

### 3) CONTROL DE CALIDAD - METODOS CONTROL

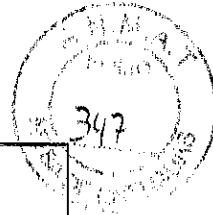
#### 3.1 Especificaciones

Se proporciona en la tabla a continuación una síntesis de las pruebas y especificaciones para la liberación del granel concentrado estéril de Vesículas de la Membrana Externa (OMV).

**Tabla 3 Especificaciones de Liberación para el Granel Concentrado de Vesículas de la Membrana Externa (OMV)**

Prueba	Método de Análisis	Referencia	Especificación Corriente
Pureza			≥ 67%
Patrón de Proteínas	SDS-PAGE	Interna	Presencia y porcentaje de proteínas de OMV confirmadas 80 kD (Omp85) 1-4% 70 kD (FrpB) ≤ 5% Clase 1 17-25% Clase 3 + FbpA 29-55% Clase 4 4-10% Clase 5 1-5% NspA 1-7% 70 kD (FrpB) presente
Concentración de Proteínas	Valoración de Proteínas Lowry	Interna	450-1320 µg/ml
Identidad	Western Blot	Interna	Presencia de proteínas de OMV confirmadas Clase 1 (PorA P1.4) Clase 3 (Serotipo 4) Clase 5 (Opc) LPS 3, 7, 9
Apariencia	Inspección visual	Interna	Líquido opalescente, incoloro a ligeramente amarillo, libre de precipitados visibles
pH	Potenciometría	Ph. Eur./USP	7,0-8,3
Endotoxina/Proteína	Prueba cromogénica cinética/cálculo	Ph. Eur./USP	< 1,000 IU/µg
ADN/Proteína	Espectrofluorometría/cálculo	Interna	≤ 0,010 µg/µg de proteína
Desoxicolato/Proteína	Reacción y colorimetría de enzimas/cálculo	Interna	0,1-0,4 µg/µg de proteína
LPS/Proteína	RP-HPLC/cálculo	Interna	0,05-0,15 µg/µg de proteína





Sacarosa	Espectrofotometría/ cálculo	Interna	2,7-4,1%
Esterilidad	Filtración de membrana	Ph. Eur.	Estéril

FbpA: Proteína A de unión a Fibronectina; FrpB: Proteína de la membrana externa regulada por hierro (FetA); IU: Unidades Internacionales; LPS: Lipopolisacárido; NspA: Proteína A de Superficie de Neisseria; OMP: Proteína de la Membrana Externa ; Opc: Proteína Clase 5 C; OMV: Vesículas de la Membrana Externa; Ph. Eur.: Farmacopea Europea; PorA: Porina A; SDS-PAGE: Electroforesis en gel de dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida; RP-HPLC: Cromatografía líquida de alto rendimiento en fase invertida; USP: Farmacopea de los Estados Unidos

### 3.2 Procedimientos Analíticos

Se describen en las siguientes tablas los procedimientos analíticos para los intermediarios y el granel estéril de OMV.

**Tabla 4 Apariencia**

Muestras de Prueba	Granel Estéril (liberación y estabilidad)
Descripción de la Valoración	Contenidos de un mínimo de tres dispensadores se examinan contra un fondo negro para evaluar la transparencia o claridad, y contra un fondo blanco para evaluar la coloración; ambos exámenes se llevan a cabo bajo condiciones de luz difusa. La prueba es satisfactoria si el líquido es opalescente, incoloro a ligeramente amarillo, y libre de precipitados visibles.

**Tabla 5 Desoxicolato**

Muestras de Prueba	Granel Estéril
Descripción de la Valoración	<p>Para generar una curva de calibración, un estándar simple de DOC se prepara a concentraciones que oscilan de 6,25 a 50,0 µg/ml. Se diluyen muestras de prueba para que caigan dentro de la curva de calibración de DOC y se preparan por triplicado. Un blanco se prepara con agua, por duplicado. Un segundo grupo de estándares de DOC, blancos, y muestras de prueba, para cada punto en la curva de calibración, se preparan para servir como controles negativos.</p> <p>A cada grupo de estándares, blancos, y tubos de prueba, se agregan los reactivos 3-α-HSD, NAD<sup>+</sup>, y diaforasa). Al segundo grupo que sirve como los controles negativos, únicamente se agregan diaforasa y NAD<sup>+</sup>. Todos los tubos se agitan por vórtex y se colocan en un baño de agua a 37 ± 1°C durante 15 ± 1 minutos. Luego de la incubación, se agrega una cantidad especificada de HCl 200 mM, los tubos se agitan por vórtex, y se leen con el espectrofotómetro luego de 15 minutos. La absorbancia se lee a una longitud de onda de 540 nm. En primer lugar, espectrofotómetro se calibra por el uso del control negativo</p>

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

Novartis Argentina S.A.  
Ergio Imirtzian  
Asuntos Regulatorios  
Director Técnico - M.N. 11521  
Apoderado

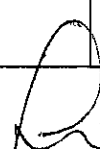




blanco y se leen las absorbancias de todos los controles negativos. El espectrofotómetro se calibra por el uso del blanco y, luego, se leen las absorbancias de todos los estándares y las muestras de prueba. La absorbancia de cada control negativo se sustrae de su estándar y muestra correspondiente. La concentración de DOC en la muestra se determina por comparación con la curva de calibración. Se verifican los criterios adecuados de idoneidad del sistema para confirmar la validez de la corrida analítica.

**Tabla 6 ADN**

Muestras de Prueba	Granel Estéril
<p><b>Descripción de la Valoración</b></p>	<p>Se diluyen muestras de prueba en tampón de dilución a una concentración aproximada de 100 µg/ml de proteína y se tratan con SDS y proteinasa-K a <math>56 \pm 2^\circ\text{C}</math> durante un mínimo de 16 horas. Luego, las muestras se diluyen (de ser necesario) a diluciones validadas/optimizadas. Una muestra enriquecida también se prepara para cada muestra.</p> <p>El ADN del Estándar de Referencia y todas las muestras de prueba, muestras de prueba enriquecidas y controles negativos (tampón de dilución) y controles negativos enriquecidos se desnaturalizan por el calentamiento a <math>105 \pm 5^\circ\text{C}</math> durante un mínimo de 15 minutos.</p> <p>Para generar una curva estándar, se preparan dos diluciones seriales de dos veces la cantidad del ADN desnaturalizado del Estándar de Referencia, de 400 a 6,3 pg/ml. Las muestras, la curva estándar y los controles se incuban con el reactivo de marcación, que consiste en anticuerpo anti-ss-ADN conjugado con la enzima ureasa, proteína <i>E. coli</i> de unión en hebra simple biotinilada, y estreptavidina, a <math>37 \pm 1^\circ\text{C}</math> durante <math>60 \pm 5</math> minutos. Luego, el complejo formado se filtra a través de una membrana adhesiva de nitocelulosa biotinilada y se lava para eliminar el complejo no unido residual. El adhesivo se coloca en la cavidad del lector que contiene la solución de sustrato (urea). La hidrólisis de urea por la enzima ureasa cambia el pH local, que cambia la superficie potencial sobre el sensor. La tasa de cambio en la superficie potencial es proporcional a la cantidad de ADN. Este cambio se monitorea en forma cinética y las mediciones cinéticas se analizan por la computadora y se cuantifican contra la curva estándar. Se verifican los criterios adecuados de idoneidad del sistema para confirmar la validez de la corrida analítica.</p>

  
**Novartis Argentina S.A.**  
 Dr. Lucio Jeronic  
 Director Técnico  
 MN 14840

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




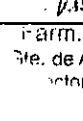
**Tabla 7 Endotoxina**

Muestras de Prueba	Granel Concentrado Estéril (liberación y estabilidad)
<p align="center"><b>Descripción de la Valoración</b></p>	<p>Se lleva a cabo en la prueba de rutina una prueba de inhibición/aumento. Las muestras se diluyen y dos pocillos que contienen muestra 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 50 IU/ml.</p> <p>La muestra y las diluciones de la curva estándar y el control negativo se siembran en una placa de microtitulación de 96 pocillos y se preincuban durante 10 minutos a <math>37 \pm 1^\circ\text{C}</math>. Luego de la adición del reactivo LAL a cada pocillo, las placas se agitan durante 30 segundos a <math>37 \pm 1^\circ\text{C}</math> 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.</p>
<p><b>Consistencia a Farmacopeas</b></p>	<p>Ph. Eur. Capítulo 2.6.14 Endotoxinas Bacterianas USP NF &lt;85&gt; Prueba de Endotoxinas Bacterianas</p>

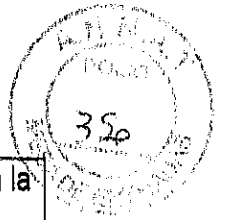
**Tabla 8 Identidad**

Muestras de Prueba	Granel Concentrado Estéril
<p align="center"><b>Descripción de la Valoración</b></p>	<p>La muestra y las concentraciones estándar se ajustan con tampón de muestra a una concentración nominal y se tratan con un agente reductor. La muestra se somete a desnaturalización por calentamiento antes de la carga sobre el gel de poliacrilamida. Una aplicación simple de estándar, muestra, control negativo (tampón), y estándar de peso molecular se agrega al gel, y se separa por electroforesis (separación en un campo eléctrico). Luego de la electroforesis, cada gel se transfiere sobre una membrana de nitrocelulosa, transfiriendo las proteínas separadas por aplicación de una corriente eléctrica.</p> <p>Luego, la membrana se incuba con una solución bloqueante para reducir la unión no específica. Luego, la membrana se sondea con anticuerpos específicos principales a antígenos OMV. Se agrega el anticuerpo secundario, seguido por una serie de pasos de</p>


**Novartis Argentina S.A.**  
 Dr. Lucio Jeronic  
 Director Técnico  
 MN 14840


**Farm. Sergio Imirtzian**  
 Dpto. de Asuntos Regulatorios  
 Director Técnico - M.N. 11521  
 Poderado





	<p>lavado y la solución de desarrollo (que contiene el sustrato para la tinción basada en enzimas de las bandas de proteína específicas). La identidad de muestra se confirma por la intensidad y migración comparables de las bandas coloreadas al estándar de referencia de OMV correspondiente. Se verifican los criterios adecuados de idoneidad del sistema para confirmar la validez de la corrida analítica.</p>
--	---

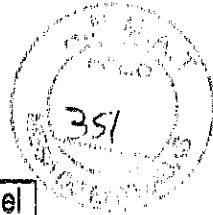
**Tabla 9      Contenido de LPS**

<b>Muestras de Prueba</b>	<b>Granel Estéril</b>
<p><b>Descripción de la Valoración</b></p>	<p>Para generar una curva de calibración, se preparan cinco concentraciones, que oscilan de 0,46 a 7,40 nmol (que corresponde a 0,1 – 1,6 µg/vial), del estándar de referencia, 3-OH-12:0 en acetonitrilo y una concentración especificada simple del Estándar Interno, 3-OH-13:0. Se lleva a cabo una serie de pasos de preparación para cada muestra y estándar de referencia de control positivo. El primer, la homogeneización, se lleva a cabo vía la sonicación del material. Las muestras y el estándar de referencia se dividen en alícuotas en cuatro tubos de ensayo repetidos, a los que se agrega etanol frío y NaCl, y los tubos se colocan a -20°C o hasta el día siguiente para precipitar. Luego, los tubos de ensayo se centrifugan a 4°C durante 10 minutos; los pellets se lavan con etanol 70% y se recentrifugan. El paso de hidrólisis se lleva a cabo por la adición de TFA a cada tubo de ensayo; que libera LPS por hidrólisis de ácido. Un blanco de reacción, ciego, se prepara en paralelo a las muestras y estándares de referencia, para verificar la presencia en el cromatograma de picos de reactivos de reacción. El Estándar Interno, 3-OH-13:0, se agrega a la muestra en el paso de hidrólisis para medir la pérdida de ácidos grasos específicos de LPS durante los pasos de preparación posteriores. Todos los tubos se colocan en un horno a 100 ± 5°C, durante 17 horas, y luego se enfrían a temperatura ambiente. Luego, las muestras hidrolizadas se purifican y concentran por el paso a través de una columna en fase sólida. Las muestras, los estándares de referencia y calibración se someten a un paso de derivatización en el que se agregan bromoacetofenona y trietilamina. El material se coloca en un horno a 100 ± 5°C, durante 15 minutos, luego de lo que se agrega ácido acético y se lleva a cabo un tratamiento térmico adicional (a 100 ± 5°C, durante 5 minutos).</p> <p>Una repetición del estándar de referencia sirve como una muestra</p>

*[Signature]*  
**Novartis Argentina S.A.**  
 Dr. Lucio Peroncio  
 Director Técnico  
 MN 14840

**Novartis Argentina S.A.**  
 Farm. Sergio Imirtzian  
 Gle. de Asuntos Regulatorios  
 Codirector Técnico - M.N. 11521  
 Anodera





	<p>de prueba de adecuación del sistema (SST) para evaluar el desempeño de la separación del sistema cromatográfico; la fase móvil (acetonitrilo) sirve como el blanco. La columna se equilibra con la fase móvil antes del uso. Cada secuencia de inyección incluye una inyección del blanco al comienzo de la secuencia, el estándar de referencia para verificar la sensibilidad del sistema de detección. Las muestras de calibración se inyectan una sola vez para obtener la curva de calibración, seguido por cuatro repeticiones de las muestras de prueba y los controles positivos restantes y el ciego. La columna se opera a las condiciones validadas, con detección de absorbancia de UV a 240 nm para todas las muestras y estándares de referencia excepto para la idoneidad del sistema SST, que se lee a una absorbancia de 254 nm. Se llevan a cabo análisis utilizando sistema de evaluación de datos Empower Waters (o equivalente). La curva de calibración se construye por la interpolación de la cantidad de 3-OH-12:0 versus la proporción 3-OH-12:0 - 3-OH-13:0 de la altura del pico. La cantidad de 3-OH-12:0 en la muestra se determina a través de la misma proporción (3-OH-12:0/3-OH-13:0) que se calcula en forma automática por el software.</p> <p>La concentración de LPS se calcula en forma automática de acuerdo con una fórmula específica que toma en cuenta la relación entre los ácidos grasos (3-OH-12:0) y LPS, es decir, 2 moles de 3-OH-12:0 por mol de LPS. . Se verifican los criterios adecuados de idoneidad del sistema para confirmar la validez de la corrida analítica.</p>
--	--

**Tabla 10      pH**

<b>Muestras de Prueba</b>	Granel Estéril (liberación y estabilidad)
<b>Descripción de la Valoración</b>	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 una de las soluciones de tampón estándar. Luego de la calibración, se lleva a cabo una prueba de control por el uso de los 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. Se verifican los criterios adecuados de idoneidad del sistema para confirmar la validez de la corrida analítica.
<b>Consistencia a Farmacopeas</b>	Ph. Eur. Capítulo 2.2.3 Determinación Potenciométrica del pH USP <791> pH

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

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



**Tabla 11 Concentración de Proteínas (Valoración Lowry)**

<b>Muestras de Prueba</b>	Granel Estéril (liberación y estabilidad) Controles durante el proceso (referencia Sección 2.5 Controles de Pasos Críticos e Intermedios)
<b>Descripción de la Valoración</b>	<p>Para generar la curva estándar, se prepara BSA, por triplicado, a concentraciones que oscilan de 12,5 a 112,5 µg/ml. Una estándar de BSA se prepara a una concentración de 125 µg/ml. Cada muestra de proteína se diluye por triplicado para que calga dentro de la parte central de la curva estándar de BSA. Un blanco se prepara, por duplicado, con agua.</p> <p>Las proteínas de muestra, los estándares de BSA y el blanco se trata con sulfato de cobre alcalino en presencia de tartrato, que causa una reacción que produce iones de cobre. El reactivo de fenol de Folin-Ciocalteu diluido se agrega a cada tubo, se agita por vórtex e incuba durante 60-120 minutos a temperatura ambiente. Los contenidos se transfieren a una cubeta y se mide la absorbancia a 750 nm. La concentración de proteínas se calcula por la comparación de la densidad óptica (OD) de la solución de proteína con la OD de los estándares de proteína de BSA. Se verifican los criterios adecuados de idoneidad del sistema para confirmar la validez de la corrida analítica.</p>

**Tabla 12 SDS-PAGE**

<b>Muestras de Prueba</b>	Granel concentrado (determinación de pureza, para pruebas de liberación y estabilidad)
<b>Descripción de la Valoración</b>	<p>El estándar de referencia de OMV se diluye con tampón de muestra que contiene agente reductor, se calienta, y agrega a los pocillos adecuado. Se diluyen muestras de prueba en tampón de muestra y agente reductor para dar un rango de concentración especificado de proteínas totales por pocillo; las muestras se calientan y se aplican, por duplicado, a los pocillos. Una mezcla calentada de PBS, tampón de muestra, y agente reductor sirve como el blanco, o control negativo. Un estándar de peso molecular bajo se incluye en cada operación de validación. Las muestras por duplicado y el estándar de referencia de OMV, a lo largo con una carril único para el marcador del peso molecular y el blanco, se cargan sobre el gel SDS y se someten a electroforesis.</p> <p>Para visualizar las bandas, el gel se tinte con azul de Coomassie en solución de alcohol y se destiñe por el uso de una mezcla de alcohol y ácido acético. El gel se barre con un densitómetro. Los</p>

