

### 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 NHBA. 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.

**Tabla 5 Especificaciones de Liberación para el Granel Concentrado de la proteína recombinante de fusión NHBA**

Prueba	Método de Análisis	Referencia	Especificación
Pureza	SDS-PAGE	Interna	≥ 90%
Pureza	SE-HPLC	Interna	≥ 70%
Impurezas inespecíficas <sup>1</sup>			≤ 9%
Contenido de Proteínas	Valoración de Proteínas Totales BCA	Interna	500-1100 µg/ml
Identidad	Western Blot	Interna	Positiva
HCP/Proteína <sup>2</sup>	ELISA/cálculo	Interna	≤ 50 ppm
Osmolaridad <sup>2</sup>	Osmometría, punto de congelamiento	Ph. Eur./USP	600-750 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
pH	Potenciometría	Ph. Eur./USP	6,5-7,5
Conductividad	Potenciometría	Ph. Eur./USP	11,000-14,500 µS/cm
Proporción Ox-Red	RP-HPLC	Interna	Para información únicamente <sup>3</sup>

BCA: Ácido Bicinconínico; CFU: Unidades de Formación de Colonias; ELISA: Valoración Inmunoabsorbente Vinculada con Enzimas; IU: Unidades Internacionales; µS: Micro-Siemens; mOsm: Milli-Osmoles; Proporción Ox-Red: Proporción oxidación-reducción; Ph. Eur.: Farmacopea Europea; ppm: partes por millón; RP-HPLC: Cromatografía líquida de alto rendimiento en fase invertida; 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

<sup>1</sup> A partir de la campaña 2013 se implementará una especificación de Impurezas Inespecíficas con un límite de ≤ 9%.

<sup>2</sup> La prueba se lleva a cabo por cuenta de Novartis Vacunas & Diagnósticos.

<sup>3</sup> La especificación adecuada se definirá en una fecha futura, una vez elaborado un número suficiente de lotes.

**Tabla 6 Fundamentos para el Uso de Terminología para Pureza**

Método de Análisis	Descripción General de Medición	Nomenclatura Actual	Nomenclatura Propuesta	Fundamentos para la Selección de la Terminología Utilizada
SE-	Área porcentual del	Integridad	Pureza	La pureza del antígeno con



HPLC	pico de antígenos con respecto al área total del cromatograma			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 a, "integridad".
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

SE-HPLC: Cromatografía líquida de alto rendimiento con exclusión de tamaño; SDS-PAGE: Electroforesis en gel de dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida

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

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




**3.2 Procedimientos Analíticos**

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

**Tabla 7 Biocarga**

<p><b>Descripción de la Valoración</b></p>	<p><b>Valoración de Sandoz, para controles durante el proceso y liberación del granel concentrado:</b></p> <p>Un volumen de 100 ml del 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 triptica 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><b>Valoración de Novartis, para estabilidad del granel concentrado:</b></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><b>Consistencia a Farmacopeas</b></p>	<p><b>Valoración de Sandoz:</b></p> <p>Ph. Eur. 2.6.12 Examinación Microbiana de Productos no Estériles: Pruebas de Enumeración Microbiana [Método de Prueba: Recuentos Microbianos Aeróbicos Totales (TAMC)]</p> <p><b>Valoración de Novartis:</b></p> <p>Ph. Eur. 2.6.12 Examinación Microbiológica de Productos no Estériles: Pruebas de Enumeración Microbiana</p> <p>USP Capítulo &lt;61&gt; Examinación Microbiológica de Productos no Estériles: Pruebas de Enumeración Microbiana</p>

  
**Novartis Argentina**  
 Dr. Lucio Jerónim  
 Director Técnico  
 MN 14840

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



**Tabla 8 Conductividad**

<b>Muestras de Prueba</b>	Granel Concentrado
<b>Estándares y Controles de Referencia</b>	Soluciones Estándares de Conductividad Certificada NIST y PTB para Calibración
<b>Descripción de la Valoración</b>	<p><b>Valoración de Sandoz:</b></p> <p>La célula constante en el conductivímetro se calibra por el uso de una 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.</p> <p>El análisis es válido si la conductividad de la solución estándar de referencia está dentro de <math>\pm 5\%</math> del valor certificado, a menos que se especifique lo contrario por parte del fabricante.</p>
<b>Consistencia a Farmacopeas</b>	Ph. Eur. 2.2.38 Conductividad USP <645> Conductividad en Agua

**Tabla 9 Endotoxina**

<b>Descripción de la Valoración</b>	<p><b>Valoración de Sandoz (para controles durante el proceso y liberación del granel concentrado) y valoración de Novartis (para la estabilidad del granel concentrado) :</b></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 <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^\circ\text{C}</math>.</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>± 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.</p> <p>Se verifican criterios adecuados de idoneidad del sistema para confirmar la validez de la corrida analítica.</p>
<b>Consistencia a Farmacopeas</b>	<p><b>Valoraciones de Sandoz y Novartis:</b></p> <p>Ph. Eur. 2.6.14 Endotoxinas Bacterianas</p> <p>USP-NF &lt;85&gt; Prueba de Endotoxinas Bacterianas</p>

**Tabla 10 Proteínas Residuales de las Células Huésped**

<b>Muestras de Prueba</b>	<b>Granel Concentrado</b>
<b>Descripción de la Valoración</b>	<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 criterios adecuados de idoneidad del sistema para confirmar la validez de la corrida analítica.</p>
<b>Consistencia a Farmacopeas</b>	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

