

**Tabla 11 Identidad por Western Blot**

Muestras de Prueba	Granel Concentrado
<b>Descripción de la Valoración</b>	<p>Se opera un western blot con anticuerpos policlonales dirigidos contra la proteína recombinante de fusión NHBA. Las concentraciones de muestra y estándar se ajustan a una concentración nominal, se tratan con un agente reductor, y se calientan para reducir los puentes de disulfuro de la proteína. Un volumen especificado para la muestra y el estándar, igual a aproximadamente 1,0 µg de proteína se carga sobre el gel de poliacrilamida; el estándar de la proteína recombinante de fusión NHBA sirve como el estándar de identidad en el análisis de western blot. Un segundo volumen del estándar recombinante, con una menor cantidad de proteína (aproximadamente 2% de la cantidad nominal de proteína), se carga sobre el gen 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 gen 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, el gel se transfiere sobre una membrana de transferencia, transfiriendo las proteínas separadas. Luego, el <i>blot</i> se sondea con anticuerpos policlonales anti-proteína recombinante de fusión NHBA. 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 de fusión NHBA se confirma cuando una banda a la misma distancia de migración en la muestra de referencia es visible. Se verifican criterios adecuados de idoneidad del sistema para confirmar la validez de la corrida analítica.</p>
<b>Consistencia a Farmacopeas</b>	No aplicable

**Tabla 12 Osmolaridad**

Muestras de Prueba	Granel Concentrado
--------------------	--------------------

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

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



<b>Descripción de la Valoración</b>	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 $\pm 4$ mOsm/kg del rango de titulación teórico.
<b>Consistencia a Farmacopeas</b>	Ph. Eur. 2.2.35 Osmolaridad USP <785> Osmolaridad y Osmolaridad

**Tabla 13 RP-HPLC**

<b>Muestras de Prueba</b>	Granel Concentrado
<b>Descripción de la Valoración</b>	<p>Se preparan dos soluciones de estándar de referencia (SST1 en una concentración alta y SST2, que contenga 0,010 mg/ml) como muestras de adecuación del sistema para evaluar el desempeño de separación del sistema cromatográfico. La fase móvil (mezcla de acetonitrilo y agua con ácido trifluoroacético) o el tampón de dilución sirve como el blanco, o el control negativo.</p> <p>La columna se equilibra con fase móvil antes del uso. Cada secuencia de inyección incluye una inyección simple mínima de SST 2 al comienzo de la secuencia para verificar la sensibilidad del sistema de detección, inyección de SST 1 antes y después de las primeras muestras de calibración, y en intervalos variables durante la secuencia. Las muestras de calibración se inyectan por duplicado para obtener la curva de calibración. El blanco se inyecta entre los grupos de muestra de típicamente 10 muestras para evitar la contaminación. Las muestras de prueba se inyectan una vez. La columna se opera en las condiciones validadas, con detección de absorbancia de UV a 214 nm. La integración pico se lleva a cabo con la ayuda del sistema de evaluación de datos Chromeleon (o equivalente).</p> <p>La proporción Ox-Red se determina por la evaluación del área pico porcentual (integración) de la forma oxidada a la suma de las tres áreas pico para formas oxidadas, parcialmente reducidas y completamente reducidas de la proteína recombinante de fusión NHBA. 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 Imirtziak  
Gte. de Asuntos Regulatorios  
Codirector Técnico - M.N. 11521  
Apoderado




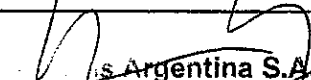
**Tabla 14 pH**

<b>Descripción de la Valoración</b>	<p><b>Valoración de Sandoz, para liberación del granel concentrado:</b></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 <math>\pm 0,02</math> 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><b>Valoración de Novartis, para estabilidad de granel concentrado:</b></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 <math>\pm 0,02</math> 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 criterios adecuados de idoneidad del sistema para confirmar la validez de la corrida analítica.</p>
<b>Consistencia a Farmacopeas</b>	Ph. Eur. 2.2.3 Determinación Potenciométrica del pH USP <791> pH

**Tabla 15 Concentración de Proteínas**

<b>Descripción de la Valoración</b>	<p><b>Prueba en Tubo de Ensayo llevada a cabo por Sandoz, para liberación del granel concentrado y por Novartis, para estabilidad del granel concentrado:</b></p> <p>Los estándares de referencia BSA se diluyen en agua para dar</p>
-------------------------------------	---

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

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




cuatro concentraciones para la curva estándar: 20, 15, 10, y 5  $\mu\text{g/ml}$ . Todas las muestras del granel concentrado de la proteína recombinante de fusión NHBA 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  $\mu\text{g/ml}$  para cada dilución probada; la muestra enriquecida sirve como un control de la adecuación del sistema (control de recuperación).

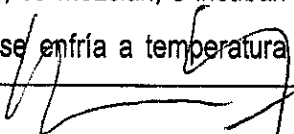
Reactivos de Trabajo A (mezcla de carbonato de sodio, bicarbonato de sodio y tartrato de sodio), B (BCA 4% en agua), y C (pentahidrato de sulfato cúprico en agua 4%) se agregan a los tubos para todas las muestras (estándares, blancos, muestras de prueba y muestras de prueba más enriquecimiento), se agitan, e incuban a  $60^\circ\text{C}$  durante  $60 \pm 2$  minutos. Todas las muestras se preparan por duplicado. Luego, los tubos se enfrían a temperatura ambiente durante  $20 \pm 2$  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  $\mu\text{g/ml}$ . La concentración de proteínas se determina por calibración externa a partir de la curva estándar de BSA. Se verifican criterios adecuados de idoneidad del sistema para confirmar la validez de la corrida analítica.

**Valoración de Placas de Microtitulación llevada a cabo por Sandoz, para controles durante el procesos:**

Se diluyen estándares BSA en agua para dar dos concentraciones a 30 y 40  $\mu\text{g/ml}$ . 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  $\mu\text{g/ml}$ . Todas las muestras intermedias de proteína recombinante de fusión NHBA se diluye con agua o tampón de fosfato, correspondiente al tipo de muestra, 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.

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 cada pocillo (estándares, blancos, y muestra de prueba), se mezclan, e incuban a  $37^\circ\text{C}$  durante 2 horas. Luego, la placa se enfría a temperatura


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


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



	ambiente durante 20 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 criterios adecuados de idoneidad del sistema para confirmar la validez de la corrida analítica.
<b>Consistencia a Farmacopeas</b>	No aplicable

**Tabla 16 SDS-PAGE**

<b>Descripción de la Valoración</b>	<p><b>Valoración de Sandoz, para controles durante el proceso y liberación del granel concentrado:</b></p> <p><u>Determinación de Pureza</u></p> <p>El estándar de referencia proteína recombinante de fusión NHBA se diluye apropiadamente, se calienta, y agrega a los pocillos adecuados en dos concentraciones diferentes; las concentraciones superiores e inferiores sirven como los estándares de identidad y valor de referencia, respectivamente. Se diluyen muestras de prueba para ajustarse al rango de concentración especificado de proteínas totales por pocillo; luego, las muestras se calientan y se aplican, por duplicado, a los pocillos con gel. Se incluye un estándar de peso molecular sobre cada gel (en cada operación de valoración) y el tampón de muestra diluido en agua y calentado sirve como el blanco y el control negativo. Las muestras por duplicado, junto con un marcador del peso molecular, estándares, y blancos, se someten a electroforesis.</p> <p>Para visualizar las bandas, el gen se tiñe con azul de Coomassie en etanol y se destiñe por el uso de una mezcla de etanol y ácido acético. El gel se barre con un densitómetro. Para la proteína recombinante de fusión NHBA, existe una banda principal correspondiente al estándar de proteína recombinante de fusión NHBA. La pureza se expresa como la suma de la cantidad relativa porcentual de la banda identificada como proteína recombinante de fusión NHBA, cuando se compara con la intensidad densitométrica global de la totalidad de la hilera.</p> <p>Se verifican criterios adecuados de idoneidad del sistema para confirmar la validez de la corrida analítica.</p> <p><u>Determinación de Cantidad</u></p>
-------------------------------------	--

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

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



	<p>La cuantificación se lleva a cabo únicamente par a las muestras de caldo de cultivo. El estándar de referencia se diluye apropiadamente, se calienta y volúmenes iguales a cuatro cargas de proteína diferentes (0,6, 1,2, 1,8, y 2,4 <math>\mu\text{g}</math>) se aplican a los pocillos con gel adecuados. Las muestras de prueba se tratan con se describe anteriormente para la pureza. Las muestras por duplicado, junto con un marcador del peso molecular, estándares, y blancos, se cargan sobre el gel de SDS gel y se someten a electroforesis. Los geles se tñen y barren de acuerdo con lo descrito con anterioridad para pureza. La cuantificación se lleva a cabo por la evaluación de la banda principal para la proteína recombinante de fusión NHBA. Los valores de cantidad de señales (densidad óptica <math>\times</math> mm) de los estándares de referencia se utilizan para el análisis de regresión lineal. La cuantificación de la muestra de caldo de cultivo debe corregirse para el factor de dilución. Se verifican criterios adecuados de idoneidad del sistema para confirmar la validez de la corrida analítica.</p>
	<p><b>Valoración de Novartis, para estabilidad del granel concentrado:</b></p> <p><u>Determinación de Pureza</u></p> <p>El estándar de referencia proteína recombinante de fusión NHBA se diluye con PBS o agua y se mezcla con un tampón de muestra y agente reductor, se calienta, y agrega a los pocillos adecuados. 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 agregan, por duplicado, a los pocillos. Una mezcla calentada de PBS, tampón de muestra, y agente reductor sirve como el blanco, o control negativo. Se incluye un estándar de peso molecular en cada operación de valoración. Las muestras por duplicado, junto con un marcador del peso molecular, estándares, y blancos, se cargan sobre el gel de SDS y se someten a electroforesis.</p> <p>Para visualizar las bandas, el gen se tñe con azul de Coomassie en etanol y se destiñe por el uso de una mezcla de etanol y ácido acético. El gel se barre con un densitómetro. Para la proteína recombinante de fusión NHBA, hay una banda principal. La pureza se expresa como la proporción porcentual de la banda identificada como proteína recombinante de fusión NHBA cuando se compara con la intensidad densitométrica total de la hilera. Se verifican criterios adecuados de idoneidad del sistema para confirmar la</p>


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


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

