



Sección 3.2.P.4.4 Justificación de las especificaciones

No se presenta justificación para los componentes de la solución salina tamponada con fosfato cuyas especificaciones cumplen con la Ph. Eur., tal como se describe en la sección 3.2.P.4.1 Especificaciones.



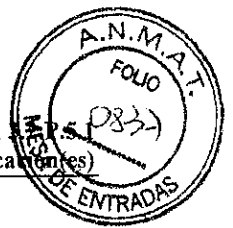
Sección 3.2.P.4.5 Excipientes de origen humano o animal

No se utiliza ningún excipiente de origen humano o animal en la elaboración de la vacuna antigripal tetravalente.



Sección 3.2.P.4.6. Excipientes nuevos

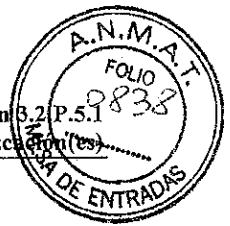
Todos los excipientes utilizados en la elaboración de la vacuna antigripal tetravalente son bien conocidos y no se consideran nuevos.



Sección 3.2.S.5.1 Especificación(es)

Índice

Lista de tablas2



Lista de tablas

Tabla 1: Especificaciones del PFAG3
Tabla 2: Especificaciones del FP4

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TECNICA
APODERADA
SANOFI PASTEUR S. A.



Lista de abreviaturas: vea la sección 2.3 Resumen general de calidad, Introducción.

En esta sección se presentan las especificaciones de liberación del producto farmacéutico (DP) de la vacuna antigripal tetravalente (QIV). Las especificaciones de liberación relacionadas con el producto final a granel (PFAG) y con el producto llenado (FP) se presentan en la Tabla 1 y en la Tabla 2.

En estas tablas se incluye para cada prueba:

- El nombre de la prueba.
- El método asociado utilizado.
- Referencias oficiales (farmacopea u otras) a los procedimientos analíticos; si corresponde.
- Los criterios de aceptación correspondientes aplicados para la liberación del producto.

Tabla 1: Especificaciones del PFAG

Prueba	Método	Referencia regulatoria	Criterio de aceptación
Esterilidad bacteriana y fúngica	Filtración por membrana	Ph. Eur. 2.6.1, edición actual	Sin multiplicación microbiana
Contenido de formaldehído libre	Método colorimétrico de Nash	Método interno	≤60 µg/mL
Contenido proteico total	Método de Kjeldhal	Método interno basado en la Ph. Eur. 2.5.9, edición actual, y Ph. Eur. 2.5.33, edición actual (método 7, procedimiento A).	≤600 µg/mL
Contenido de ovoalbúmina	ELISA	Ph. Eur. 2.7.1, edición actual	≤100 ng/mL
Proporción [contenido proteico total/contenido de antígeno hemaglutinina (HA)]	/Mediante cálculo*	No se aplica.	≤6

* Con base en los resultados de contenido proteico total y de contenido de antígeno HA en la etapa de PFAG (vea los detalles en la sección 3.2.P.5.2 Procedimientos analíticos, párrafo 1.2.4). El contenido de antígeno HA se realiza como prueba de control durante el proceso (IPC) en la etapa de PFAG (vea los detalles en la sección 3.2.P.3.3 Proceso de elaboración y controles del proceso, sección 2.3.1).



Tabla 2: Especificaciones del FP

Prueba	Método	Referencia regulatoria	Criterio de aceptación
Esterilidad bacteriana y fúngica	Filtración por membrana	Ph. Eur. 2.6.1, edición actual	Sin multiplicación microbiana
Aspecto	Evaluación visual	Ph. Eur. 2.9.20, edición actual	Líquido incoloro, opalescente
pH	Determinación potenciométrica	Ph. Eur. 2.2.3, edición actual	6,8-7,6
Volumen extraíble	Pesaje	Ph. Eur. 2.9.17, edición actual	≥volumen nominal
Identificación del antígeno HA	Imunodifusión radial simple (SRID)	Ph. Eur. 2.7.1, edición actual	Identificación positiva para las 4 cepas.
Contenido de antígeno HA: Cepa A/H1N1 Cepa A/H3N2 Cepa B/Victoria Cepa B/Yamagata	(Cepas A: método clásico cepas B: método bivalente)		Objetivo: 15 µg/dosis por cada cepa El límite inferior de confianza (p = 0,95) del contenido estimado de antígeno HA no es menor que 12 µg/dosis por cada cepa
Contenido de endotoxinas bacterianas	Método cromogénico cinético de lisado de amebocitos de Limulus (LAL)	Ph. Eur. 2.6.14, edición actual	<100 UI/dosis

Las especificaciones que se utilizarán para controlar el FP en los estudios de estabilidad iniciales y en curso se presentan en la sección 3.2.P.8.2 Protocolo de estabilidad posterior a la aprobación y compromiso de estabilidad.



Sección 3.2.P.5.2 Procedimientos analíticos

Índice

1	Producto final a granel	3
1.1	Métodos analíticos detallados en la Farmacopea Europea	3
1.2	Métodos analíticos no detallados en la Farmacopea Europea	3
1.2.1	Contenido de formaldehído libre	3
1.2.1.1	Referencias	3
1.2.1.2	Principio	3
1.2.1.3	Equipo	3
1.2.1.4	Reactivos	3
1.2.1.5	Procedimiento operativo	4
1.2.1.6	Lecturas, cálculos, resultados	4
1.2.1.7	Criterios de validez	5
1.2.2	Proteínas totales	5
1.2.2.1	Referencias	5
1.2.2.2	Principio	5
1.2.2.3	Equipo	5
1.2.2.4	Reactivos	6
1.2.2.5	Procedimiento operativo	6
1.2.2.6	Lecturas, cálculos, resultados	6
1.2.2.7	Criterios de validez	7
1.2.3	Contenido de ovoalbúmina	7
1.2.3.1	Referencia	7
1.2.3.2	Principio	7
1.2.3.3	Equipo	7
1.2.3.4	Reactivos	7
1.2.3.5	Procedimiento operativo	8
1.2.3.6	Lecturas, cálculos, resultados	9
1.2.3.7	Criterios de validez	9
1.2.4	Proporción [contenido proteico total/contenido de antígeno hemaglutinina (HA)]	9
2	Producto llenado	9
2.1	Métodos analíticos detallados en la Farmacopea Europea	9
2.2	Métodos analíticos no detallados en la Farmacopea Europea	10



2.2.1	Contenido e identificación del antígeno HA	10
2.2.2	Referencias	10
2.2.2.1	Principio	10
2.2.2.2	Equipo	11
2.2.2.3	Reactivos	11
2.2.2.4	Procedimiento operativo	11
2.2.2.5	Lectura, cálculo, resultados	12
2.2.2.6	Criterios de validez de cada análisis independiente	13



Lista de abreviaturas: vea la sección 2.3 Resumen general de calidad, Introducción.

1 Producto final a granel

1.1 Métodos analíticos detallados en la Farmacopea Europea

La siguiente prueba se realiza de acuerdo con el método de la farmacopea y no se describe en este documento:

- Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica: método n.º 2.6.1 "Esterilidad" de la Ph. Eur., edición actual, método de filtración por membrana.

1.2 Métodos analíticos no detallados en la Farmacopea Europea

Las siguientes pruebas no se detallan en la Farmacopea Europea; por consiguiente, se presenta una descripción del método.

1.2.1 Contenido de formaldehído libre

1.2.1.1 Referencias

NASH T., Biochem. J., 1953, 55 (416-421)

1.2.1.2 Principio

Esta prueba es un método colorimétrico basado en espectrofotometría visible UV, denominado método de Nash.

El contenido de formaldehído libre del producto final a granel (PFAG) se analiza midiendo la absorbancia del compuesto coloreado (3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina) formado por la reacción del formaldehído con acetilacetona en presencia de un exceso de sales de amoníaco. La absorbancia de la 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina se mide en su máxima absorción (413 nm) y se compara con una curva de referencia preparada con un estándar de referencia.

La intensidad del color es proporcional a la cantidad de formaldehído presente en la muestra.

1.2.1.3 Equipo

Espectrofotómetro UV visible

Equipo estándar de laboratorio.

1.2.1.4 Reactivos

Reactivos:

- Tampón de acetato con acetilacetona (que contiene acetato de amonio, ácido acético glacial, acetilacetona incolora y agua para inyectables [WFI]).



- Tampón de acetato sin acetilacetona (que contiene acetato de amonio, ácido acético glacial y WFI).

Estándares, referencias y controles:

- Solución para el estándar de referencia madre (proveedor 1): formaldehído con un contenido aproximado del 40 % p/v.
- Solución para el control interno (proveedor 2): formaldehído con un contenido aproximado del 40 % p/v.
- Soluciones estándar de referencia: formaldehído de una concentración conocida que contiene solución de formaldehído comercial controlada al 40 % p/v (proveedor 1), metanol y WFI;
- Solución de control interno de 2 µg/mL: solución de formaldehído comercial controlada que contiene aproximadamente 40 % p/v (proveedor 2), metanol y WFI;
- Control: muestra del producto potencialmente diluida en WFI de manera idéntica a la muestra de prueba, con adición final de tampón de acetato sin acetilacetona;
- testigo que contiene solo el tampón de acetato con acetilacetona y WFI.

1.2.1.5 Procedimiento operativo

Las soluciones estándar de referencia se diluyen con WFI (hasta 2 mL) para preparar el rango de diluciones. Luego, se añaden 2 mL de tampón de acetato con acetilacetona a 2 mL de la muestra (testigo, rango, control interno, pruebas). El control interno y las muestras de prueba se preparan por duplicado.

Se añaden 2 mL de tampón de acetato sin acetilacetona a 2 mL de la muestra de control.

Se incuban todos los tubos con las muestras (testigo, rango, control interno, control y pruebas) en un baño María a $+37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 50 minutos.

1.2.1.6 Lecturas, cálculos, resultados

La absorbancia de todas las muestras (testigo, rango, control interno, control, pruebas) se determina por espectrofotometría a 413 nm frente a WFI.

Todos los cálculos se realizan en logaritmos.

La concentración de formaldehído de la muestra de prueba se determina mediante la curva estándar.



Rango

La densidad óptica (DO) del testigo se resta de la DO de cada punto del rango. Se obtiene un valor de ΔDO para cada punto del rango. Esta ΔDO se convierte en $\log \Delta DO$ para cada punto y las concentraciones correspondientes (concentraciones logarítmicas).

Se define la regresión lineal $\text{Log}(\Delta DO) = F$ (concentración logarítmica).

Muestras de prueba

La DO del testigo se resta de la DO de las pruebas y del control interno. Se obtiene un valor de ΔDO para cada tubo.

Para cada prueba, se resta la DO del control correspondiente (ΔDO de prueba - DO de control), lo cual da un valor que se convierte en logarítmico. La concentración logarítmica se convierte en decimal: C en μg en la muestra de prueba. TS: volumen de la muestra (mL).

$$\text{Concentración del formaldehído} = \frac{C \times \text{dilución}}{TS} \mu\text{g/mL}$$

1.2.1.7 Criterios de validez

El análisis se considera válido si se verifica lo siguiente:

- El coeficiente de correlación de la curva estándar es mayor o igual que el límite determinado estadísticamente.
- La diferencia de desviación tolerada entre dos pruebas debe ser menor o igual que 10 %.
- El valor de análisis del control interno (promedio de 2 pruebas) se encuentra dentro de los límites del gráfico de control vigente.

1.2.2 Proteínas totales

1.2.2.1 Referencias

La prueba de proteínas totales se basa en lo siguiente:

- Ph. Eur. 2.5.9, edición actual, "Determinación de nitrógeno mediante digestión en ácido sulfúrico";
- Ph. Eur. 2.5.33, edición actual, "Proteínas totales", método 7, procedimiento A.

1.2.2.2 Principio

Las proteínas se precipitan con un reactivo sulfovolfámico. Luego se recolecta el precipitado.

Durante la mineralización sulfúrica el nitrógeno orgánico se transforma en sulfato de amonio. Tras la alcalinización con hidróxido de sodio se recupera amoníaco destilado y después se analiza con una solución titulada de ácido clorhídrico.

1.2.2.3 Equipo

Sistema de destilación y titulación;



Equipo estándar de laboratorio.

1.2.2.4 Reactivos

Reactivos:

- Ácido sulfúrico concentrado R.
- Hidróxido de sodio concentrado R.
- Solución de tungstato de sodio que contiene tungstato de sodio y agua purificada al 10 % p/v;
- Solución de ácido sulfúrico 1/3 M en agua purificada.
- Catalizador de mineralización: mezcla de sulfato potásico, sulfato de cobre y selenio.
- Solución de borato sódico: tetraborato disódico decahidratado y agua purificada.
- Muestra testigo que contiene glucosa.
- Solución indicadora de color que contiene rojo de metilo en metanol, verde de bromocresol en metanol y ácido bórico R en agua purificada.

Estándares, referencias y controles:

- Solución de control interno que contiene albúmina de suero bovino al 5 % diluida a razón de 1/20 en agua purificada.
- Solución titulada de ácido clorhídrico en agua purificada a 0,01 M.

1.2.2.5 Procedimiento operativo

El testigo, las muestras de prueba y el control interno se preparan por duplicado.

Las proteínas se precipitan primero en el producto que se va a analizar mediante la adición de las soluciones de ácido sulfúrico y tungstato de sodio.

A continuación, se añade el catalizador de mineralización y el ácido sulfúrico concentrado al precipitado para realizar la digestión con ácido sulfúrico.

Luego, se destilan las muestras mineralizadas y se analiza directamente la titulación del amoníaco destilado utilizando una solución titulada de ácido clorhídrico 0,01 M.

1.2.2.6 Lecturas, cálculos, resultados

El contenido proteico de la muestra de prueba y del control interno se calcula de la forma siguiente:

$$\text{Contenido proteico} = \frac{(V_p - V_b) \times T_{\text{HCl}} \times 14,01 \cdot 10^3 \times 6,25}{V_{\text{TS}}} \mu\text{g/mL}$$

V_p = volumen de ácido clorhídrico utilizado para la muestra de prueba o el control interno (mL)

V_b = volumen de ácido clorhídrico utilizado para los testigos (mL)

T_{HCl} = título de la solución de ácido clorhídrico 0,01 M utilizada

V_{TS} = volumen de la muestra sometida a prueba (mL)



El resultado de la muestra analizada es el promedio de las dos pruebas.

1.2.2.7 Criterios de validez

El análisis se considera válido solo si se verifica lo siguiente:

- La diferencia entre la concentración máxima y mínima del control interno debe ser menor o igual que el límite determinado estadísticamente.
- El valor medio de las concentraciones del control interno debe hallarse dentro de los límites de control del gráfico.
- La diferencia de volumen de ácido clorhídrico entre los dos análisis de la misma muestra debe ser menor o igual que el límite determinado estadísticamente.
- El límite de cuantificación (LQ) es igual al límite determinado estadísticamente x volumen de ácido clorhídrico utilizado para los testigos mineralizados.

1.2.3 Contenido de ovoalbúmina

1.2.3.1 Referencia

Ph. Eur. 2.7.1, edición actual, "Métodos inmunoquímicos".

1.2.3.2 Principio

El contenido de ovoalbúmina del PFAG se analiza mediante un enzimoimmunoensayo absorbente tipo "sándwich" (ELISA) en comparación con una solución de referencia de albúmina de huevo de gallina (ovoalbúmina).

La ovoalbúmina presente en las muestras se captura mediante una inmunoglobulina G (IgG) de cabra antiovoalbúmina que recubre una microplaca. Un segundo anticuerpo (IgG de conejo antiovoalbúmina) se fija al antígeno inmovilizado. Se añade un conjugado (IgG de cabra anticonejo conjugada con fosfatasa alcalina) y se fija al complejo anticuerpo-antígeno-segundo anticuerpo. La detección se realiza agregando solución cromógena (PNPP). Después de la incubación, la intensidad de la coloración producida es proporcional a la cantidad de ovoalbúmina que contiene la muestra. La reacción enzimática se detiene agregando hidróxido de sodio y la absorbancia se determina con un espectrofotómetro a 405 nm y a 630 nm.

Se genera una curva estándar a partir de una solución de ovoalbúmina de referencia.

1.2.3.3 Equipo

Equipo estándar de laboratorio, lavadora de microplacas, lector de microplacas.

1.2.3.4 Reactivos

Reactivos:

- anticuerpo de cobertura (IgG de cabra antiovoalbúmina);
- tampón de cobertura (tampón de carbonato, pH 9,6);



- tampón de dilución y lavado (solución salina de tamponada con fosfato sin calcio ni magnesio, agua purificada, Tween 20);
- segundo anticuerpo (IgG de conejo anti ovoalbúmina);
- anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina (IgG de cabra anticonejo conjugada con fosfatasa alcalina);
- diluyente de sustrato (tampón de dietanolamina, pH 9,8);
- paranitrofenilfosfato (PNPP);
- tampón de bloqueo (suero de cabra, tampón de cobertura);
- solución de detención (hidróxido de sodio).

Estándares, referencias y controles:

- ovoalbúmina 10 mg/mL (solución madre);
- estándares de calibración: un pequeño rango de diluciones de una solución madre de referencia de ovoalbúmina con una concentración conocida con exactitud;
- control interno (vacuna antigripal en una dilución apropiada);
- testigos (diluyente testigo y sustrato testigo).

1.2.3.5 Procedimiento operativo

Se analizan muestras testigo en paralelo: se dispensa un diluyente testigo en los pocillos, en paralelo a las muestras, en el paso 3.

- 1) **Recubrimiento:** El anticuerpo de recubrimiento se diluye en el tampón de recubrimiento. Se dispensa un volumen adecuado en cada pocillo. Las placas se incuban toda la noche a $+5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 2) **Saturación:** Después de que las placas se lavan con tampón de lavado para eliminar los anticuerpos no unidos, se añade un volumen adecuado de tampón de bloqueo a cada pocillo. Las placas se incuban a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora y se vuelven a lavar con tampón de lavado.
- 3) **Dilución:** Se preparan diluciones de las muestras y de la solución de referencia de ovoalbúmina. En paralelo, se diluye un control interno de acuerdo con su título supuesto y se dispensa. Se dispensa un volumen adecuado de cada dilución en varios pocillos. La placa se incuba a temperatura ambiente aproximadamente 1,5 horas y luego se lava con tampón de lavado.
- 4) **Segundo anticuerpo:** El segundo anticuerpo se diluye en tampón de muestra y se añade a cada pocillo un volumen adecuado de la dilución resultante. La placa se incuba a temperatura ambiente aproximadamente 1,5 horas y luego se lava con tampón de lavado.
- 5) **Anticuerpo conjugado:** El anticuerpo conjugado se diluye en tampón de muestra y se añade a cada pocillo un volumen adecuado de la dilución resultante. La placa se incuba a temperatura ambiente aproximadamente 1,5 horas y luego se lava con tampón de lavado.



- 6) **Revelado del color:** se añade a cada pocillo un volumen adecuado del sustrato cromógeno (paranitrofenilfosfato), diluido adecuadamente con el diluyente de sustrato. La placa se incuba durante aproximadamente 25 minutos a temperatura ambiente, protegida de la luz. La reacción enzimática se detiene agregando un volumen adecuado de solución de hidróxido de sodio a cada pocillo.

1.2.3.6 Lecturas, cálculos, resultados

Se mide la absorbancia de todas las muestras a 405 nm y a 630 nm.

Tomando los valores de absorbancia medios para las distintas diluciones de la solución de referencia, se traza una curva de referencia mediante regresión logarítmica:

$$Y = A \cdot \log X + B$$

donde Y = diferencia de la DO entre las 2 lecturas a 405 nm y 630 nm

y X = concentración de ovoalbúmina (ng/mL).

Luego, la ecuación de la curva se emplea para determinar el contenido de ovoalbúmina de la muestra.

1.2.3.7 Criterios de validez

El análisis se considera válido solo si se verifica lo siguiente:

- la DO del testigo es menor que 0,200;
- el valor del control interno se encuentra dentro de los límites del gráfico de control vigente;
- el coeficiente de correlación de la curva estándar es mayor o igual que el límite determinado estadísticamente;
- La DO promedio para la solución de referencia de ovoalbúmina de 10 ng/mL debe hallarse dentro de los límites de control vigentes.

1.2.4 Proporción [contenido proteico total/contenido de antígeno hemaglutinina (HA)]

La proporción [contenido proteico total/contenido de antígeno HA] se obtiene mediante el cálculo entre:

- el contenido proteico total, cuyo método se describe más arriba;
- el contenido de antígeno HA, que es una prueba de control durante el proceso (IPC) con el PFAG. El contenido de antígeno HA se determina también para la liberación del producto llenado (FP). El mismo método se aplica para los lotes de PFAG y FP, y su descripción se presenta a continuación.

2 Producto llenado

2.1 Métodos analíticos detallados en la Farmacopea Europea

Las pruebas siguientes se realizan según el método de la farmacopea y no se describen en este documento:



- Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica, realizada por filtración a través de membrana de conformidad con el método 2.6.1 "Esterilidad" de la Ph. Eur., edición actual.
- Aspecto, realizada por inspección visual de conformidad con el método 2.9.20 "Contaminación por partículas: partículas visibles" de la Ph. Eur., edición actual.
- pH, prueba realizada de conformidad con el método 2.2.3 "Determinación potenciométrica del pH" de la Ph. Eur., edición actual.
- Volumen extraíble, prueba realizada de conformidad con el método 2.9.17 "Prueba de volumen extraíble de las preparaciones parenterales" de la Ph. Eur., edición actual.
- Contenido de endotoxinas bacterianas, llevada a cabo con el método cromogénico cinético de lisado de amebocitos de Limulus (LAL), según las indicaciones del método 2.6.14 "Endotoxinas bacterianas" de la Ph. Eur.

2.2 Métodos analíticos no detallados en la Farmacopea Europea

A continuación se presentan los resúmenes de los métodos analíticos para los procedimientos analíticos no descritos ni detallados en las farmacopeas.

2.2.1 Contenido e identificación del antígeno HA

2.2.2 Referencias

Ph. Eur, 0158, edición actual, "Vacuna antigripal (virión fraccionado, inactivada)".

2.2.2.1 Principio

La cuantificación de antígeno HA se realiza mediante el método de SRID de conformidad con el método 2.7.1 "Métodos inmunoquímicos" de la Ph. Eur., edición actual. Dado que la monografía solo constituye una guía general, a continuación se ofrece una descripción más detallada del método analítico.

Tras su tratamiento con un detergente (Zwittergent), se difunden diferentes diluciones de la muestra de prueba y del antígeno de referencia (vea la sección 3.2.S.5 Estándares o materiales de referencia) en un gel de agarosa que contiene un antisuero específico. Se trata de un antisuero policlonal específicamente dirigido contra el antígeno HA gripal objetivo. Luego de la difusión completa se visualiza el anillo de precipitación de cada dilución de muestra y referencia mediante tinción (azul de Coomassie) y después se miden.

Se determina el contenido de antígeno HA para cada cepa mediante la ecuación de la curva de calibración establecida a partir de la referencia.

Debido a la reactividad cruzada entre cepas B de la vacuna QIV, el método de SRID se basa en un antígeno estándar de referencia bivalente.



2.2.2.2 Equipo

Equipo habitual de laboratorio de inmunología.

2.2.2.3 Reactivos

- Antisuero

Existen antisueros policlonales disponibles para cada cepa (origen: Instituto Nacional de Control y Normas Biológicas (NIBSC), Londres o Administración de Artículos Terapéuticos (TGA), Australia o Centro para la Evaluación e Investigación de Productos Biológicos (CBER).

- Antígeno de referencia

Referencias internacionales representativas de cada cepa gripal, suministradas por un centro de referencia de la gripe (NIBSC o TGA o CBER) con sus títulos y condiciones de uso.

Los antígenos de referencia para las cepas A (H1N1, H3N2) son soluciones de referencia específicas de cada cepa mientras que los antígenos de referencia para las cepas B (Victoria, Yamagata) son una referencia bivalente compuesta de antígenos de referencia de B/Victoria y de B/Yamagata. El método de SRID que utiliza la solución de referencia específica se denomina SRID clásico, y el método de SRID que utiliza soluciones de referencia bivalentes se denomina SRID bivalente.

- Agarosa;

- Detergente: solución de Zwittergent (3-14) en agua purificada;

- Reactivo de tinción: azul de Coomassie;

- Reactivo para destefir;

- Solución salina tamponada con fosfato: 1 x C.

2.2.2.4 Procedimiento operativo

Para cada análisis independiente:

Se prepara un gel de agarosa mezclando polvos de agarosa y solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se agrega al gel una cantidad determinada del antisuero policlonal específico (según las recomendaciones de los proveedores del antisuero y según los análisis de calibración). Luego de la solidificación del gel, se perfora una serie de pocillos circulares.

Cada antígeno de referencia se rehidrata con agua purificada. Las muestras de referencia y de prueba se tratan con Zwittergent durante unos 30 minutos a temperatura ambiente.

Se realizan diluciones seriales adicionales de muestras tratadas y de referencia tratada en PBS. Se añade un volumen de cada dilución a los pocillos. El análisis se realiza por triplicado, empleando tres series independientes de por lo menos 3 diluciones.

Luego de la difusión durante 18 a 22 horas a temperatura ambiente en un recipiente húmedo, se enjuagan, se secan y se tifen las placas con azul de Coomassie.



2.2.2.5 Lectura, cálculo, resultados

Luego de la decoloración, se miden dos diámetros perpendiculares de cada anillo de precipitación. Después se calcula la media de los todos los diámetros medidos para cada dilución de muestra.

Luego de la evaluación de la validez del análisis, se determina el contenido de antígeno HA para la muestra de prueba utilizando la curva de calibración.

La curva dosis-efecto para la preparación de referencia se calcula con la siguiente ecuación correspondiente a una regresión múltiple:

$$d = a_0 + a_1 D + a_2 \log D$$

Donde d: diámetro medio

D: dosis en $\mu\text{g/mL}$

Para la liberación, el número de análisis se basa en el parámetro del criterio de precisión evaluado durante la validación del método SRID (es decir, el intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia debe ser menor o igual que $x \pm 1,2$). El número de análisis se selecciona en función de la cantidad de análisis necesarios para lograr el criterio de aceptación de precisión. Esto será aplicable cada vez que se revalide el método, lo que significa que el número de análisis independientes puede ser diferente en función de la cepa y de los reactivos de SRID.

Cada análisis es independiente, lo que significa que los análisis se realizan utilizando diferentes muestras y diferentes geles de agarosa, y se calcula la media ponderada del siguiente modo:

Se comprueba la homogeneidad del análisis válido independiente realizando una prueba estadística de χ^2 , tal como se describe en el método 5.3 de la Ph. Eur., edición actual, "Análisis estadístico de resultados de ensayos y pruebas biológicas" capítulo 6.2.2 "Homogeneidad de las potencias estimadas".

- Si los resultados son homogéneos, se calcula la media ponderada de conformidad con el método 5.3 de la Ph. Eur., edición actual, capítulo 6.2.3 "Cálculo de la media ponderada y límites de confianza".
- Si los resultados son heterogéneos: los análisis independientes se invalidan y se realizan nuevos análisis independientes.



2.2.2.6 Criterios de validez de cada análisis independiente

Cada prueba independiente se considera válida si se cumplen los siguientes requisitos:

- Los parámetros estadísticos de cada prueba se cumplen para la muestra de referencia (factor de regresión y dispersión).
- Los límites de la muestra de prueba se encuentran dentro de los límites de extrapolación de la curva.
- No hay ningún efecto de dilución.
- Los límites de confianza ($P = 0,95$) no son inferiores al 80 % ni superiores al 125 % del contenido estimado de antígeno HA.
- La revisión del diámetro medio de la dilución de la referencia del antígeno sin diluir se encuentra dentro de los límites de los gráficos de control.
- Se observa un anillo para el antígeno de referencia.



Sección 3.2.P.5.4 Análisis de lotes

Índice

Lista de tablas	2
1 Introducción	3
2 Descripción de los lotes	3
2.1 Producto final a granel	3
2.2 Producto llenado	4
3 Análisis de lotes	5
3.1 Resultados de los lotes de PFAG	5
3.2 Resultados de los lotes de FP	9
4 Conclusión	12



Lista de tablas

Tabla 1: Descripción del lote de PFAG.....	3
Tabla 2: Descripción del lote de FP	4
Tabla 3: Linaje del FP	5
Tabla 4: Resultados de las pruebas de liberación de QIV, lotes de PFAG	6
Tabla 5: Contenido de antígeno HA en µg/dosis (resultados de IPC), PFAG	8
Tabla 6: Resultados de la prueba de liberación de los lotes de FP de QIV para la planta de Le Trait	10
Tabla 7: Resultados de la prueba de liberación de los lotes de FP de QIV para la planta de VDR de Sanofi Pasteur.....	11



Lista de abreviaturas: vea la sección 2.3 Resumen general de calidad, Introducción.

1 Introducción

Esta sección proporciona la descripción de los lotes del producto final a granel (PFAG) de la vacuna antigripal tetravalente (QIV) y del producto llenado (FP), con los datos correspondientes de los análisis de lotes. Los datos y los resultados de los lotes de PFAG y FP se presentan a continuación.

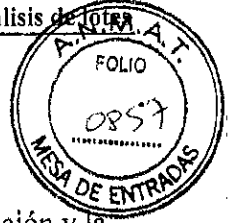
2 Descripción de los lotes

2.1 Producto final a granel

La planta de elaboración, los números de lote, los tamaños de lote, las fechas de elaboración y la utilización del lote para cada lote de PFAG se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1: Descripción del lote de PFAG

Planta de elaboración	Número de lote	Tamaño del lote (L)	Fecha de elaboración	Uso del lote
Sanofi Pasteur, planta de Val de Reuil (VDR)	FDV02328	405,174	04 JUN 2014	Formulación de lotes clínicos, Estudio de validación del proceso
	FDV02329	401,691	05 JUN 2014	
	FDV02330	401,492	19 JUN 2014	
	FDV02380	991,741	03 DIC 2014	Estudio de validación del proceso
	FDV02381	1 000,199	18 DIC 2014	
	FDV02421	950,249	02 OCT 2015	



2.2 Producto llenado

La planta de elaboración, los números de lote, los tamaños de lote, las fechas de elaboración y la utilización del lote para cada lote de PFAG se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2: Descripción del lote de FP

Planta de elaboración	Número de lote	Tamaño del lote (jeringas)	Fecha de elaboración	Uso del lote
Sanofi Winthrop Industrie, Planta de Le Trait	S4456	737 662	03 de julio de 2014	Lotes clínicos Estudio de validación del proceso Estudio de compatibilidad del cierre para el tapón-émbolo de clorobutilo
	S4457	729 301	06 de julio de 2014	
	S4458	729 312	15 de julio de 2014	
Sanofi Pasteur planta de VDR	FDNC2174	591 092	07 ENE 2015	Estudio de validación del proceso
	FDNC2173	914 159	12 ENE 2015	
	FDNC2199	911 478	28 de enero de 2015	
	FDNC2478	906 847	12 OCT 2015	

El linaje de los lotes entre el PFAG y el FP para la QIV se presenta en la Tabla 3.

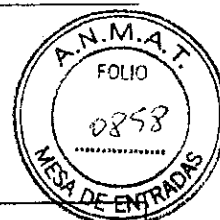


Tabla 3: Linaje del FP

FP		PFAG correspondiente	
Planta de elaboración	Número de lote	Planta de elaboración	Número de lote
Sanofi Winthrop Industrie, Planta de Le Trait	S4456	Sanofi Pasteur planta de VDR	FDV02328
	S4457		FDV02329
	S4458		FDV02330
Sanofi Pasteur planta de VDR	FDNC2174	Sanofi Pasteur, planta de VDR	FDV02380
	FDNC2173		FDV02380
	FDNC2199		FDV02381
	FDNC2478		FDV02421

3 Análisis de lotes

Los resultados analíticos obtenidos en lotes de PFAG y de FP de la QIV se presentan a continuación.

3.1 Resultados de los lotes de PFAG

Los resultados de las pruebas de liberación de los lotes de PFAG de la QIV se presentan en la Tabla 4.



Sanofi Pasteur
Vacuna antigripal tetravalente (virión fraccionado, inactivado)

Sección 3.2.P.5.4
Análisis de lotes

Tabla 4: Resultados de las pruebas de liberación de QIV, lotes de PFAG


Prueba	Referencia al método	Criterio de aceptación	Número de lote					
			FDV02328	FDV02329	FDV02330	FDV02380	FDV02381	FDV02421
Esterilidad bacteriana y fúngica	Ph. Eur., 2.6.1, edición actual	Sin multiplicación microbiana	Sin multiplicación microbiana.	Sin multiplicación microbiana.	Sin multiplicación microbiana.	Sin multiplicación microbiana.	Sin multiplicación microbiana.	Sin multiplicación microbiana.
Contenido de formaldehído libre	Método interno	≤60 µg/mL	37	37	35	36	37	36
Contenido proteico total	Método interno basado en el método n.º 2.5.9 de la Ph. Eur., edición actual, y en el método n.º 2.5.33 (método 7, procedimiento A) de la Ph. Eur., edición actual.	≤600 µg/mL	344	319	331	344	338	335
Contenido de ovoalbúmina	Ph. Eur., 2.7.1, edición actual	≤100 ng/mL	15	10	11	15,5	14,0	13
Proporción [contenido proteico total/contenido de antígeno hemaglutinina (HA)]*	/ Por cálculo	≤ 6	2	2	2	2	2	2

* Los resultados del contenido de antígeno HA [obtenidos como prueba de control durante el proceso (IPC) en la etapa de PFAG] utilizados para el cálculo de la proporción [contenido proteico total/contenido de antígeno HA] se presentan a continuación en la Tabla 5.

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
APODERADA
SANOFI PASTEUR S.A.



Los resultados de la proporción [contenido proteico total/contenido de antígeno HA] de los de PFAG se obtuvieron utilizando los resultados del contenido proteico total (como parte de las pruebas de liberación) y resultados adicionales del contenido de HA determinado como prueba de IPC en la etapa de PFAG. Los resultados de IPC se presentan a continuación en la Tabla 5.


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
APODERADA
SANOFI PASTEUR S. A.

