con proteína recombinante NadA.	Las muestras de blanco no deben mostrar ninguna banda que migre en forma comparable con el estándar. En hileras cargadas con la matriz de muestra enriquecida, tres bandas principales deben estar visibles y la migración debe ser comparable al estándar.	Criterios de aceptación cumplidos.
Linealidad	Los resultados del Estudio de Exactitud se evaluaron para determinar la linealidad.	El coeficiente de correlación (r) > 0,950.	$r = 0,985, 0,995, 1,000, 0,991, \text{ y } 0,994$, para Geles 165, 184, 185, 186, y 187, respectivamente.
Exactitud	El caldo de fermentación se enriquece con proteína recombinante NadA en tres concentraciones y se opera sobre tres geles. Las bandas teñidas se evaluaron por densitometría y se calculó la recuperación.	Recuperación media porcentual entre 80-120%.	La recuperación media porcentual fue de 109,6, 102,2, y 101,1, para muestras enriquecidas con 2,0, 4,0, y 5,0 μg , respectivamente.
Límite de Detección (LOD)	La concentración más baja de estándar (0,5 $\mu\text{g}/\text{pocillo}$) se evaluó para Señal a Ruido de acuerdo con la fórmula $S/N = 2 - H/h$, donde H es altura pico y h es el rango de ruido sobre el electroferograma.	Proporción S/N del estándar de calibración más bajo >5.	LOD = 0,5 μg (Proporción S/N = 37).

