



Sanofi Pasteur  
Vacuna antigripal tetravalente (virión fraccionado, inactivado)

Sección 3.2.P.5.4  
Análisis de lotes

Tabla 5: Contenido de antígeno HA en µg/dosis (resultados de IPC), PFAG

| Cepa                                     | Referencia al método            | Criterio de aceptación  | FDV02328†  | FDV02329†  | FDV02330†  | FDV02380‡  | FDV02381‡  | FDV02421‡  |
|--|---------------------------------|---|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| A/California/7/2009 (NYMC X-179A) (H1N1) | Ph. Eur. 2.7.1, edición actual* | Objetivo: 13 µg/dosis por cada cepa en la etapa de FP.  | 20 (17-24) | 19 (17-22) | 16 (14-18) | 18 (16-21) | 17 (15-20) | 17 (15-19) |
| A/Texas/50/2012 (NYMC X-223A) (H3N2)     |                                 | El límite inferior de confianza (p = 0,95) del contenido estimado de antígeno HA no es menor que 12 µg/dosis por cada cepa. | 19 (16-23) | 20 (17-23) | 17 (14-20) | 18 (17-19) | 18 (17-20) | 17 (14-20) |
| B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria)     |                                 | 18 (16-20)  | 17 (16-19) | 17 (15-18) | 18 (16-21) | 18 (16-20) | 19 (18-21) |            |
| B/Massachusetts/2/2012 (linaje Yamagata) |                                 | 16 (14-18)  | 18 (17-19) | 18 (15-22) | 16 (15-18) | 16 (14-18) | 20 (18-21) |            |

\* La prueba de contenido de antígeno HA se realiza mediante el método clásico de inmunodifusión radial simple (SRID) para las cepas A y por el método de SRID bivalente para las cepas B.

† Para los lotes FDV02328, FDV02329 y FDV02330, se realizaron dos análisis independientes para la prueba de contenido de antígeno HA en las cepas B y se calculó el promedio ponderado, según el método n.º 5.3 de la Ph. Eur., edición actual, como se describe en la sección 3.2.P.2.3 Desarrollo del proceso de elaboración. Se realizó un análisis en las cepas A para esos mismos lotes.

‡ Para los lotes FDV02380, FDV02381 y FDV02421, se realizó un análisis para la prueba de contenido de antígeno HA en las cepas A y en las cepas B.

ROXANA MONTEMILONE  
DIRECTORA TÉCNICA  
APODERADA  
SANOFI PASTEUR S.A.





### 3.2 Resultados de los lotes de FP

Los resultados de la prueba de liberación de los lotes de FP de QIV se resumen en la Tabla 6 y la Tabla 7.






Tabla 6: Resultados de la prueba de liberación de los lotes de FP de QIV para la planta de Le Trait

| Prueba                                    | Referencia al método             | Criterio de aceptación   | Planta de Le Trait             |                                |                                |
|---|----------------------------------|--|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
|   |                                  |  | S4456†                         | S4457†                         | S4458†                         |
| Esterilidad bacteriana y fúngica          | Ph. Eur., 2.6.1, edición actual  | Sin multiplicación microbiana  | Sin multiplicación microbiana. | Sin multiplicación microbiana. | Sin multiplicación microbiana. |
| Aspecto                                   | Ph. Eur., 2.9.20, edición actual | Líquido incoloro y opalescente   | Líquido incoloro, opalescente  | Líquido incoloro, opalescente  | Líquido incoloro, opalescente  |
| pH  | Ph. Eur., 2.2.3, edición actual  | 6,8-7,6  | 7,3                            | 7,5                            | 7,3                            |
| Volumen extraíble                         | Ph. Eur., 2.9.17, edición actual | ≥ volumen nominal  | Cumple                         | Cumple                         | Cumple                         |
| Identificación del antígeno HA            | Ph. Eur. 2.7.1, edición actual*  | Identificación positiva para las 4 cepas   | Positiva                       | Positiva                       | Positiva                       |
| Contenido de antígeno HA (µg/dosis)       |                                  | Objetivo: 15 µg/dosis por cada cepa<br>El límite inferior de confianza (p = 0,95) del contenido estimado de antígeno HA no es menor que 12 µg/dosis por cada cepa. |                                |                                |                                |
| A/California/7/2009 (NYMC X-179A) (H1N1)  |                                  |  | 17 (14 - 19)                   | 20 (17 - 23)                   | 16 (13 - 18)                   |
| A/Texas/50/2012 (NYMC X-223A) (H3N2)      |                                  |  | 19 (17 - 22)                   | 19 (16 - 23)                   | 18 (15 - 21)                   |
| B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria)      |                                  |  | 18 (17 - 19)                   | 18 (17 - 19)                   | 17 (16 - 19)                   |
| B/Massachusetts/2/2012 (linaje Yamagata). |                                  |  | 15 (13 - 17)                   | 17 (16 - 18)                   | 16 (15 - 18)                   |
| Contenido de endotoxinas bacterianas      | Ph. Eur., 2.6.14, edición actual | < 100 UI/dosis   | <0,25                          | <0,25                          | <0,25                          |
| Toxicidad anormal‡                        | Ph. Eur., 2.6.9, edición actual  | Ausencia de muertes o de signos de enfermedad en los 7 días siguientes a la inoculación.   | Cumple                         | Cumple                         | Cumple                         |

\* La prueba de contenido de antígeno HA se realiza mediante el método clásico de SRID para las cepas A y por el método de SRID bivalente para las cepas B.

† Se realizaron dos análisis independientes para la prueba de contenido de antígeno HA en las cepas B y se calculó la media ponderada, según el método 5.3 de la Ph. Eur., edición actual, como se describe en la sección 3.2.P.2.3 Desarrollo del proceso de elaboración. Se realizó un análisis con las cepas A.

‡ La prueba de toxicidad anormal solo se realiza en los primeros diez lotes.

  
ROXANA MONTEMILONE  
DIRECTORA TÉCNICA  
APODERADA  
SANOFI PASTEUR S.A.





**Tabla 7: Resultados de la prueba de liberación de los lotes de FP de QIV para la planta VDR de Sanofi Pasteur**

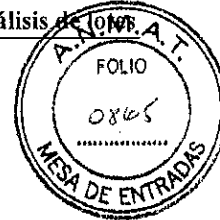
| Prueba                                    | Referencia al método             | Criterio de aceptación  | Sanofi Pasteur, planta de VDR  |                                |                                |                                |
|---|----------------------------------|---|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
|   |                                  |   | FDNC2174†                      | FDNC2173†                      | FDNC2199†                      | FDNC2478†                      |
| 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. |
| Aspecto                                   | Ph. Eur., 2.9.20, edición actual | Líquido incoloro y opalescente  | Líquido incoloro, opalescente  | Líquido incoloro, opalescente  | Líquido incoloro, opalescente  | Líquido incoloro, opalescente  |
| pH  | Ph. Eur., 2.2.3, edición actual  | 6,8-7,6   | 7,3                            | 7,3                            | 7,3                            | 7,3                            |
| Volumen extraíble                         | Ph. Eur., 2.9.17, edición actual | ≥ volumen nominal   | Cumple                         | Cumple                         | Cumple                         | Cumple                         |
| Identificación del antígeno HA            | Ph. Eur. 2.7.1, edición actual*  | Identificación positiva para las 4 cepas  | Positiva                       | Positiva                       | Positiva                       | Positiva                       |
| Contenido de antígeno HA (µg/dosis)       |                                  | Objetivo: 15 µg/dosis por cada cepa. El límite inferior de confianza (p = 0,95) del contenido estimado de antígeno HA no es inferior a 12 µg/dosis por cada cepa. | 17 (14-20)                     | 18 (17-20)                     | 17 (16-19)                     | 17 (15-19)                     |
| A/California/7/2009 (NYMC X-179A) (H1N1)  |                                  |   | 17 (15-20)                     | 17 (16-19)                     | 17 (16-19)                     | 18 (16-20)                     |
| A/Texas/50/2012 (NYMC X-223A) (H3N2)      |                                  |   | 20 (19-21)                     | 20 (17-22)                     | 19 (18-21)                     | 19 (17-21)                     |
| B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria)      |                                  |   | 18 (16-20)                     | 16 (14-18)                     | 16 (13-18)                     | 20 (18-22)                     |
| B/Massachusetts/2/2012 (linaje Yamagata). |                                  |   |                                |                                |                                |                                |
| Contenido de endotoxinas bacterianas      | Ph. Eur., 2.6.14, edición actual | < 100 UI/dosis  | <0,25                          | <0,25                          | <0,25                          | <0,25                          |
| Toxicidad anormal‡                        | Ph. Eur., 2.6.9, edición actual  | Ausencia de muertes o de signos de enfermedad en los 7 días siguientes a la inoculación.  | Cumple                         | Cumple                         | Cumple                         | Cumple                         |

\* La prueba de contenido de antígeno HA se realiza mediante el método clásico de SRID para las cepas A y por el método de SRID bivalente para las cepas B.

† Se realizó un análisis para la prueba de contenido de antígeno HA en las cepas A y las cepas B.

‡ La prueba de toxicidad anormal solo se realiza en los primeros diez lotes.





#### 4 Conclusión

Todos los resultados al momento de la liberación y los resultados de contenido de antígeno HA determinados como IPC para los lotes de PFAG FDV02328, FDV02329, FDV02330, FDV02380, FDV02381 y FDV02421 de QIV, se encuentran dentro de los criterios de aceptación definidos.

Todos los resultados de liberación de los lotes de FP S4456, S4457, S4458, FDNC2174, FDNC2173, FDNC2199 y FDNC2478 de QIV están dentro de los criterios de aceptación definidos.

  
ROXANA MONTEMILONE  
DIRECTORA TÉCNICA  
APODERADA  
SANOFI PASTEUR S. A.



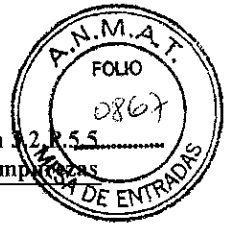


## Sección 3.2.P.5.5 Caracterización de las impurezas

### Índice

|  |   |
|--|---|
| Lista de tablas .....  | 2 |
| 1 Impurezas relacionadas con el principio activo .....       | 3 |
| 2 Impurezas relacionadas con el proceso de formulación ..... | 3 |
| 3 Impurezas relacionadas con el cierre del envase .....      | 3 |

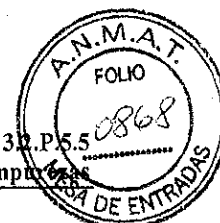




## Lista de tablas

Tabla 1: Contenido de impurezas relacionadas con el DS en la etapa de PFAG .....3





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

## 1 Impurezas relacionadas con el principio activo

Las posibles impurezas relacionadas con el proceso y los productos presentes en el producto llenado (FP) que se originan en el proceso de elaboración del principio activo (DS) se han descrito ampliamente para el DS en la sección 3.2.S.3.2 Impurezas. No existe ninguna otra impureza debida a los procesos de elaboración del producto final a granel (PFAG) y del FP.

El contenido residual de las siguientes impurezas, es decir, formaldehído (prueba de liberación), ovoalbúmina (prueba de liberación) y octoxinol 9 (prueba de control durante el proceso [IPC]), se evaluó en la etapa de PFAG. Los diferentes resultados obtenidos en los lotes de PFAG se presentan a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1: Contenido de impurezas relacionadas con el DS en la etapa de PFAG

| Impureza     | Criterio de aceptación | Número de lote |          |          |          |          |          |
|--------------|------------------------|----------------|----------|----------|----------|----------|----------|
|              |                        | FDV02328       | FDV02329 | FDV02330 | FDV02380 | FDV02381 | FDV02421 |
| Formaldehído | ≤60 µg/mL              | 37             | 37       | 35       | 36       | 37       | 36       |
| Ovoalbúmina  | ≤100 ng/mL             | 15,0           | 10,2     | 10,6     | 15,5     | 14,0     | 15       |
| Octoxinol 9  | ≤445 µg/mL             | 399            | 425      | 387      | 412      | 441      | 414      |

## 2 Impurezas relacionadas con el proceso de formulación

El excipiente añadido al DS es solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contiene cloruro de sodio, cloruro de potasio, fosfato disódico dihidrato, dihidrogenofosfato de potasio y agua para inyectables (WFI). Todos estos componentes son materiales de grado farmacopeico.

El proceso de elaboración consiste en la mezcla de los cuatro DS y el excipiente, seguido por la filtración, el llenado aséptico y colocación de tapones (vea la sección 3.2.P.3.3 Descripción del proceso de elaboración y controles del proceso). Estos pasos no producen ninguna impureza adicional en el FP.

## 3 Impurezas relacionadas con el cierre del envase

Los estudios que demuestran que las características del producto farmacéutico (DP) no se ven afectadas por las impurezas relacionadas con el cierre del envase se describen en la sección 3.2.P.2.4 Sistema de cierre del envase, 3.2.P.8.1 Resumen y conclusiones de estabilidad y 3.2.P.8.3 Datos de estabilidad.






## Sección 3.2.P.5.6 Justificación de las especificaciones

### Índice

|          |  |          |
|----------|--|----------|
| <b>1</b> | <b>Introducción.....</b>   | <b>2</b> |
| <b>2</b> | <b>Producto final a granel .....</b>   | <b>2</b> |
| 2.1      | Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica.....                                | 2        |
| 2.2      | Contenido de formaldehído libre .....  | 2        |
| 2.3      | Contenido proteico total.....  | 3        |
| 2.4      | Contenido de ovoalbúmina .....   | 3        |
| 2.5      | Proporción [contenido proteico total/contenido de antígeno hemaglutinina]..... | 3        |
| <b>3</b> | <b>Producto llenado.....</b>   | <b>4</b> |
| 3.1      | Esterilidad bacteriana y fúngica.....  | 4        |
| 3.2      | Aspecto .....  | 4        |
| 3.3      | pH.....  | 4        |
| 3.4      | Volumen extraíble.....   | 5        |
| 3.5      | Contenido e identificación del antígeno HA.....                                | 5        |
| 3.6      | Contenido de endotoxinas bacterianas .....                                     | 5        |
| 3.7      | Ensayo de toxicidad anormal .....  | 6        |

  
ROXANA MONTEMILONE  
DIRECTORA TÉCNICA  
APODERADA  
SANOFI PASTEUR S. A.





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

## 1 Introducción

En esta sección se presentan las justificaciones de la especificación de liberación de las etapas de producto farmacéutico (DP) de la vacuna antigripal tetravalente (QIV).

La especificación de liberación (es decir, la lista de pruebas, el método utilizado y los criterios de aceptación) se basa en las reglamentaciones vigentes, tales como:

- Ph. Eur. 0153, edición actual, "Vacunas para uso en seres humanos";
- Ph. Eur. 0158, edición actual, "Vacuna antigripal (virión fraccionado, inactivada)";
- ICH Q6B "Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products" [especificaciones: procedimientos de prueba y criterios de aceptación para productos biotecnológicos/biológicos] septiembre de 1999.
- Serie de informes técnicos de la OMS (TRS) n.º 927, 2005, anexo 3, "Recommendations for the Production and Control of Influenza Vaccines (Inactivated)" [recomendaciones para la producción y el control de vacunas antigripales (inactivadas)].

Los métodos utilizados son los requeridos por las reglamentaciones antes mencionadas.

Los criterios de aceptación se establecieron de conformidad con las monografías de la Ph. Eur. y otras reglamentaciones antes mencionadas o basándose en la experiencia obtenida durante el desarrollo del producto farmacéutico.

## 2 Producto final a granel

### 2.1 Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica

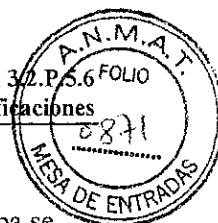
La prueba de esterilidad bacteriana y fúngica es un requisito de la monografía 0158 de la Ph. Eur. y de la TRS 927 de la OMS, para el PFAG. El método de filtración por membrana y el criterio de aceptación cumplen con los requisitos de la Ph. Eur. (método 2.6.1 "Esterilidad" de la Ph. Eur., edición actual).

El criterio de aceptación es un requisito de seguridad regulatorio.

### 2.2 Contenido de formaldehído libre

Se utiliza formaldehído para la inactivación del virus. El monitoreo de su eliminación lo requiere tanto la monografía 0158 de la Ph. Eur., edición actual, como la monografía 0153 de la Ph. Eur., edición actual. Como se indica en la monografía 0158 de la Ph. Eur., edición actual, se puede realizar en la etapa de producto final a granel (PFAG) o en la etapa de producto llenado (FP).





Teniendo en cuenta que el PFAG y el FP están compuestos por la misma matriz, esta prueba se lleva a cabo en la etapa de PFAG para armonizar la especificación con la vacuna antigripal trivalente estacional (TIV) de Sanofi Pasteur Francia. Esto también permite reducir el número de lotes que hay que analizar porque hay menos lotes de PFAG que de FP.

La evaluación del contenido de formaldehído se realiza mediante el método colorimétrico interno de Nash.

El criterio de aceptación se basa en el utilizado para el control y la liberación de la TIV, que es de  $\leq 60 \mu\text{g/mL}$ . El cambio en la composición de la vacuna de TIV a QIV provocó una ligera elevación de la concentración de formaldehído en el PFAG; no obstante, esta elevación no afecta el límite de  $60 \mu\text{g/mL}$ .

Este criterio de aceptación es más estricto que el requisito regulatorio ya que el límite superior recomendado por la monografía 0158 de la Ph. Eur., edición actual, y por la monografía 0153 de la Ph. Eur., edición actual, es de  $0,2 \text{ g/L}$ .

### 2.3 Contenido proteico total

Según la monografía n.º 0158 de la Ph. Eur., edición actual, y la TRS n.º 927 de la OMS, la prueba de contenido proteico total se debe realizar en la etapa de PFAG.

La prueba se realiza por el método de Kjeldahl y está basada en el método 2.5.9 "Determinación de nitrógeno después de la digestión con ácido sulfúrico" de la Ph. Eur., edición actual, y en el método 2.5.33 "Proteínas totales" (método 7, procedimiento A) de la Ph. Eur., edición actual.

El criterio de aceptación para el contenido proteico total cumple con la monografía 0158 de la Ph. Eur., edición actual, que es "no mayor que  $300 \mu\text{g}$  por dosis humana de la vacuna". Considerando que una dosis de vacuna es igual que  $0,50 \text{ mL}$ , la concentración de proteína total en el PFAG no debe superar los  $600 \mu\text{g/mL}$ .

### 2.4 Contenido de ovoalbúmina

Según la monografía n.º 0158 de la Ph. Eur., edición actual, y la TRS n.º 927 de la OMS, la prueba de contenido de ovoalbúmina se debe realizar en la etapa de PFAG.

La prueba se lleva a cabo por ELISA de conformidad con el método 2.7.1 "Métodos inmunoquímicos" de la Ph. Eur., edición actual.

El criterio de aceptación es  $\leq 100 \text{ ng/mL}$ , correspondientes a  $\leq 50 \text{ ng/dosis}$ , y está basado en los criterios de aceptación utilizados para el control y la liberación de la TIV. Este criterio de aceptación es más estricto que el límite recomendado por la monografía 0158 de la Ph. Eur., edición actual, que requiere no más de  $1 \mu\text{g}$  por dosis humana en el FP (considerando una dosis de  $0,50 \text{ mL}$ ).

### 2.5 Proporción [contenido proteico total/contenido de antígeno hemaglutinina]

Según la monografía n.º 0158 de la Ph. Eur., edición actual, y la TRS n.º 927 de la OMS, la proporción [contenido proteico total/contenido de antígeno hemaglutinina (HA)] se determina en





la etapa de PFAG. Como la prueba de contenido proteico total se lleva a cabo en la etapa de PFAG, la proporción [contenido proteico total/contenido de antígeno HA] se determina en esta etapa utilizando el resultado de una prueba adicional de contenido de antígeno HA, realizada en el PFAG como una prueba de control durante el proceso (IPC). Para realizar este cálculo, se conservan los valores obtenidos con el método clásico para las cepas A y los valores obtenidos con el método bivalente para las cepas B (para ampliar la explicación, vea la sección 3.2.P.5.3 Validación de los procedimientos analíticos).

El criterio de aceptación está basado en el requisito regulatorio de la monografía 0158 de la Ph. Eur., edición actual, y de la TRS 927 de la OMS que estableció que el contenido proteico total "no es superior a seis veces el contenido total de antígeno HA determinada de la forma descrita en el análisis".

### 3 Producto llenado

#### 3.1 Esterilidad bacteriana y fúngica

La prueba de esterilidad bacteriana y fúngica es un requisito de la monografía 0158 de la Ph. Eur. y de la TRS 927 de la OMS, para el FP. El método de filtración por membrana y el criterio de aceptación cumplen con los requisitos de la Ph. Eur. (método 2.6.1 "Sterility" [esterilidad] de la Ph. Eur., edición actual).

El criterio de aceptación es un requisito de seguridad regulatorio.

#### 3.2 Aspecto

De conformidad con la ICH Q6B (sección 4.2.1) y la monografía 0158 de la Ph. Eur., edición actual, la prueba de aspecto se realiza en la etapa de FP. La finalidad de la prueba es documentar la uniformidad del producto y proporcionar una declaración cualitativa que describa el estado físico, el color y la claridad del producto, como lo sugiere la ICH Q6B.

La prueba cumple con las especificaciones del método 2.9.20 "Contaminación por partículas: partículas visibles" de la Ph. Eur., edición actual.

El criterio de aceptación es "Líquido incoloro opalescente" y está basado en la monografía 0158 de la Ph. Eur. que indica que "La vacuna tiene el aspecto de un líquido ligeramente opalescente" y en los resultados obtenidos con los lotes de viabilidad.

#### 3.3 pH

Según lo establecido en la monografía 0153 de la Ph. Eur., edición actual:

- La prueba de pH se realiza en la etapa de FP.
- El método cumple con las especificaciones del método 2.2.3. "Determinación potenciométrica del pH", de la Ph. Eur., edición actual.





La finalidad de esta prueba es documentar la uniformidad y la estabilidad del FP.

El criterio de aceptación es el mismo que el utilizado para el control y la liberación de la TIV, el rango de aceptación [6,8-7,6] se basa en el pH de la solución salina tamponada con fosfato (PBS).

### 3.4 Volumen extraíble

Según lo establecido en la monografía 0153 de la Ph. Eur., edición actual, la prueba de volumen extraíble se realiza en la etapa de FP, de conformidad con el método 2.9.17 "Prueba de volumen extraíble de las preparaciones parenterales" de la Ph. Eur., edición actual.

El criterio de aceptación es " $\geq$  volumen nominal" y cumple con la recomendación del método n.º 2.9.17 de la Ph. Eur., que es no menor que el volumen nominal (es decir, 0,50 mL por dosis). Permite la administración de un mínimo de 0,50 mL de vacuna por jeringa.

### 3.5 Contenido e identificación del antígeno HA

Según la monografía n.º 0158 de la Ph. Eur., edición actual, y la TRS n.º 927 de la OMS, la prueba de contenido de antígeno HA y la identificación del antígeno HA mediante inmunodifusión radial simple (SRID) se realiza en la etapa de FP.

El método de SRID cumple con las especificaciones del método 2.7.1 de la Ph. Eur., edición actual, según los requisitos de la monografía 0158 de la Ph. Eur., edición actual. Debido a la reactividad cruzada entre las cepas B, se optimizó el método de SRID para analizar cepas B, y se basa en un antígeno estándar de referencia bivalente, mientras que para las cepas A se sigue utilizando la referencia clásica (para ampliar la explicación, vea la sección 3.2.P.5.3 Validación de los procedimientos analíticos).

El criterio de aceptación para el contenido de antígeno HA se basa en las monografías mencionadas anteriormente, es decir, el límite inferior de confianza ( $p = 0,95$ ) no es menor que el 80 % de la cantidad indicada en la etiqueta para cada cepa (límite inferior: 12  $\mu\text{g}$ /cepa/dosis). El valor objetivo para QIV es de 15  $\mu\text{g}$  de antígeno HA/cepa/dosis.

Cabe destacar que el número de análisis independientes para la liberación está establecido para cumplir con los criterios de precisión definidos durante la validación del método de SRID (para ampliar la explicación, vea la sección 3.2.P.5.2 Procedimientos analíticos).

El criterio de aceptación para la identificación es "Identificación positiva para las 4 cepas".

### 3.6 Contenido de endotoxinas bacterianas

Según la monografía n.º 0158 de la Ph. Eur. 0153, edición actual, y la TRS n.º 927 de la OMS, la prueba de contenido de endotoxinas bacterianas se realiza en la etapa de FP.

La prueba de contenido de endotoxinas se realiza mediante el método cromogénico cinético de lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL), de conformidad con el método 2.6.14 "Prueba cinética cromogénica" de la Ph. Eur., edición actual.





El criterio de aceptación es “<100 UI/dosis” y cumple con la monografía 0158 de la Ph. Eur., edición actual, que exige menos de 100 UI por dosis humana.

### 3.7 Ensayo de toxicidad anormal

Según la monografía n.º 0158 de la Ph. Eur., edición actual, y la TRS n.º 927 de la OMS, la prueba de toxicidad anormal debe realizarse en la etapa de FP. El método de prueba cumple con el método 2.6.9 “Toxicidad anormal” de la Ph. Eur., edición actual.

El criterio de aceptación es “Ausencia de muertes o signos de enfermedad en los 7 días posteriores a la inyección” y se define de conformidad con el método 2.6.9 de la Ph. Eur., edición actual.

Como sugiere la monografía n.º 0158 de la Ph. Eur., edición actual, y la TRS n.º 927 de la OMS, la prueba se puede omitir para la liberación de rutina de lotes una vez que la uniformidad de la producción haya quedado bien establecida y cuando se hayan implementado las buenas prácticas de manufactura (BPM). La prueba de toxicidad anormal se realizó en seis lotes de validación de FP elaborados según las BPM (vea la sección 3.2.P.5.4 Análisis de lotes). Los resultados de la prueba de toxicidad anormal cumplieron el criterio de aceptación.

Basándose en estos resultados y en lo permitido por los documentos regulatorios publicados (monografía 0158 de la Ph. Eur., edición actual, TRS n.º 927 de la OMS y guía técnica de la Dirección Europea para la Calidad de los Medicamentos (EDQM) sobre la elaboración de monografías<sup>1</sup>), se prevé eliminar la prueba de toxicidad anormal una vez que se haya establecido definitivamente la uniformidad de la producción. La uniformidad de la producción con respecto al ensayo de toxicidad anormal se establecerá en 10 lotes de BPM elaborados según el proceso industrial actual, como sugiere la guía técnica del EDQM, que estableció que “la prueba de toxicidad anormal (o una prueba equivalente) se lleva a cabo en un número suficiente de lotes (usualmente 10) durante la fase de producción inicial”.

Como consecuencia, una vez que se haya establecido la uniformidad de la producción y sin cambios significativos en el proceso de producción, no se realizará más la prueba de toxicidad anormal con el FP.

<sup>1</sup> Guía técnica del EDQM para la elaboración de monografías sobre vacunas y otros medicamentos inmunológicos para uso humano, edición 2008.





## Sección 3.2.P.6 Estándares o materiales de referencia

### Índice

|          |   |          |
|----------|---|----------|
| <b>1</b> | <b>Producto final a granel .....</b>                            | <b>2</b> |
| 1.1      | Estándar de referencia para el formaldehído .....               | 2        |
| 1.2      | Estándar de referencia para la ovoalbúmina .....                | 2        |
| <b>2</b> | <b>Producto llenado.....</b>                                    | <b>2</b> |
| 2.1      | Estándares de referencia para la hemaglutinina.....             | 2        |
| 2.1.1    | Antígeno .....  | 3        |
| 2.1.2    | Evaluación de los estándares de referencia de antígeno HA ..... | 3        |
| 2.2      | Estándar de referencia para las endotoxinas bacterianas .....   | 3        |





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

## 1 Producto final a granel

### 1.1 Estándar de referencia para el formaldehído

El estándar de referencia utilizado para determinar el contenido de formaldehído libre en el producto final a granel (PFAG) (vea la sección 3.2.P.5.2 Procedimientos analíticos) es una solución de formaldehído preparada a partir de una solución madre de formaldehído al 40 % m/v aproximadamente, suministrada por un proveedor externo.

La solución madre se conserva a temperatura ambiente, mientras que la solución preparada internamente se conserva a  $+5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Cuando se utiliza un nuevo lote de estándar de referencia de formaldehído, la referencia se cualifica de conformidad con los procedimientos internos vigentes.

El estándar de referencia se cualifica mediante una serie de análisis frente a un lote anterior.

Se presenta un ejemplo del certificado de análisis.

### 1.2 Estándar de referencia para la ovoalbúmina

El estándar de referencia de ovoalbúmina utilizado para el análisis de ovoalbúmina realizado con el PFAG (vea la sección 3.2.P.5.2 Procedimientos analíticos) lo suministra un proveedor externo. Este estándar de referencia de ovoalbúmina se suministra liofilizado y la solución estándar se prepara mediante rehidratación según las instrucciones del proveedor.

El estándar de referencia de ovoalbúmina se almacena a  $+5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$  cuando está liofilizada y a  $\leq -20\text{ }^{\circ}\text{C}$  una vez rehidratado.

Se presenta un ejemplo del certificado de análisis.

## 2 Producto llenado

### 2.1 Estándares de referencia para la hemaglutinina

Los estándares de referencia del antígeno hemaglutinina (HA) utilizados para el análisis de antígeno hemaglutinina (HA) por inmunodifusión radial simple (SRID) en la etapa de producto llenado (FP) constan de un preparado de antígeno de referencia y de un antisuero, según se describe en la sección 3.2.P.5.2 Procedimientos analíticos. Las instrucciones de uso del antígeno y





del antisuero las proporciona el Centro Colaborador de la OMS que suministra la cepa gripal correspondiente.

### 2.1.1 Antígeno

Los antígenos de referencia del antígeno HA para las cepas A (H1N1 y H3N2) son soluciones de referencia específicas de cada cepa, mientras que los antígenos de referencia para las cepas B son una referencia bivalente compuesta por antígenos de referencia de tipo B/linaje Victoria y de tipo B/linaje Yamagata, según se describe en la sección 3.2.P.5.2 Procedimientos analíticos.

El antígeno se prepara a partir de cada cepa viral purificada e inactivada. El contenido unitario exacto lo determina el centro colaborador de la OMS que suministra el antígeno. El estándar de referencia del antígeno se reconstituye según las instrucciones de uso suministradas por el proveedor.

### 2.1.2 Evaluación de los estándares de referencia de antígeno HA

La referencia específica utilizada para las cepas A (H1N1 y H3N2) se cualifica según se describe en la sección 3.2.S.5 Estándares o materiales de referencia (protocolo y resultados de los análisis).

La referencia bivalente utilizada para las cepas B (linaje Victoria y linaje Yamagata) se cualifica para cada cambio de lote de reactivos, según se describe en la sección 3.2.S.5 Estándares o materiales de referencia. El protocolo descrito en la sección 3.2.S.5 Estándares o materiales de referencia se lleva a cabo con el producto farmacéutico (PFAG/FP). El análisis estadístico de los resultados se realiza según se describe en la sección 3.2.S.5 Estándares o materiales de referencia, excepto los criterios para el intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia, que no debe superar  $\approx 1,2$ .

## 2.2 Estándar de referencia para las endotoxinas bacterianas

El estándar de referencia utilizado para el análisis del contenido de endotoxinas bacterianas forma parte de un kit de pruebas suministrado por un proveedor externo. Sanofi Pasteur puede utilizar proveedores alternativos que dispongan de una cualificación satisfactoria.

Esta referencia denominada endotoxina estándar de control (CSE) corresponde al polvo liofilizado de endotoxinas de *E. coli* almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . La CSE es calibrada por el proveedor contra la solución de endotoxina estándar de referencia (RSE; proporcionada por la Dirección Europea de Calidad del Medicamento [EDQM]), según se requiere en el método 2.6.14 de la Ph. Eur., edición actual, "Endotoxinas bacterianas". Sanofi Pasteur confirma la calibración de la CSE contra la RSE al momento de la entrega, mediante un procedimiento interno.

Las CSE se proporcionan con un certificado de análisis en el que se explica la forma en que el proveedor del kit realiza la comparación RSE/CSE. Este certificado también proporciona el volumen para la reconstitución de la referencia.

Se proporciona un ejemplo del certificado de análisis para la solución de CSE.

La CSE se almacena a  $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  (en forma de polvo). La RSE se almacena a  $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  después de su reconstitución con agua apirógena.





### Sección 3.2.P.4.3 Validación de los procedimientos analíticos

Los procedimientos analíticos utilizados para controlar los componentes de la solución salina tamponada con fosfato, contenida en la vacuna antigripal tetravalente, son los que se describen en las monografías de la farmacopea (vea la sección 3.2.P.4.1 Especificaciones). No se presenta información de validación para las pruebas realizadas de conformidad con los métodos de la farmacopea.





## Sección 3.2.P.5.3 Validación de los procedimientos analíticos

### Índice

|  |           |
|--|-----------|
| Lista de tablas .....  | 3         |
| Lista de figuras .....   | 6         |
| <b>1</b> <b>Introducción</b> .....   | <b>8</b>  |
| <b>2</b> <b>Producto final a granel</b> .....  | <b>8</b>  |
| 2.1     Pruebas farmacopeicas detalladas en la Farmacopea Europea .....                  | 8         |
| 2.2     Pruebas no descritas o no detalladas en la Farmacopea Europea .....              | 8         |
| 2.2.1    Contenido de formaldehído libre .....   | 8         |
| 2.2.1.1   Panorama.....  | 8         |
| 2.2.1.2   Resumen de la validación.....  | 8         |
| 2.2.1.3   Resultados y análisis .....  | 10        |
| 2.2.1.4   Conclusión.....  | 17        |
| 2.2.2    Contenido proteico total .....  | 17        |
| 2.2.2.1   Panorama.....  | 17        |
| 2.2.2.2   Resumen de la validación.....  | 17        |
| 2.2.2.3   Resultados y análisis .....  | 18        |
| 2.2.2.4   Conclusión.....  | 22        |
| 2.2.3    Contenido de ovoalbúmina.....   | 23        |
| 2.2.3.1   Panorama.....  | 23        |
| 2.2.3.2   Resumen de la validación.....  | 23        |
| 2.2.3.3   Resultados y análisis .....  | 24        |
| 2.2.3.4   Conclusión.....  | 32        |
| 2.2.4    Proporción [contenido proteico total/contenido de antígeno hemaglutinina] ..... | 32        |
| <b>3</b> <b>Producto llenado</b> .....   | <b>32</b> |
| 3.1     Pruebas farmacopeicas detalladas en la Farmacopea Europea .....                  | 32        |
| 3.2     Pruebas no descritas o no detalladas en la Farmacopea Europea .....              | 32        |
| 3.2.1    Introducción.....   | 32        |
| 3.2.2    Contenido e identificación del antígeno HA .....                                | 33        |
| 3.2.2.1   Panorama.....  | 33        |





|         |  |    |
|---------|--|----|
| 3.2.2.2 | Resumen de la validación.....  | 34 |
| 3.2.2.3 | Resultados y análisis .....  | 35 |
| 3.2.2.4 | Conclusión.....  | 54 |
| 3.2.3   | Estudios adicionales que respaldan el uso de SRID bivalente para las cepas B ..... | 54 |
| 3.2.3.1 | Comparación de la exactitud.....   | 54 |
| 3.2.3.2 | Acumulación de conocimientos para el método de SRID bivalente .....                | 55 |
| 3.2.3.3 | Conclusión.....  | 76 |





## Lista de tablas

|   |    |
|---|----|
| Tabla 1: Resultados de la validación .....  | 9  |
| Tabla 2: Especificidad: concentración medida frente a concentración teórica ( $\mu\text{g/mL}$ ).....   | 10 |
| Tabla 3: Especificidad: Recuperación porcentual entre el agregado medido y el agregado teórico .....  | 10 |
| Tabla 4: Precisión: concentraciones de formaldehído residual ( $\mu\text{g/mL}$ ) .....   | 11 |
| Tabla 5: Precisión: Características de repetibilidad y precisión intermedia.....  | 12 |
| Tabla 6: Linealidad: concentraciones medidas frente a concentraciones teóricas previstas ( $\mu\text{g/mL}$ ) .....                               | 13 |
| Tabla 7: Linealidad: ecuación de la recta de regresión .....  | 13 |
| Tabla 8: Exactitud: Recuperación porcentual media por concentración .....   | 15 |
| Tabla 9: LQ: concentraciones de formaldehído residual ( $\mu\text{g/mL}$ ) .....  | 16 |
| Tabla 10: LQ: Repetibilidad y precisión intermedia .....  | 16 |
| Tabla 11: Contenido proteico total, resumen de la validación .....  | 18 |
| Tabla 12: Precisión, contenido proteico total medido ( $\mu\text{g/mL}$ ) .....   | 19 |
| Tabla 13: Características de repetibilidad y precisión intermedia.....  | 19 |
| Tabla 14: Linealidad, concentraciones proteicas totales medidas.....  | 20 |
| Tabla 15: Linealidad: ecuación de la recta de regresión .....   | 20 |
| Tabla 16: Exactitud, recuperaciones calculadas entre las concentraciones proteicas totales medidas y las concentraciones proteicas teóricas ..... | 22 |
| Tabla 17: Resultados de exactitud.....  | 22 |
| Tabla 18: Contenido de ovoalbúmina, resumen de validación.....  | 23 |
| Tabla 19: Especificidad: recuperación porcentual promedio calculada entre la ovoalbúmina agregada medida y la ovoalbúmina agregada teórica.....   | 24 |
| Tabla 20: Especificidad, resultados de las muestras con agregado .....  | 24 |
| Tabla 21: Densidad óptica (DO) medida en la muestra sin ovoalbúmina.....  | 25 |
| Tabla 22: Precisión, concentraciones medidas de ovoalbúmina en la vacuna pura ( $\text{ng/mL}$ ).....   | 25 |
| Tabla 23: Características de repetibilidad y precisión intermedia.....  | 26 |
| Tabla 24: Linealidad, concentraciones medidas de ovoalbúmina ( $\text{ng/mL}$ ).....  | 26 |
| Tabla 25: Linealidad: ecuación de la recta de regresión .....   | 27 |
| Tabla 26: Exactitud, porcentajes de recuperación.....   | 28 |





|  |    |
|--|----|
| Tabla 27: Resultados de exactitud.....   | 29 |
| Tabla 28: DO de la muestra testigo .....   | 30 |
| Tabla 29: LQ, recuperación porcentual calculada entre la dilución medida y la dilución teórica ..                                | 31 |
| Tabla 30: Precisión del LQ.....  | 31 |
| Tabla 31: Resumen de los resultados de la validación, método de SRID .....   | 34 |
| Tabla 32: Presencia o ausencia de anillo en cada referencia.....   | 37 |
| Tabla 33: Precisión, contenido de antígeno HA ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), cepa A/H1N1 .....                                     | 39 |
| Tabla 34: Resultados de repetibilidad y precisión intermedia, cepa A/H1N1 .....  | 39 |
| Tabla 35: Precisión, contenido de antígeno HA ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), cepa A/H3N2 .....                                     | 40 |
| Tabla 36: Resultados de repetibilidad y precisión intermedia, cepa A/H3N2 .....  | 40 |
| Tabla 37: Precisión, concentración de antígeno HA ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), cepa B/linaje Victoria .....                      | 40 |
| Tabla 38: Resultados de repetibilidad y precisión intermedia, cepa B/linaje Victoria .....                                       | 41 |
| Tabla 39: Precisión, concentración de antígeno HA ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), cepa B/linaje Yamagata .....                      | 41 |
| Tabla 40: Resultados de repetibilidad y precisión intermedia, cepa B/linaje Yamagata .....                                       | 41 |
| Tabla 41: Linealidad: Contenido de antígeno HA ( $\mu\text{g}/0,5\text{mL}$ ), cepa A/H1N1 .....                                 | 42 |
| Tabla 42: Linealidad: ecuación de la recta de regresión .....  | 43 |
| Tabla 43: Linealidad: Contenido de antígeno HA, cepa A/H3N2 ( $\mu\text{g}/0,5\text{mL}$ ).....                                  | 44 |
| Tabla 44: Linealidad: ecuación de la recta de regresión .....  | 44 |
| Tabla 45: Linealidad: Contenido de antígeno HA, cepa B/linaje Victoria ( $\mu\text{g}/0,5\text{mL}$ ) referencia bivalente ..... | 46 |
| Tabla 46: Linealidad: ecuación de la recta de regresión .....  | 46 |
| Tabla 47: Linealidad: Contenido de antígeno HA, cepa B/linaje Yamagata ( $\mu\text{g}/0,5\text{mL}$ ) referencia bivalente ..... | 48 |
| Tabla 48: Linealidad: ecuación de la recta de regresión .....  | 48 |
| Tabla 49: Recuperación porcentual, cepa A/H1N1 .....   | 50 |
| Tabla 50: Recuperación porcentual promedio, cepa A/H1N1.....   | 50 |
| Tabla 51: Recuperación porcentual, cepa A/H3N2.....  | 50 |
| Tabla 52: Recuperación porcentual promedio, cepa A/H3N2.....   | 51 |
| Tabla 53: Recuperación porcentual, cepa B/linaje Victoria, referencia bivalente .....  | 51 |
| Tabla 54: Recuperación porcentual promedio, cepa B/linaje Victoria.....  | 51 |
| Tabla 55: Recuperación porcentual, cepa B/linaje Yamagata, referencia bivalente .....  | 53 |
| Tabla 56: Recuperación porcentual promedio, cepa B/linaje Yamagata .....   | 53 |





Tabla 57: Exactitud de los resultados de validación obtenidos con ambas combinaciones de la cepa B .....55

Tabla 58: Plan experimental para la combinación cepa B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria) / cepa B/Florida/4/2006 (linaje Yamagata), estudios de agregado .....57

Tabla 59: Resultados del contenido de antígeno HA para la combinación de cepas B; experimento 1 [contenido variable de B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria)] .....58

Tabla 60: Resultados del contenido de antígeno HA para la combinación de cepas B, experimento 2 [contenido variable de B/Florida/4/2006 (linaje Yamagata)] .....59

Tabla 61: Plan experimental para la combinación cepa B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria) / cepa B/Florida/4/2006 (linaje Yamagata), estudios de degradación .....61

Tabla 62: Resultados del contenido de antígeno HA de la cepa B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria) en los estudios de degradación, experimento 3 [niveles variables de cepa B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria) degradada] .....61

Tabla 63: Resultados del contenido de antígeno HA de la cepa B/Florida/4/2006 (linaje Yamagata) en los estudios de degradación, experimento 4 [niveles variables de la cepa B/Florida/4/2006 (linaje Yamagata) degradada] .....64

Tabla 64: Plan experimental para la combinación cepa B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria) / cepa B/Massachusetts/2/2012 (linaje Yamagata), estudios de agregado .....67

Tabla 65: Plan experimental para la combinación cepa B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria) / cepa B/Massachusetts/2/2012 (linaje Yamagata), estudios de degradación .....69

Tabla 66: Plan experimental para la combinación cepa B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria) / cepa B/Hubei/Wujiagang/158/2009 (linaje Yamagata), estudios de agregado .....72

Tabla 67: Plan experimental para la combinación cepa B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria) / cepa B/Hubei/Wujiagang/158/2009 (linaje Yamagata), estudios de degradación .....74





## Lista de figuras

|   |    |
|---|----|
| Figura 1: Gráfico de linealidad, concentración de formaldehído .....  | 14 |
| Figura 2: Gráfico de linealidad, concentración proteica .....   | 21 |
| Figura 3: Gráfico de linealidad, concentración de ovoalbúmina.....  | 28 |
| Figura 4: Gráfico de linealidad, cepa A/California/7/2009 (NYMC X-179A) (H1N1).....   | 43 |
| Figura 5: Gráfico de linealidad, cepa A/Texas/50/2012 (NYMC X 223A) (H3N2).....   | 45 |
| Figura 6: Gráfico de linealidad, cepa B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria).....   | 47 |
| Figura 7: Gráfico de linealidad, cepa B/Massachusetts/2/2012 (linaje Yamagata).....   | 49 |
| Figura 8: Resultados de recuperación (%) para la cepa B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria) en el estudio de agregado, experimento 1 .....                               | 58 |
| Figura 9: Resultados de recuperación (%) para la cepa B/Florida/4/2006 (linaje Yamagata) en el estudio de agregado, experimento 2 .....                                 | 59 |
| Figura 10: Resultados del contenido de antígeno HA (en µg/dosis) para la cepa B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria) en el estudio de degradación, experimento 3.....     | 63 |
| Figura 11: Resultados de recuperación (%) para la cepa B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria) en el estudio de degradación, experimento 3 .....                           | 63 |
| Figura 12: Resultados del contenido de antígeno HA (en µg/dosis) para la cepa B/Florida/4/2006 (linaje Yamagata) en el estudio de degradación, experimento 4.....       | 65 |
| Figura 13: Resultados de recuperación (%) para la cepa B/Florida/4/2006 (linaje Yamagata) en el estudio de degradación, experimento 4 .....                             | 65 |
| Figura 14: Resultados de recuperación (%) para la cepa B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria) en el estudio de agregado, experimento 5 .....                              | 68 |
| Figura 15: Resultados de recuperación (%) para la cepa B/Massachusetts/2/2012 (linaje Yamagata) en el estudio de agregado, experimento 6.....                           | 68 |
| Figura 16: Resultados del contenido de antígeno HA (en µg/dosis) para la cepa B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria) en el estudio de degradación, experimento 7.....     | 71 |
| Figura 17: Resultados del contenido de antígeno HA (en µg/dosis) para la cepa B/Massachusetts/2/2012 (linaje Yamagata) en el estudio de degradación, experimento 8..... | 71 |
| Figura 18: Resultados de recuperación (%) para la cepa B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria) en el estudio de agregado, experimento 9 .....                              | 73 |
| Figura 19: Resultados de recuperación (%) para la cepa B/Hubei/Wujiagang/158/2009 (linaje Yamagata) en el estudio de agregado, experimento 10.....                      | 73 |





Figura 20: Resultados del contenido de antígeno HA (en  $\mu\text{g}/\text{dosis}$ ) para la cepa B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria) en los estudios de degradación, experimento 11 .....75

Figura 21: Resultados del contenido de antígeno HA (en  $\mu\text{g}/\text{dosis}$ ) para la cepa B/Hubei/Wujiagang/158/2009 (linaje Yamagata) en los estudios de degradación, experimento 12 .....76





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

## 1 Introducción

En esta sección se presenta un resumen detallado de los informes de validación de los métodos analíticos utilizados para la liberación del producto farmacéutico (DP) de la vacuna antigripal tetravalente (QIV) cuando la prueba no se lleva a cabo de conformidad con la Ph. Eur. o cuando la prueba no está detallada en la Ph. Eur.

## 2 Producto final a granel

### 2.1 Pruebas farmacopeicas detalladas en la Farmacopea Europea

La prueba de esterilidad bacteriana y fúngica, realizada por filtración a través de membrana de conformidad con la Ph. Eur. 2.6.1, edición actual, "Esterilidad", se validó de conformidad con los requisitos de la Ph. Eur. (el informe de validación está disponible pero no se incluye).

### 2.2 Pruebas no descritas o no detalladas en la Farmacopea Europea

#### 2.2.1 Contenido de formaldehído libre

##### 2.2.1.1 Panorama

El contenido de formaldehído libre se determina con un análisis colorimétrico según el método de Nash. Con acetyl-acetona y en presencia de un exceso de sales de amoníaco, el formaldehído produce 3,5-diacetil 1,4 dihidrolutidina, un compuesto amarillo, que se mide por fotometría a 413 nm (pico de absorción). La intensidad del color es proporcional a la cantidad de formaldehído presente en la muestra.

Dado que el método de prueba para la determinación del contenido de formaldehído libre es un análisis cuantitativo, las características estudiadas son la especificidad, la linealidad, la exactitud, la precisión (precisión intermedia y repetibilidad) y el límite de cuantificación (LQ).

Los resultados de validación obtenidos con el producto final a granel (PFAG) se pueden aplicar también a la etapa de producto llenado (FP), ya que la única diferencia entre las etapas de PFAG y FP es el paso de llenado.

##### 2.2.1.2 Resumen de la validación

Los resultados de la validación se resumen en la Tabla 1 a continuación.





Tabla 1: Resultados de la validación

| Característica                  | Criterio de aceptación  | Resultado  |
|---------------------------------|---|--|
| <b>Especificidad</b>            | La recuperación porcentual promedio entre la concentración medida del agregado y el agregado teórico debe hallarse entre el 80 % y el 120 % a los niveles +1 y +2.                                    | La recuperación porcentual para los niveles +1 y +2 es respectivamente igual al:<br>103 % y 111 %  |
| <b>Precisión</b>                | El intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia debe ser $\leq x/\pm 1,2$   | Media general:<br>—<br>$m = 1,497$ ; es decir, 31,4 $\mu\text{g/mL}$ en forma aritmética.<br>La desviación estándar relativa de la repetibilidad y de la precisión intermedia es respectivamente igual al:<br>1,5 % y 2,2 %<br>Intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia para 1 corrida con 1 medición:<br>$\pm 0,022$ es decir, $x/\pm 1,05$ en expresión aritmética.              |
| <b>Linealidad</b>               | $P_{\text{linealidad}} \leq 0,01$<br>$P_{\text{falta de ajuste}} > 0,05$<br>(de lo contrario, la curvatura sería insignificante con respecto a la regresión).   | $P_{\text{linealidad}} < 0,0001$<br>$P_{\text{Fda}} < 0,01$<br>=> Pero la curvatura es despreciable<br><br>$Y = 0,005 + 1,004 \times X$<br>Donde X = concentración teórica prevista del formaldehído residual ( $\log[\mu\text{g/mL}]$ ) y Y = concentración medida del formaldehído residual ( $\log[\mu\text{g/mL}]$ ).<br>$R^2 = 0,9998$<br>Rango de linealidad:<br>[0,4 – 82,7] $\mu\text{g/mL}$ |
| <b>Exactitud</b>                | La recuperación porcentual promedio calculada para los 4 niveles de concentración teórica esperada debe hallarse entre el 80 % y el 120 %.  | En función del nivel de concentración, la recuperación porcentual media se sitúa entre el 101 % y el 107 %.  |
| <b>Límite de cuantificación</b> | El intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia debe ser $\leq x/\pm 1,3$<br>La recuperación porcentual promedio en el límite de cuantificación debe hallarse entre el 80 % y el 120 %. | El límite de cuantificación es:<br>$LQ = 0,4 \mu\text{g/mL}$<br>La recuperación porcentual promedio en el límite de cuantificación es:<br>102 %<br>Intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia para 1 corrida con 1 medición:<br>$\pm 0,028$ es decir, $x/\pm 1,07$ en expresión aritmética.  |

El método es específico, lineal, exacto y preciso, y el LQ de 0,4  $\mu\text{g/mL}$  es exacto y preciso.

El método es válido para cuantificar el formaldehído residual en la QIV en las etapas de PFAG y FP.





### 2.2.1.3 Resultados y análisis

#### 2.2.1.3.1 Especificidad

El diseño experimental se basó en 3 series independientes realizadas por 3 operadores en diferentes días. Cada corrida incluyó el análisis de un rango de 3 concentraciones de formaldehído residual (2 vacunas con agregado y 1 vacuna sin agregado).

Los resultados sometidos a análisis son las concentraciones de formaldehído residual, expresadas en µg/mL, y se presentan en la Tabla 2.

**Tabla 2: Especificidad: concentración medida frente a concentración teórica (µg/mL)**

| Nivel | QIV                   |              | Agregado: Formaldehído residual |              | Concentración medida (µg/mL) |         |         |
|-------|-----------------------|--------------|---------------------------------|--------------|------------------------------|---------|---------|
|       | Concentración (µg/mL) | Volumen (mL) | Concentración (µg/mL)           | Volumen (mL) | Serie 1                      | Serie 2 | Serie 3 |
| 0     | 31,551                | 1,000        | 372                             | 0,000        | 31,882                       | 31,101  | 31,674  |
| +1    |                       | 0,975        |                                 | 0,025        | 39,920                       | 40,467  | 40,681  |
| +2    |                       | 0,875        |                                 | 0,125        | 80,513                       | 79,047  | 77,930  |

Todos los cálculos se realizan con logaritmos, dado que los datos siguen una distribución logarítmica normal. La concentración de la vacuna sin agregado es la concentración promedio de formaldehído residual de la vacuna sin agregado (= 31,551 µg/mL: media geométrica de las 3 series).

La especificidad se analiza por el método de agregado y recuperación, y se estima por la recuperación entre el agregado medido y el agregado teórico calculada con las siguientes fórmulas:

$$R(\ln\%) = \frac{(\text{measured concentration with spike} \times \text{total volume solution}) - (\text{concentration of undiluted vaccine} \times \text{volume of undiluted vaccine})}{\text{theoretical concentration spike} \times \text{volume of spike}} \times 100$$

Los resultados de especificidad se presentan en la Tabla 3 a continuación.

**Tabla 3: Especificidad: Recuperación porcentual entre el agregado medido y el agregado teórico**

| Nivel | Recuperación porcentual (%) |
|-------|-----------------------------|
| +1    | 103 %                       |
| +2    | 111 %                       |

Como se indica anteriormente, la recuperación porcentual se halla entre el 80 % y el 120 % para los niveles +1 y +2 y por lo tanto el método es específico.





### 2.2.1.3.2 Precisión

El diseño experimental fue el siguiente:

- Precisión (precisión intermedia): se analizaron 3 series en condiciones de precisión intermedia: los análisis se llevaron a cabo de manera independiente utilizando el mismo método, en una muestra primaria homogénea, en el mismo laboratorio y los realizaron 3 operadores en 3 días diferentes.
- Precisión (repetibilidad): en cada serie se realizaron 6 análisis en condiciones que garantizaban la repetibilidad: los análisis se llevaron a cabo de manera independiente, utilizando el mismo método, en una muestra primaria homogénea, en el mismo laboratorio, con el mismo equipo, por el mismo operador y en un día.

El dato sometido a análisis es la concentración de formaldehído residual, expresada en  $\mu\text{g/mL}$ , y los resultados se presentan a continuación en la Tabla 4.

**Tabla 4: Precisión: concentraciones de formaldehído residual ( $\mu\text{g/mL}$ )**

| Serie 1 | Serie 2 | Serie 3 |
|---------|---------|---------|
| 31,882  | 31,101  | 31,674  |
| 31,900  | 30,926  | 30,291  |
| 32,107  | 31,420  | 31,165  |
| 32,025  | 31,094  | 30,929  |
| 32,064  | 31,437  | 30,726  |
| 31,857  | 31,297  | 30,869  |

Todos los cálculos se realizan con logaritmos, dado que los datos siguen una distribución logarítmica normal.

La precisión del método se prueba mediante los siguientes pasos, aplicados a los datos de la Tabla 4:

- La homogeneidad de las varianzas intragrupal se verifica mediante la prueba de Cochran.
- Una vez obtenida la homogeneidad, se calculan los parámetros de repetibilidad y precisión intermedia.

Los principales resultados del análisis estadístico son:

- Media general = 1,497; en expresión aritmética:  $31,37\mu\text{g/mL}$ ;
- La prueba de Cochran muestra que las varianzas de las 3 series no son homogéneas. Por lo tanto, se mantiene la varianza más alta (el caso más desfavorable) como estimación de la varianza de la repetibilidad, es decir, la varianza de la serie 3.

Los resultados obtenidos para la precisión se presentan en la Tabla 5.





**Tabla 5: Precisión: Características de repetibilidad y precisión intermedia**

| Característica                          | Desviación estándar relativa | Desviación estándar | Intervalo de confianza del 95 % con k = 1 corrida y n = 1 medición |
|---|------------------------------|---------------------|--|
| Características de repetibilidad        | 1,49 %                       | 0,006               | /  |
| Características de precisión intermedia | 2,18 %                       | 0,009               | ±0,022; es decir, x/+ 1,05 en expresión aritmética                 |

Puesto que el intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia es menor que x/+ 1,2, el método es preciso.

**2.2.1.3.3 Linealidad**

El diseño experimental se basó en 3 series independientes realizadas por 3 operadores en diferentes días. Cada corrida incluyó el análisis de un rango de 5 concentraciones de formaldehído residual (2 vacunas diluidas, 1 vacuna sin diluir y 2 vacunas con agregado).

Los resultados sometidos a análisis son las concentraciones de formaldehído residual, expresadas en µg/mL, y se presentan a continuación en la Tabla 6.

La concentración promedio de formaldehído residual en la muestra sin diluir es ≈ 31,551 µg/mL (media geométrica de las 3 series). Por lo tanto, la concentración teórica prevista de formaldehído residual de la muestra se calcula del siguiente modo:

$$\text{Theoretical expected concentration} = \frac{(\text{concentration of sample} \times \text{volume of sample}) + (\text{concentration of spike} \times \text{volume of spike})}{\text{volume of sample} + \text{volume of spike} + \text{volume of diluent}}$$

Donde la concentración del agregado = 372 µg/mL (referencia de la materia prima = 37,2 % [p/p] diluida a 1/1000).

Por ejemplo:

- al nivel -2: la concentración teórica prevista es

$$\frac{(31.551 \times 3.500) + (372 \times 0.0)}{3.500 + 0.0 + 246.5} = 0,442 \text{ µg/mL}$$

- al nivel +2: la concentración teórica prevista es

$$\frac{(31.551 \times 0.875) + (372 \times 0.125)}{0.875 + 0.0 + 0.125} = 74,107 \text{ µg/mL}$$

Los diferentes resultados obtenidos se presentan en la Tabla 6.

ROXANA MONTEMILONE  
 DIRECTORA TÉCNICA  
 APODERADA  
 SANOFI PASTEUR S.A.





**Tabla 6: Linealidad: concentraciones medidas frente a concentraciones teóricas previstas (µg/mL)**

| Nivel | QIV                   |              | Agregado: Formaldehído residual |              | Diluyente: Agua para preparados inyectables | Concentración teórica prevista (µg/mL) | Concentración medida (µg/mL) |         |         |
|-------|-----------------------|--------------|---------------------------------|--------------|---|--|------------------------------|---------|---------|
|       | Concentración (µg/mL) | Volumen (mL) | Concentración (µg/mL)           | Volumen (mL) | Volumen (mL)                                |  | Serie 1                      | Serie 2 | Serie 3 |
| -2    | 31,551                | 3,500        | 372                             | 0,000        | 246,5                                       | 0,442                                  | 0,453                        | 0,456   | 0,437   |
| -1    |                       | 1,500        |                                 | 0,000        | 23,5  | 1,893                                  | 1,932                        | 1,902   | 1,909   |
| 0     |                       | 1,000        |                                 | 0,000        | 0,0   | 31,551                                 | 31,882                       | 31,101  | 31,674  |
| +1    |                       | 0,975        |                                 | 0,025        | 0,0   | 40,062                                 | 39,920                       | 40,467  | 40,681  |
| +2    |                       | 0,875        |                                 | 0,125        | 0,0   | 74,107                                 | 80,513                       | 79,047  | 77,930  |

Nota: Todos los cálculos se realizan con logaritmos, dado que los datos siguen una distribución logarítmica normal.

La linealidad en el rango seleccionado se prueba mediante los siguientes pasos, aplicados a los datos que se presentan en la Tabla 6:

- Se verifica la homogeneidad de las varianzas límite mediante la prueba de Cochran.
- La dependencia entre la concentración teórica prevista de formaldehído residual y la concentración medida de formaldehído residual, y la linealidad de esta relación, se prueban mediante una regresión lineal no ponderada utilizando el método de los mínimos cuadrados. Debe mostrar una pendiente significativa y una desviación no significativa de la linealidad.

Como resultado,

- La prueba de Cochran muestra que las varianzas de los 5 niveles son homogéneas.
- El análisis de varianza permite llegar a la conclusión de que la pendiente es significativa y de que hay un buen ajuste de la regresión lineal ya que la curvatura es insignificante con respecto a la regresión: existe una dependencia lineal entre la concentración teórica (en logaritmos) y la concentración medida (en logaritmos).

Los resultados del análisis estadístico y la ecuación de la recta de regresión se presentan en la Tabla 7. El gráfico de linealidad se presenta en la Figura 1.

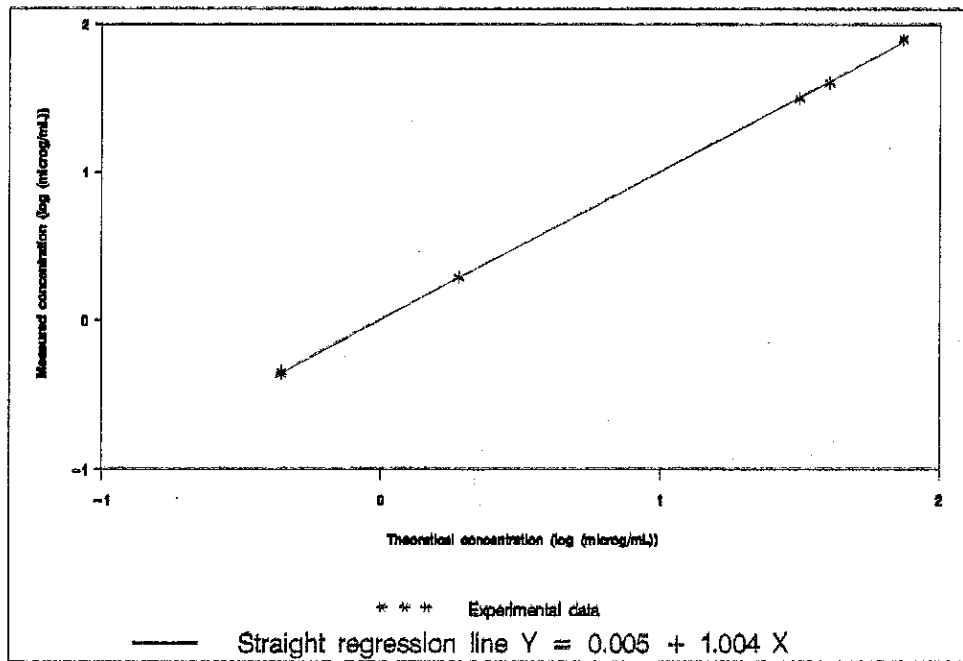
**Tabla 7: Linealidad: ecuación de la recta de regresión**

| ecuación de la recta de regresión  | Coefficiente de determinación (R <sup>2</sup> ) | Rango de linealidad en µg/mL |
|--|---|------------------------------|
| $Y = (0,005 \pm 0,010) + (1,004 \pm 0,008) \times X$   | R <sup>2</sup> = 0,9998                         | [0,4 – 82,7]                 |
| donde: X = concentración teórica (log[µg/mL]) y Y = concentración medida (log[µg/mL])        |   |                              |
| P <sub>linealidad</sub> < 0,0001 y P <sub>Fda</sub> < 0,01 (pero insignificante según Bliss) |   |                              |





Figura 1: Gráfico de linealidad, concentración de formaldehído



El método es lineal en el rango de [0,41 – 82,70] µg/mL. Teniendo en cuenta el LQ de 0,45 µg/mL, el método es lineal en el rango de [0,45 – 82,70] µg/mL.

Se cumplen todos los criterios de aceptación; por lo tanto, el método es lineal en una escala log-log.

#### 2.2.1.3.4 Exactitud

El diseño experimental se basó en 3 series independientes realizadas por 3 operadores en diferentes días. Cada corrida incluyó el análisis de un rango de 5 concentraciones de formaldehído residual (2 vacunas diluidas, 1 vacuna sin diluir y 2 vacunas con agregado).

Los resultados sometidos a análisis son las concentraciones de formaldehído residual, expresadas en µg/mL, que se presentan en la Tabla 6.

Puesto que la concentración teórica en la muestra de rutina (nivel 0, media geométrica de las 3 concentraciones medidas) se utiliza para calcular la concentración teórica prevista, este nivel no se incluye en los cálculos de la exactitud. Por lo tanto, la exactitud se estudia en 4 niveles de concentración.

La exactitud se prueba mediante los siguientes pasos, aplicados a los datos de la Tabla 6.

- Se calcula la recuperación porcentual para cada nivel de concentración teórica prevista y para cada grupo.
- Se verifica la homogeneidad de las varianzas intraniveles mediante la prueba de Cochran.

ROXANA MONTEMILONE  
DIRECTORA TÉCNICA  
APODERADA  
SANOFI PASTEUR S.A.





- Una vez obtenida la homogeneidad, la no significancia de las diferencias entre los niveles de concentración teórica prevista se demuestra mediante un análisis de varianza.
- Cuando se prueba la igualdad de las medias interniveles, se calcula la recuperación porcentual media global con los límites de confianza del 95 %.

Los principales resultados del análisis estadístico se presentan en la Tabla 8.

**Tabla 8: Exactitud: Recuperación porcentual media por concentración**

| Cálculo de recuperaciones (%) |  |           |
|-------------------------------|--|-----------|
| Nivel                         | Nivel de concentración teórica (µg/mL) | Media (%) |
| -2                            | 0,442                                  | 102 %     |
| -1                            | 1,893                                  | 101 %     |
| +1                            | 40,062                                 | 101 %     |
| +2                            | 74,107                                 | 107 %     |

Como resultado del estudio estadístico:

- La prueba de Cochran muestra que las varianzas de los niveles de los títulos teóricos previstos son homogéneas.
- El análisis de varianzas no permite concluir la igualdad de las medias interniveles.

Puesto que la recuperación porcentual promedio se encuentra entre el 80 % y el 120 %, el método es exacto.

#### 2.2.1.3.5 Límite de cuantificación

Se ha aplicado el diseño siguiente en el nivel -2 para determinar el LQ:

- Se realizaron 3 series en condiciones de precisión intermedia: los análisis se llevaron a cabo de manera independiente utilizando el mismo método, en una muestra primaria homogénea, en el mismo laboratorio y los realizaron 3 operadores en días diferentes.
- En cada serie se realizaron 6 análisis en condiciones que garantizaban la repetibilidad: los análisis se llevaron a cabo de manera independiente, utilizando el mismo método, en una muestra primaria homogénea, en el mismo laboratorio, con el mismo equipo, con el mismo operador y en un solo día.

El dato sometido a análisis es la concentración de formaldehído residual, expresada en µg/mL, que se presenta a continuación en la Tabla 9.

