

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 124,9% a 198,6% para los tres lotes.
Especificidad	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.
Linealidad	La linealidad se determinó por la preparación de tres 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, $r$ .	Coeficiente de correlación de la curva ( $r$ ) > 0,980	$r > 0,999$ para las tres curvas
Límite de Cuantificación (LOQ)	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

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

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





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

Parámetros Probados	Descripción de la Prueba de Validación	Criterios de Aceptación de la Validación	Resultados de la Validación
Repetibilidad	Seis repeticiones de tres intermediarios durante el proceso y el granel concentrado de un lote único se probaron por el mismo operador.	CV % $\leq$ 15% para seis repeticiones del Lote 36439704, para homogeneización/solubilización, Cromatografía I, Cromatografía II, y Granel Concentrado.	CV % fueron 12,9, 13,9, 0,0, y 0,0% para el Lote 36439704 para homogeneización/solubilización, Cromatografía I, Cromatografía II, y el Granel Concentrado, respectivamente.
Precisión de Intermediarios	Tres lotes de granel concentrado se evaluaron por dos operadores diferentes tres días diferentes.	CV % < 20% (resultados combinados de ambos operadores), para lotes del Granel Concentrado de la proteína recombinante de fusión NHBA.	CV % (combinado) fue 0,0% para los Lotes de Granel Concentrado 34639702, 34639703, y 34639704.
Exactitud	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.	La recuperación porcentual está entre 75-125% para muestras de Granel Concentrado enriquecidas con 20 ng/ml del estándar de referencia de HCP de E. coli.	La recuperación porcentual fue 75-102%, 93-109%, y 86-115% para los Lotes del Granel Concentrado 36439702, 36439703, y 36439704, respectivamente.
Especificidad	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.	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	Véanse los resultados para Exactitud



			de referencia de HCP de <i>E. coli</i> .	
Linealidad	Curvas estándares y resultados de prueba (operadores diferentes y días diferentes) del Estudio de Precisión de Intermedarios se evaluaron para ajuste y linealidad.		<ul style="list-style-type: none"> <li>Desviación porcentual promedio de OD medida a partir de la OD calculada <math>\leq 20\%</math></li> <li><math>r^2</math> para cada curva estándar debe ser <math>&gt; 0,9900</math>.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Desviación porcentual promedio de la calculada osciló de -2,6 a 10,3</li> <li><math>r^2</math> osciló de 0,9996 a 1,000</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 AND que cumple los criterios de aceptación de CV % $< 15\%$ , y la recuperación porcentual promedio de la teórica está dentro de 80-120%.	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.

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

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

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



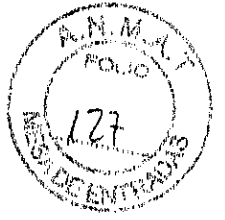


**Tabla 24** Resultados de Validación para Identidad por Western Blot

Parámetros Probados	Descripción de la Prueba de Validación	Criterios de Aceptación de la Validación	Resultados de la Validación
Especificidad	<p>La matriz de muestra para el Granel Concentrado se analiza con y sin 1µg de la proteína recombinante de fusión NHBA enriquecida.</p>	<p>La muestra de matriz blanco no debe mostrar ninguna banda que migre comparablemente al Estándar de la proteína recombinante de fusión NHBA. Para muestras enriquecidas con la proteína recombinante de fusión NHBA, una banda principal debe estar visible y la migración deber comparable al Estándar de la proteína recombinante de fusión NHBA. Para hileras cargadas con muestras de la proteína recombinante NadA, no debe estar visible ninguna banda.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La matriz blanco y las muestras no exhibieron bandas con patrones de migración comparables al estándar de la proteína recombinante de fusión NHBA</li> <li>• No había bandas visibles para las muestras de la proteína recombinante NadA.</li> <li>• Se observó una banda principal para el tampón enriquecido con la proteína recombinante de fusión NHBA con migración comparable al estándar.</li> </ul>

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 25 Resultados de Calificación para Osmolaridad**

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 tres lotes de la proteína recombinante de fusión NHBA, 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): 1.4 para el Lote No. 36443501</li> <li>• CV % (combinado): 1.3 para el Lote No. 36439703</li> <li>• CV % (combinado): 2.2 para el Lote No. 36439704</li> </ul>

**Tabla 26 Resultados de Validación para RP-HPLC**

Parámetros Probados	Matrices de muestra de los tampones de equilibración de Cromatografía I, II, III y del tampón de UF/DF 1, e intermediarios de cromatografía se analizan enriquecidos y no enriquecidos con estándar de referencia de la proteína recombinante de fusión NHBA. Además, el estándar de referencia se reduce con DTT y se analiza.	Criterios de Aceptación de la Validación	Resultados de la Validación
Especificidad		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sin interferencia de los componentes de matriz dentro del 5% del tiempo de retención del estándar de referencia de la proteína recombinante de fusión NHBA.</li> <li>• Para la proporción Ox-Red, separación clara de las formas oxidadas de las reducidas y diferencia del tiempo de retención de <math>\geq 0,10</math> min.</li> <li>• El tiempo de retención de las muestras de la proteína recombinante de fusión NHBA no se desvía en más que 5% del</li> </ul>	Se cumplen todos los criterios de aceptación para el contenido, pureza, y proporción Ox-Red.

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

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





		tiempo de retención del estándar de referencia de la proteína recombinante de fusión NHBA.	
Linealidad	Se evaluaron siete diluciones de cada una de las seis repeticiones del estándar de referencia de la proteína recombinante de fusión NHBA (cuatro de las siete diluciones se utilizaron para determinar LOD y LOQ).	El coeficiente de correlación (r) debe ser $\geq 0,990$ y la intersección "y" $\leq 10\%$ para contenido y pureza; sin criterios para proporción Ox-Red.	r = 0,9996, intersección "y": -1,91 para pureza y contenido
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 comparada con la del contenido teórico.	r $\geq 0,990$ e intersección "y" $\leq 10\%$ del área pico promedio del estándar de referencia de 100 $\mu\text{g/ml}$ Para el contenido, la recuperación promedio en cada nivel de concentración debe estar entre 93-107% para concentraciones del estándar de referencia que oscilan de 0,050 a 0,200 mg/ml y entre 90-110% para una concentración de 0,050 mg/ml. Para muestras durante el proceso enriquecidas con estándar de referencia, la recuperación porcentual debe estar entre 80-120% para las concentraciones de 0,160 y 0,250 mg/ml, y entre 70-130% en la concentración de 0,080 mg/ml.	r=0,9998; intersección "y": -1,91 para el contenido, pureza, y proporción Ox-Red. Para el contenido, todas las recuperaciones porcentuales cumplen los criterios de aceptación en todas las concentraciones probadas.

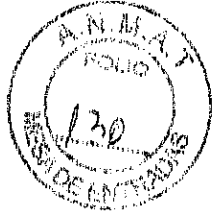
Novartis Argentina S.A.  
Dr. Lucio Beroncio  
Director Técnico  
MN 14840

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





<b>Límite de Detección (LOD)</b>	Se evaluaron cuatro diluciones de cada uno de las seis repeticiones del estándar de referencia de la proteína recombinante de fusión NHBA.	Proporción S/N $\geq 3$	LOD = 0,0063 mg/ml para el contenido, pureza, y proporción Ox-Red.
<b>Límite de Cuantificación (LOQ)</b>	Se evaluaron cuatro diluciones de cada uno de las seis repeticiones del estándar de referencia de la proteína recombinante de fusión NHBA.	Proporción S/N $\geq 10$	LOQ = 0,0063 mg/ml para el contenido, pureza, y proporción Ox-Red.
<b>Rango</b>	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 y proporción Ox-Red, el rango es 0,053-0,263 mg/ml; para pureza, el rango es 0,0063-0,263 mg/ml.
<b>Repetibilidad</b>	Se evaluaron los datos de desviación estándar a partir del estudio de linealidad, muestras de control durante el proceso, datos LOD/LOQ data, y a partir de datos de los estudios de enriquecimiento de matrices durante el proceso.	Para el contenido, RSD% (CV%) $\leq 5\%$ para todas las concentraciones de la curva de calibración; RSD $\leq 5\%$ para niveles de enriquecimiento de 0,133 y 0,250 mg/ml y RSD $\leq 10\%$ para niveles de enriquecimiento de 0,080 mg/ml; RSD $\leq 5\%$ para todas las muestras de elaboración durante el proceso. Para pureza, RSD $\leq 10\%$ para especies individuales cuya área es $> 0,5\%$ del área total de la proteína recombinante de fusión NHBA, RSD $\leq 20\%$ para especies individuales cuya área es $\leq 0,5\%$ del área total de proteína recombinante de fusión NHBA, para todas las muestras de elaboración durante el proceso. Para proporción Ox-Red, no se establece criterio de aceptación.	Se cumplen todos los criterios para el contenido, y pureza. No se establece criterio de aceptación para proporción Ox-Red.



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

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

