



### 3.2.2.3.2 Precisión

El objetivo del análisis estadístico es demostrar que el procedimiento es preciso; es decir, repetible y reproducible.

Para cada cepa: Tres operadores realizan análisis en el mismo laboratorio, en diferentes medios días (condiciones de precisión intermedia). Para cada operador, se llevan a cabo 6 pruebas en condiciones de repetibilidad; es decir, utilizando el mismo equipo, en el tiempo más corto, usando el mismo preparado para la referencia. Cada prueba se realizó de manera independiente (preparaciones independientes de la muestra).

Según el análisis estadístico realizado con los datos: para cada lote, se ha utilizado la prueba de COCHRAN para estudiar la repetibilidad y las varianzas de precisión intermedia.

#### 3.2.2.3.2.1 Resultados de precisión, cepa A/California/7/2009 (NYMC X-179A) (H1N1)

El contenido de antígeno HA en los tres lotes analizados se presenta en la Tabla 33.

**Tabla 33: Precisión, contenido de antígeno HA ( $\mu\text{g/mL}$ ), cepa A/H1N1**

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
16,77	16,49	16,01
16,76	16,06	16,39
15,90	17,06	15,30
17,66	16,78	16,30
17,93	15,57	16,16
17,50	16,95	17,34

Los parámetros de repetibilidad, parámetros de precisión intermedia y el intervalo de confianza del 95 % para 1 corrida se presentan en la Tabla 34.

**Tabla 34: Resultados de repetibilidad y precisión intermedia, cepa A/H1N1**

	Desviación estándar	Varianzas	Intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia
Parámetros de repetibilidad	0,017	0,000305	-
Parámetros de precisión intermedia	0,019	0,000379	Para $k = 1$ y $n = 1$ : $\pm 0,041$ ; es decir $\times 1,10$ en expresión aritmética Para $k = 3$ y $n = 1$ : $\pm 0,024$ ; es decir $\times 1,06$ en expresión aritmética

Estos resultados cumplen los criterios de aceptación de la validación.

#### 3.2.2.3.2.2 Resultados de precisión, cepa A/Texas/50/2012 (NYMC X-223A) (H3N2)

El contenido de antígeno HA en el lote analizado se presenta en la Tabla 35.





**Tabla 35: Precisión, contenido de antígeno HA ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), cepa A/H3N2**

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
18,05	18,01	18,47
17,65	18,51	18,99
17,57	20,42	18,84
17,56	20,26	18,00
18,07	20,21	19,92
18,06	19,29	19,87

Los parámetros de repetibilidad, parámetros de precisión intermedia y el intervalo de confianza del 95 % para 1 corrida se presentan en la Tabla 36.

**Tabla 36: Resultados de repetibilidad y precisión intermedia, cepa A/H3N2**

	Desviación estándar	Varianzas	Intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia
Parámetros de repetibilidad	0,017	0,000289	-
Parámetros de precisión intermedia	0,025	0,000618	Para $k = 1$ y $n = 1$ : $\pm 0,052$ ; es decir $\times 1,13$ en expresión aritmética Para $k = 3$ y $n = 1$ : $\pm 0,030$ ; es decir $\times 1,07$ en expresión aritmética

Estos resultados cumplen los criterios de aceptación de la validación.

**3.2.2.3.2.3 Resultados de precisión, cepa B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria) referencia bivalente**

El contenido de antígeno HA en el lote analizado se presenta en la Tabla 37.

**Tabla 37: Precisión, concentración de antígeno HA ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), cepa B/linaje Victoria**

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
18,90	19,33	17,92
19,11	19,08	17,3
17,78	19,69	18,75
18,02	20,56	18,52
17,7	19,05	18,44
20,21	19,67	18,18

Los parámetros de repetibilidad, parámetros de precisión intermedia y el intervalo de confianza del 95 % para 1 corrida se presentan en la Tabla 38.





**Tabla 38: Resultados de repetibilidad y precisión intermedia, cepa B/linaje Victoria**

	Desviación estándar	Varianzas	Intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia
Parámetros de repetibilidad	0,016	0,000271	-
Parámetros de precisión intermedia	0,022	0,000489	Para $k = 1$ y $n = 1$ : $\pm 0,047$ ; es decir $\times 1,11$ en expresión aritmética Para $k = 3$ y $n = 1$ : $\pm 0,027$ ; es decir $\times 1,06$ en expresión aritmética

Estos resultados cumplen los criterios de aceptación de la validación.

**3.2.2.3.2.4 Resultados de precisión, cepa B/Massachusetts/2/2012 (linaje Yamagata) referencia bivalente**

El contenido de antígeno HA en el lote analizado se presenta en la Tabla 39.

**Tabla 39: Precisión, concentración de antígeno HA ( $\mu\text{g/mL}$ ), cepa B/linaje Yamagata**

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
17,89	17,97	18,78
18,10	16,58	17,60
18,58	16,61	17,58
18,83	16,97	19,23
19,03	16,19	19,17
17,56	16,64	17,46

Los parámetros de repetibilidad, parámetros de precisión intermedia y el intervalo de confianza del 95 % para 1 corrida se presentan en la Tabla 40.

**Tabla 40: Resultados de repetibilidad y precisión intermedia, cepa B/linaje Yamagata**

	Desviación estándar	Varianzas	Intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia
Parámetros de repetibilidad	0,017	0,000276	-
Parámetros de precisión intermedia	0,026	0,000682	Para $k = 1$ y $n = 1$ : $\pm 0,055$ ; es decir $\times 1,14$ en expresión aritmética Para $k = 3$ y $n = 1$ : $\pm 0,032$ ; es decir $\times 1,08$ en expresión aritmética

Estos resultados cumplen los criterios de aceptación de la validación.

**Conclusión**

La precisión es satisfactoria.

ROXANA MONTEMIOME  
 DIRECTORA TÉCNICA  
 APODERADA  
 SANOFI PASTEUR S.A.





### 3.2.2.3.3 Linealidad

El objetivo del análisis estadístico es demostrar que el procedimiento es lineal en el rango de concentraciones elegido.

Para cada cepa, al menos 2 operadores realizan análisis en el mismo laboratorio, en diferentes medios días (condiciones de precisión intermedia). Cada operador utiliza el mismo preparado como referencia.

Para cada operador, se llevan a cabo 5 niveles de concentración para la muestra. La linealidad en el rango elegido se analiza mediante los siguientes pasos:

- Se verifica la homogeneidad de las varianzas límite mediante la prueba de Cochran.
- La dependencia entre el contenido teórico de antígeno HA y el contenido medido de antígeno HA, así como la linealidad de esta relación, se analizan 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.

#### 3.2.2.3.3.1 Resultados de linealidad, cepa A/California/7/2009 (NYMC X-179A) (H1N1)

Los resultados detallados del estudio de linealidad se presentan en la Tabla 41.

**Tabla 41: Linealidad: Contenido de antígeno HA (µg/0,5mL), cepa A/H1N1**

Nivel	Cantidades de vacuna (mL)	Diluyente (PBS)	Cantidad de solución agregada a razón de 219,014 µg/mL (mL)	Contenido teórico de antígeno HA (µg/0,5mL) *	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
1	9	6,5	0	9,5806451613	10,35	9,54	9,80
2	9	2,5	0	12,913043478	13,31	12,67	12,73
3	9	1,5	0	14,142857143	14,41	14,25	15,09
4	10	0	0	16,5	17,67	17,74	16,62
5	10	0	1,1	25,716916137	27,34	27,31	26,26

\* Las concentraciones teóricas de antígeno HA se calculan a partir del valor objetivo de formulación: El valor objetivo de formulación es igual a 16,5 µg/0,5mL. Entonces, las concentraciones teóricas en µg/0,5 mL son:  
 Nivel 1:  $((2 * 16,5 * 9)/(9 + 6,5))/2 = 9,5806451613 \text{ µg/0,5mL}$   
 Nivel 2:  $((2 * 16,5 * 9)/(9 + 2,5))/2 = 12,913043478 \text{ µg/0,5mL}$   
 Nivel 3:  $((2 * 16,5 * 9)/(9 + 1,5))/2 = 14,142857143 \text{ µg/0,5mL}$   
 Nivel 4: 16,5 µg/0,5mL (valor objetivo de formulación)  
 Nivel 5:  $((2 * 16,5 * 10 + 219,014 * 1,1)/(10 + 1,1))/2 = 25,716916137 \text{ µg/0,5mL}$

  
 ROXANA MONTEMILONE  
 DIRECTORA TÉCNICA  
 APODERADA  
 SANOFI PASTEUR S.A.





Se calcularon los parámetros de la linealidad:

$$P_{\text{linealidad}} < 0,0001$$

$$P_{\text{desviación de la linealidad}} = 0,38$$

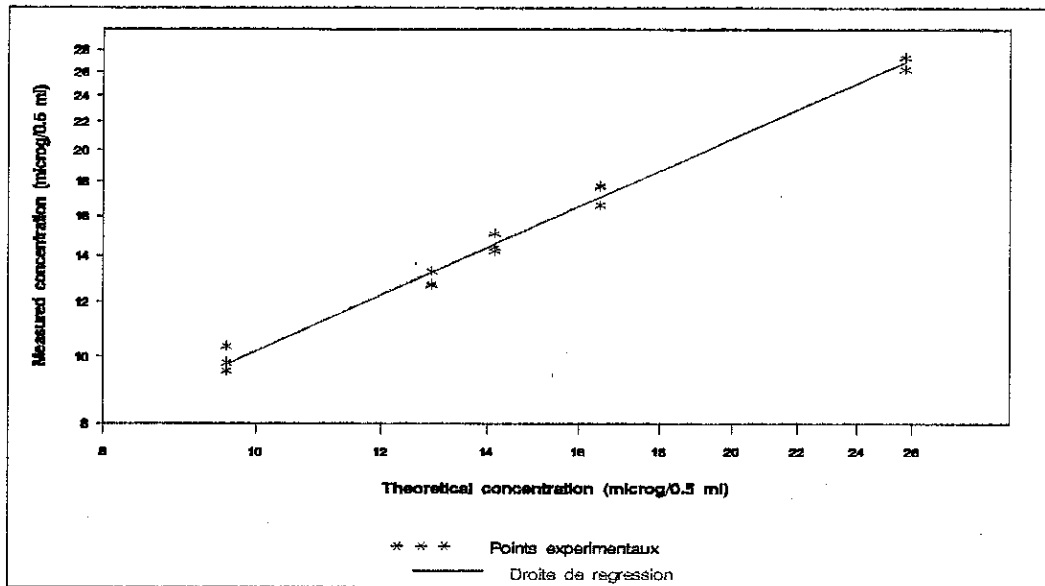
La ecuación de la recta de regresión se presenta en la Figura 4.

El gráfico de linealidad se presenta en la Tabla 42.

**Tabla 42: Linealidad: ecuación de la recta de regresión**

ecuación de la recta de regresión	Coefficiente de correlación lineal	Rango de linealidad (µg/0,5 mL)
$Y = (-0,020 \pm 0,067) + (1,029 \pm 0,057) \cdot X$	$r = 0,9958$ con 13 grados de libertad	[9,58-25,72]
X = concentración teórica (log(µg/0,5 mL)) Y = concentración medida (log(µg/0,5 mL))		

**Figura 4: Gráfico de linealidad, cepa A/California/7/2009 (NYMC X-179A) (H1N1)**



**3.2.2.3.3.2 Resultados de linealidad, cepa A/Texas/50/2012 (NYMC X-223A) (H3N2)**

Los resultados detallados del estudio de linealidad se presentan en la Tabla 43.

ROXANA MONTEMLONE  
 DIRECTORA TÉCNICA  
 APODERADA  
 SANOFI PASTEUR S.A.





Tabla 43: Linealidad: Contenido de antígeno HA, cepa A/H3N2 (µg/0,5mL)

Nivel	Cantidades de vacuna (mL)	Diluyente (PBS)	Cantidad de solución adicionada a 176,388 µg/mL (mL)	Contenido teórico de antígeno HA (µg/0,5mL) *	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
1	9	8,5	0	8,2285714286	10,38	10,29	9,69
2	9	4,5	0	10,666666667	12,76	12,84	12,27
3	9	1,75	0	13,395348837	16,99	15,34	15,38
4	10	0	0	16	18,92	18,26	18,18
5	10	0	1,1	23,154381293	26,35	25,74	24,83

\* Las concentraciones teóricas de antígeno HA se calculan a partir del valor objetivo de formulación: El valor objetivo de formulación es igual a 16 µg/0,5mL. Entonces, las concentraciones teóricas en µg/0,5 mL son:  
 Nivel 1:  $((2 * 16 * 9)/(9 + 8,5))/2 = 8,2285714286 \mu\text{g}/0,5\text{mL}$   
 Nivel 2:  $((2 * 16 * 9)/(9 + 4,5))/2 = 10,666666667 \mu\text{g}/0,5\text{mL}$   
 Nivel 3:  $((2 * 16 * 9)/(9 + 1,75))/2 = 13,395348837 \mu\text{g}/0,5\text{mL}$   
 Nivel 4: 16 µg/0,5mL (valor objetivo de formulación)  
 Nivel 5:  $((2 * 16 * 10 + 176,388 * 1,1)/(10 + 1,1))/2 = 23,154381293 \mu\text{g}/0,5\text{mL}$

Se calcularon los parámetros de la linealidad:

$$P_{\text{linealidad}} < 0,0001$$

$$P_{\text{desviación de la linealidad}} = 0,87$$

La ecuación de la recta de regresión se presenta en la Tabla 44.

El gráfico de linealidad se presenta en la Figura 5.

Tabla 44: Linealidad: ecuación de la recta de regresión

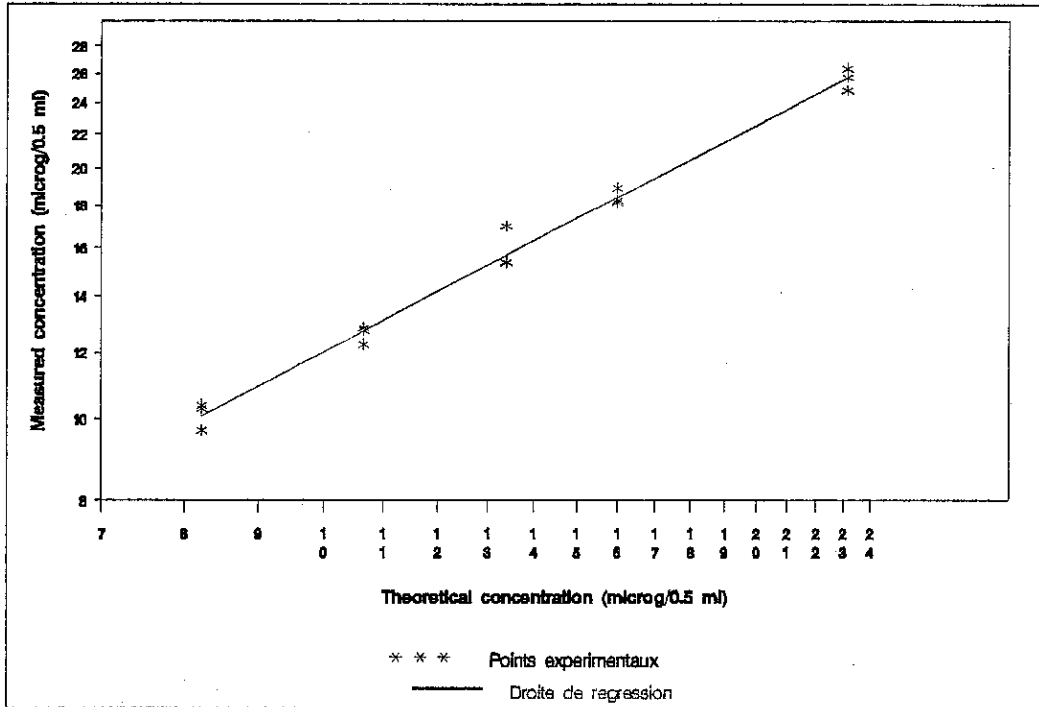
ecuación de la recta de regresión	Coefficiente de correlación lineal	Rango de linealidad (µg/0,5 mL)
$Y = (0,177 \pm 0,060) + (0,904 \pm 0,053) \cdot X$	$r = 0,9953$ con 13 grados de libertad	[8,23-23,15]
X = concentración teórica (log(µg/0,5 mL)) Y = concentración medida (log(µg/0,5 mL))		

ROXANA MONTEMLONE  
 DIRECTORA TÉCNICA  
 APODERADA  
 SANOFI PASTEUR S.A.





Figura 5: Gráfico de linealidad, cepa A/Texas/50/2012 (NYMC X 223A) (H3N2)

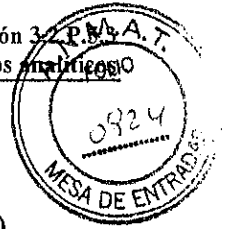


3.2.2.3.3.3 Resultados de linealidad, cepa B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria)

Los resultados detallados del estudio de linealidad se presentan en la Tabla 45.

ROXANA MONTEMILONE  
DIRECTORA TÉCNICA  
APODERADA  
SANOFI PASTEUR S.A.





**Tabla 45: Linealidad: Contenido de antígeno HA, cepa B/linaje Victoria (µg/0,5mL) referencia bivalente**

Nivel	Cantidades de vacuna (mL)	Diluyente (PBS)	Cantidad de solución agregada a razón de 176,388 µg/mL (mL)	Contenido teórico de antígeno HA (µg/0,5mL) *	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
1	9	8,5	0	8,7428571429	10,57	10,1	10,38
2	9	4,75	0	11,127272727	13,17	12,55	12,79
3	9	1,75	0	14,23255814	15,91	16,25	15,23
4	10	0	0	17	19,91	18,32	17,94
5	10	0	1,1	24,574732061	28,51	28,53	25,25

\* Las concentraciones teóricas de antígeno HA se calculan a partir del valor objetivo de formulación: El valor objetivo de formulación es igual a 17 µg/0,5mL. Entonces, las concentraciones teóricas en µg/0,5 mL son:  
 Nivel 1:  $((2 * 17 * 9)/(9 + 8,5))/2 = 8,7428571429 \text{ µg/0,5mL}$   
 Nivel 2:  $((2 * 17 * 9)/(9 + 4,75))/2 = 11,127272727 \text{ µg/0,5mL}$   
 Nivel 3:  $((2 * 17 * 9)/(9 + 1,75))/2 = 14,23255814 \text{ µg/0,5mL}$   
 Nivel 4: 17 µg/0,5mL (valor objetivo de formulación)  
 Nivel 5:  $((2 * 17 * 10 + 186,872 * 1,1)/(10 + 1,1))/2 = 24,574732061 \text{ µg/0,5mL}$

Se calcularon los parámetros de la linealidad:

$$P_{\text{linealidad}} < 0,0001$$

$$P_{\text{desviación de la linealidad}} = 0,62$$

La ecuación de la recta de regresión se presenta en la Tabla 46.

El gráfico de linealidad se presenta en la Figura 6.

**Tabla 46: Linealidad: ecuación de la recta de regresión**

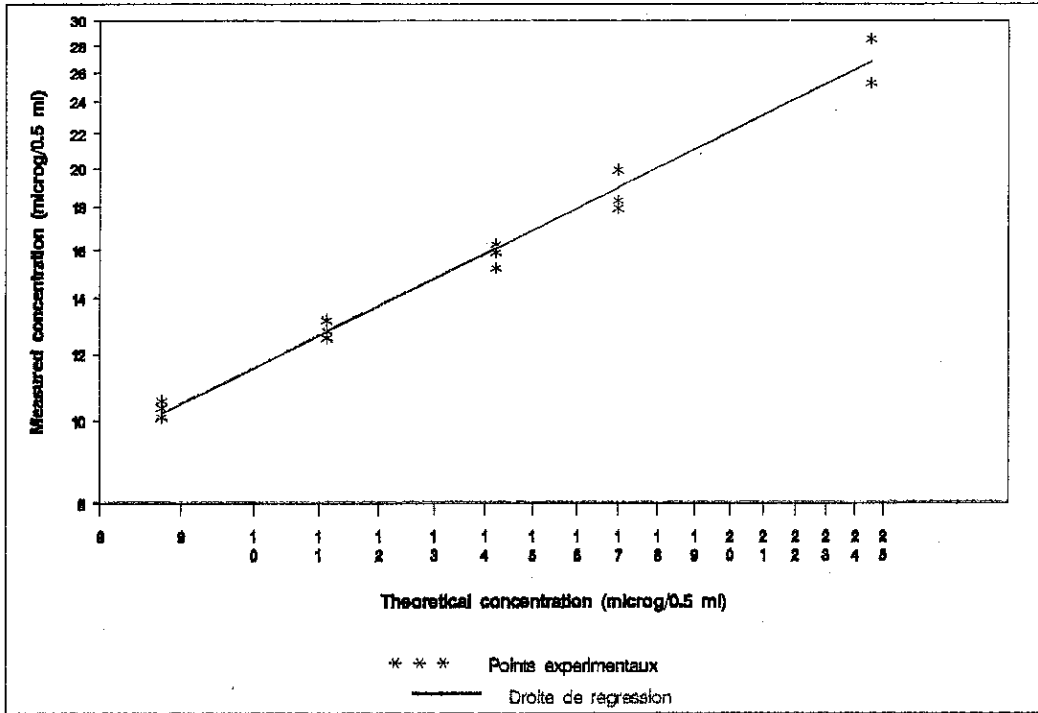
ecuación de la recta de regresión	Coefficiente de correlación lineal	Rango de linealidad (µg/0,5 mL)
$Y = (0,127 \pm 0,079) + (0,936 \pm 0,068) \cdot X$	$r = 0,9928$ con 13 grados de libertad	[8,74-24,57]
X = concentración teórica (log(µg/0,5 mL)) Y = concentración medida (log(µg/0,5 mL))		

ROXANA MONTEMILONE  
 DIRECTORA TÉCNICA  
 APODERADA  
 SANOFI PASTEUR S. A.





Figura 6: Gráfico de linealidad, cepa B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria)



3.2.2.3.3.4 Resultados de linealidad, cepa B/Massachusetts/2/2012 (linaje Yamagata)

Los resultados detallados del estudio de linealidad se presentan en la Tabla 47.

ROXANA MONTEMILONE  
DIRECTORA TÉCNICA  
APODERADA  
SANOFI PASTEUR S.A.





Tabla 47: Linealidad: Contenido de antígeno HA, cepa B/linaje Yamagata (µg/0,5mL) referencia bivalente

Nivel	Cantidades de vacuna (mL)	Diluyente (PBS)	Cantidad de solución adicionada a 176,388 µg/mL (mL)	Contenido teórico de antígeno HA (µg/0,5mL) *	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
1	9	7,5	0	9,5454545455	9,40	10,95	9,71
2	9	4	0	12,115384615	11,58	13,95	12,79
3	9	1,25	0	15,365853659	13,33	16,37	16,08
4	10	0	0	17,5	16,79	19,05	17,89
5	10	0	1,1	22,96872585	20,13	24,14	23,87

\* Las concentraciones teóricas de antígeno HA se calculan a partir del valor objetivo de formulación: El valor objetivo de formulación es igual a 17,5 µg/0,5mL. Entonces, las concentraciones teóricas en µg/0,5 mL son:  
 Nivel 1:  $((2 * 17,5 * 9)/(9 + 7,5))/2 = 9,5454545455 \text{ µg/0,5mL}$   
 Nivel 2:  $((2 * 17,5 * 9)/(9 + 4))/2 = 12,115384615 \text{ µg/0,5mL}$   
 Nivel 3:  $((2 * 17,5 * 9)/(9 + 1,25))/2 = 15,365853659 \text{ µg/0,5mL}$   
 Nivel 4: 17,5 µg/0,5mL (valor objetivo de formulación)  
 Nivel 5:  $((2 * 17,5 * 10 + 145,369 * 1,1)/(10 + 1,1))/2 = 22,96872585 \text{ µg/0,5mL}$

Se calcularon los parámetros de la linealidad:

$$P_{\text{linealidad}} < 0,0001$$

$$P_{\text{desviación de la linealidad}} = 0,93$$

La ecuación de la recta de regresión se presenta en la Tabla 48.

El gráfico de linealidad se presenta en la Figura 7.

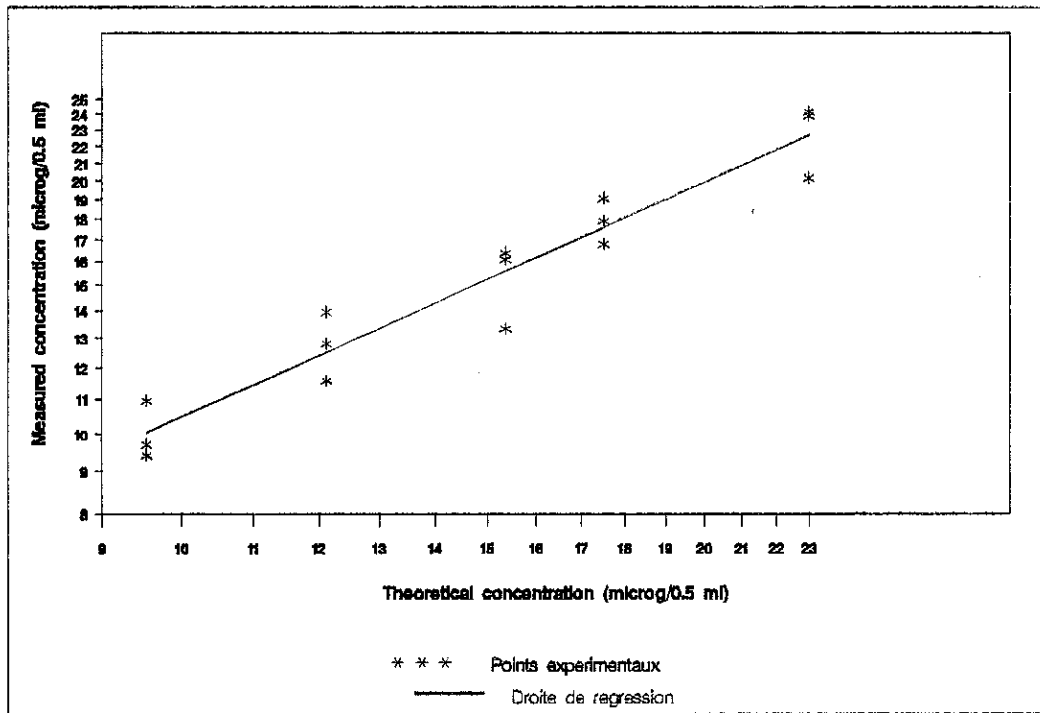
Tabla 48: Linealidad: ecuación de la recta de regresión

ecuación de la recta de regresión	Coefficiente de correlación lineal	Rango de linealidad (µg/0,5 mL)
$Y = (0,094 \pm 0,180) + (0,926 \pm 0,153) \cdot X$	$r = 0,9642$ con 13 grados de libertad	[9,55-22,97]
X = concentración teórica (log(µg/0,5 mL)) Y = concentración medida (log(µg/0,5 mL))		





Figura 7: Gráfico de linealidad, cepa B/Massachusetts/2/2012 (linaje Yamagata)



### 3.2.2.3.3.5 Conclusión

La linealidad es satisfactoria.

### 3.2.2.3.4 Exactitud

La exactitud se evalúa a partir del resultado obtenido para el estudio de la linealidad con los niveles de dilución y adición: la concentración medida se divide entre la concentración teórica.

La exactitud se prueba mediante los siguientes pasos, aplicados a los datos generados en las pruebas.

- La recuperación porcentual promedio se calcula para cada nivel de contenido teórico de antígeno HA y para cada grupo.
- Se verifica la homogeneidad de las varianzas intraniveles mediante la prueba de Cochran.
- Una vez obtenida la homogeneidad, la no significancia de las diferencias entre los niveles de contenido teórico de antígeno HA se demuestra mediante un análisis de varianzas.
- Una vez demostrada la igualdad de las medias interniveles, la recuperación porcentual promedio se calcula con los límites de confianza del 95 % (en caso contrario se calcula la recuperación porcentual promedio por nivel de concentración).

ROXANA MONTEMLONE  
DIRECTORA TÉCNICA  
APODERADA  
SANOFI PASTEUR S.A.





Los resultados detallados del estudio de exactitud de las cuatro cepas estudiadas se presentan en la continuación.

**3.2.2.3.4.1 Resultados de exactitud, cepa A/California/7/2009 (NYMC X-179A) (H1N1)**

Las recuperaciones calculadas entre el contenido medido de antígeno HA y el contenido teórico de antígeno HA se presentan en la Tabla 49.

**Tabla 49: Recuperación porcentual, cepa A/H1N1**

Contenido de antígeno HA (µg/0,5mL)	Recuperación porcentual (%)		
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
9,5806451613	108,03	99,58	102,29
12,913043478	103,07	98,12	98,58
14,142857143	101,89	100,76	106,70
16,5	107,09	107,52	100,73
25,716916137	106,31	106,19	102,11

Según el análisis estadístico para cada nivel de concentración, se calculó la recuperación porcentual promedio y se presenta en la Tabla 50.

**Tabla 50: Recuperación porcentual promedio, cepa A/H1N1**

Recuperación media	Límite de confianza del 95 %
103,3 %	[101,4 %-105,2 %]

Estos resultados cumplen con los criterios de aceptación de la validación, es decir, la recuperación porcentual promedio calculada para los niveles teóricos de concentración se encuentra entre el 80 % y el 120 %.

**3.2.2.3.4.2 Resultados de exactitud, cepa A/Texas/50/2012 (NYMC X-223A) (H3N2)**

Las recuperaciones calculadas entre el contenido medido de antígeno HA y el contenido teórico de antígeno HA se presentan en la Tabla 51.

**Tabla 51: Recuperación porcentual, cepa A/H3N2**

Contenido de antígeno HA (µg/0,5mL)	Recuperación porcentual (%)		
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
8,2285714286	126,15	125,05	117,76
10,666666667	119,63	120,38	115,03
13,395348837	126,84	114,52	114,82

ROXANA MONTEMILONE  
 DIRECTORA TÉCNICA  
 APODERADA  
 SANOFI PASTEUR S. A.





16	118,25	114,13	113,63
23,154381293	113,80	111,17	107,24

Según el análisis estadístico para cada nivel de concentración, se calculó la recuperación porcentual promedio y se presenta en la Tabla 52.

**Tabla 52: Recuperación porcentual promedio, cepa A/H3N2**

Recuperación media	Límite de confianza del 95 %
117,2%	[114,1 %-120,3 %]

Estos resultados cumplen con los criterios de aceptación de la validación, es decir, la recuperación porcentual promedio calculada para los niveles teóricos de concentración se encuentra entre el 80 % y el 120 %.

**3.2.2.3.4.3 Resultados de exactitud, cepa B/Brisbane/60/2008 (B/linaje Victoria)**

Las recuperaciones calculadas entre el contenido medido de antígeno HA y el contenido teórico de antígeno HA se presentan en la Tabla 53.

**Tabla 53: Recuperación porcentual, cepa B/linaje Victoria, referencia bivalente**

Contenido de antígeno HA (µg/0,5mL)	Recuperación porcentual (%)		
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
8,7428571429	120,90	115,52	118,73
11,127272727	118,36	112,79	114,94
14,23235814	111,79	114,17	107,01
17	117,12	107,76	105,53
24,574732061	116,01	116,09	102,75

Según el análisis estadístico para cada nivel de concentración, se calculó la recuperación porcentual promedio y se presenta en la Tabla 54.

**Tabla 54: Recuperación porcentual promedio, cepa B/linaje Victoria**

Recuperación media	Límite de confianza del 95 %
113,3%	[110,4 %-116,2 %]

Estos resultados cumplen con los criterios de aceptación de la validación, es decir, la recuperación porcentual promedio calculada para los niveles teóricos de concentración se encuentra entre el 80 % y el 120 %.

ROXANA MONTEMILONE  
 DIRECTORA TÉCNICA  
 APODERADA  
 SANOFI PASTEUR S.A.





**3.2.2.3.4.4 Resultados de exactitud, cepa B/Massachusetts/2/2012 (linaje Yamagata)**

Las recuperaciones calculadas entre el contenido medido de antígeno HA y el contenido teórico de antígeno HA se presentan en la Tabla 55.





Tabla 55: Recuperación porcentual, cepa B/linaje Yamagata, referencia bivalente

Contenido de antígeno HA ( $\mu\text{g}/0,5\text{mL}$ )	Recuperación porcentual (%)		
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
9,5454545455	98,48	114,71	101,72
12,115384615	95,58	115,14	105,57
15,365853659	86,75	106,53	104,65
17,5	95,94	108,86	102,23
22,96872585	87,64	105,10	103,92

Según el análisis estadístico para cada nivel de concentración, se calculó la recuperación porcentual promedio y se presenta en la Tabla 56.

Tabla 56: Recuperación porcentual promedio, cepa B/linaje Yamagata

Recuperación media	Límite de confianza del 95 %
102,2%	[97,6 %-106,8 %]

Estos resultados cumplen con los criterios de aceptación de la validación, es decir, la recuperación porcentual promedio calculada para los niveles teóricos de concentración se encuentra entre el 80 % y el 120 %.

#### 3.2.2.3.4.5 Conclusión

La exactitud es satisfactoria.





### 3.2.2.4 Conclusión

El método es específico, preciso, lineal y exacto para las cepas A/California/7/2009 (NYMC X-179A) (H1N1), A/Texas/50/2012 (NYMC X-223A) (H3N2), B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria) y B/Massachusetts/2/2012 (linaje Yamagata). El método de SRID es válido para cuantificar el antígeno HA en el producto final a granel (PFAG) y en el producto llenado (FP) de la QIV para las cepas A/California/7/2009 (NYMC X-179A) (H1N1), A/Texas/50/2012 (NYMC X-223A) (H3N2), B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria) y B/Massachusetts/2/2012 (linaje Yamagata).

### 3.2.3 Estudios adicionales que respaldan el uso de SRID bivalente para las cepas B

#### 3.2.3.1 Comparación de la exactitud

Durante la validación se ha determinado la exactitud del contenido de antígeno HA mediante el método de SRID bivalente contra el SRID clásico para las distintas combinaciones de cepas B. La comparación de los resultados de exactitud de ambos métodos se presenta en la tabla siguiente. Con el método de SRID bivalente se obtienen resultados de contenido de antígeno HA más próximos al contenido previsto de antígeno HA en comparación con el método clásico de SRID. En general, estos datos respaldan la mejora que ofrece el método de SRID bivalente.





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

Antígeno	Exactitud con el método de SRID clásico	Exactitud con el método de SRID bivalente
B/Florida/4/2006 (linaje Yamagata)	del 110 % al 120 % (con el NIBSC 08/140)	del 97 % al 106 % (con TGA 2011/89B y NIBSC 08/140)
B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria)	del 111 % al 120 % (con TGA 2011/89B)	del 94% al 104% (con TGA 2011/89B y NIBSC 08/140)
B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria)	del 117% al 122% (con TGA 2011/89B)	del 106% al 112% (con TGA 2011/89B y NIBSC 13/134)
B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria)	del 119% al 127% (con TGA 2014/101B)	del 108% al 112% (con TGA 2014/101B y NIBSC 13/134)
B/Massachusetts/2/2012 (linaje Yamagata)	del 91% al 100% (con el NIBSC 13/134)	del 87% al 96% (con TGA 2011/89B y NIBSC 13/134)
		del 82% al 91% (con TGA 2014/101B y NIBSC 13/134)

### 3.2.3.2 Acumulación de conocimientos para el método de SRID bivalente

Para mejorar nuestro conocimiento sobre el método de SRID bivalente, se han realizado 2 estudios diferentes: un estudio de agregado y un estudio de degradación, que se presentan respectivamente en las secciones 3.2.3.2.1 y 3.2.3.2.2.

El objetivo de estos estudios era demostrar la capacidad del método de SRID para detectar la degradación diferencial de una cepa B sobre la otra, utilizando el método de SRID clásico y el bivalente.

#### 3.2.3.2.1 Estudio de agregado

En primer lugar, se realizó un estudio de agregado para verificar la sensibilidad de las mediciones y para investigar los límites de los métodos de SRID a través de la variación del contenido de una cepa mientras se mantenía el contenido de la otra. El estudio se realizó con distintas combinaciones de cepas B, que se sabe que presentan diferentes niveles de reactividad cruzada, como las cepas B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria), B/Florida/4/2006 (linaje Yamagata),





B/Massachusetts/2/2012 (linaje Yamagata) y B/Hubei/Wujiagang/158/2009 (linaje Yamagata). Las muestras de vacuna antigripal tetravalente se prepararon mezclando la vacuna trivalente, que contenía una cepa B, con otros monovalentes específicos de la cepa B en diferentes concentraciones que iban de 10 a 27  $\mu\text{g/dosis}$ . Se definieron tres concentraciones de antígeno HA con base en el valor objetivo de las cepas B y con valores inferior y superior que acotan el valor objetivo. El valor inferior es aproximadamente 10-11  $\mu\text{g/dosis}$ , el valor medio es aproximadamente el valor objetivo de la formulación de las cepas B, que es de 18,5  $\mu\text{g/dosis}$ , y el valor superior es aproximadamente 26-27  $\mu\text{g/dosis}$ . Los valores más bajos analizados se aproximan al límite inferior de confianza de la especificación del contenido de antígeno HA (12  $\mu\text{g/dosis}$ ).

El contenido de antígeno HA en cada muestra se determinó utilizando ambos métodos de SRID con tres mediciones para cada resultado.

En los estudios de agregado se estudiaron las siguientes tres combinaciones de cepas B.

- B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria) / B/Florida/4/2006 (linaje Yamagata);
- B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria) / B/Massachusetts/2/2012 (linaje Yamagata);
- B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria) / B/Hubei/Wujiagang/158/2009 (linaje Yamagata).

Para las tres combinaciones, cada cepa se estudió a través de la variación del contenido de una cepa mientras se mantenía el contenido de la otra.

#### 3.2.3.2.2 Estudio de degradación

En segundo lugar, se realizaron estudios forzados de degradación con las mismas combinaciones de cepas B, con el fin de demostrar que puede detectarse una reducción del contenido de antígeno HA de una cepa B en la QIV en presencia de la otra cepa B no degradada, utilizando ambos métodos de SRID. El estudio se realizó con diferentes niveles de degradación de una cepa B, que variaban entre 0 % y 100 %.

Con este fin, se prepararon muestras de la formulación tetravalente mezclando graneles monovalentes con uno de los monovalentes de la cepa B degradado por tratamiento térmico para reducir su contenido de antígeno HA. Se prepararon cinco niveles de degradación (es decir, 0 %, 25 %, 50 %, 75 % y 100 %) para uno de los monovalentes específicos de la cepa B, mezclando el monovalente intacto (es decir, degradado en un 0 %) y el monovalente totalmente degradado (es decir, degradado en un 100 %). Las combinaciones resultantes se mezclaron además con la formulación trivalente, que contiene la concentración fija de la otra cepa B, para preparar las formulaciones tetravalentes.

El contenido de antígeno HA en cada muestra se determinó utilizando el método clásico y el método bivalente de SRID con tres mediciones para cada resultado.

Las condiciones experimentales de los análisis, los resultados y el análisis se detallan a continuación.





3.2.3.2.3 Resultados de los estudios

3.2.3.2.3.1 Primera combinación de cepas B “B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria) vs. B/Florida/4/2006 (linaje Yamagata)”

Los resultados de la combinación B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria) vs. B/Florida/4/2006 (linaje Yamagata) se detallan a continuación.

3.2.3.2.3.1.1 Estudio de agregado

Para la combinación cepa B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria) vs. cepa B/Florida/4/2006 (linaje Yamagata), cada cepa B se estudió de manera independiente con el contenido variable de una cepa B mientras se mantenía el contenido de la otra cepa B. En cada experimento, el ajuste de las concentraciones de la cepa B se realizó a través de agregados, utilizando los resultados del contenido de antígeno HA de los monovalentes y la vacuna trivalente que contenía la otra cepa B con la concentración fija.

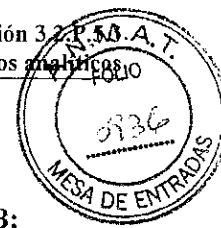
El plan experimental se indica a continuación en la Tabla 58. Los resultados del contenido de antígeno HA se presentan a continuación en la Tabla 59 y en la Tabla 60, para ambos experimentos de agregado.

Además, se calcularon los resultados de recuperación para ambos métodos y cepas B con base en la concentración esperada de antígeno de HA (vea la Figura 8 y la Figura 9). Se recalculó la concentración exacta de la QIV reconstituida para cada cepa después de las pruebas de monovalentes y corresponde a la concentración esperada.

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

Número de experimento	Cepa B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria)	Cepa B/Florida/4/2006 (linaje Yamagata)	Prueba de contenido de antígeno HA realizada	Método utilizado
1	Contenido variable mediante agregado: 10 µg/dosis, 18 µg/dosis y 24 µg/dosis	Contenido fijo: 15 µg/dosis	Contenido de antígeno HA de la cepa B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria) Contenido de antígeno HA de la cepa B/Florida/4/2006 (linaje Yamagata)	Métodos clásico y bivalente de SRID
2	Contenido fijo: 13 µg/dosis	Contenido variable mediante agregado: 11 µg/dosis, 20 µg/dosis y 27 µg/dosis	Contenido de antígeno HA de la cepa B/Florida/4/2006 (linaje Yamagata) Contenido de antígeno HA de la cepa B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria)	Métodos clásico y bivalente de SRID

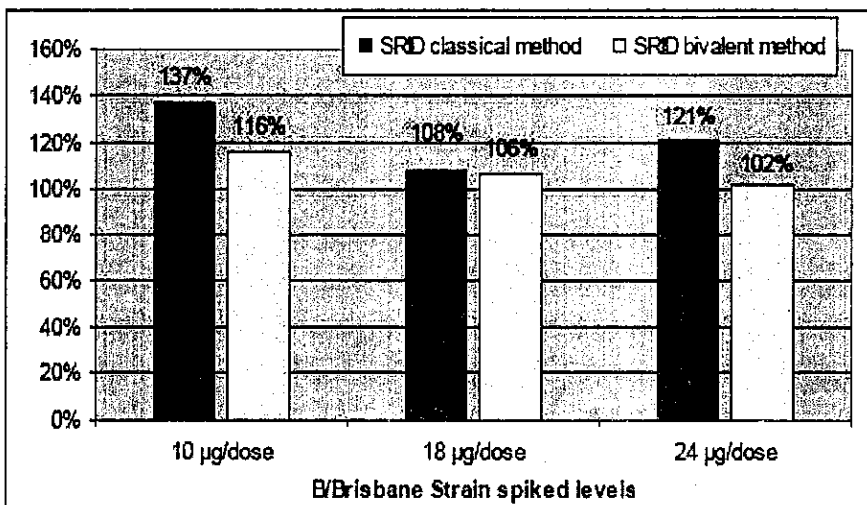




**Tabla 59: Resultados del contenido de antígeno HA para la combinación de cepas B; experimento 1 [contenido variable de B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria)]**

Contenido previsto de antígeno HA de B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria)	Contenido previsto de antígeno HA de B/Florida/4/2006 (linaje Yamagata)	Método de SRID clásico		Método de SRID bivalente	
		Contenido de antígeno HA, B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria) (recuperación entre paréntesis)	Contenido de antígeno HA, B/Florida/4/2006 (linaje Yamagata) (recuperación entre paréntesis)	Contenido de antígeno HA, B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria) (recuperación entre paréntesis)	Contenido de antígeno HA, B/Florida/4/2006 (linaje Yamagata) (recuperación entre paréntesis)
10 µg/dosis	15 µg/dosis	13 µg/dosis (137%)	17 µg/dosis (114%)	11 µg/dosis (116%)	16 µg/dosis (107%)
18 µg/dosis	15 µg/dosis	20 µg/dosis (108%)	17 µg/dosis (117%)	19 µg/dosis (106%)	16 µg/dosis (107%)
24 µg/dosis	15 µg/dosis	29 µg/dosis (121%)	17 µg/dosis (114%)	25 µg/dosis (102%)	15 µg/dosis (100%)

**Figura 8: Resultados de recuperación (%) para la cepa B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria) en el estudio de agregado, experimento 1**



ROXANA MONTEMILONE  
 DIRECTORA TÉCNICA  
 APODERADA  
 SANOFI PASTEUR S.A.



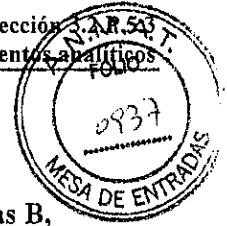
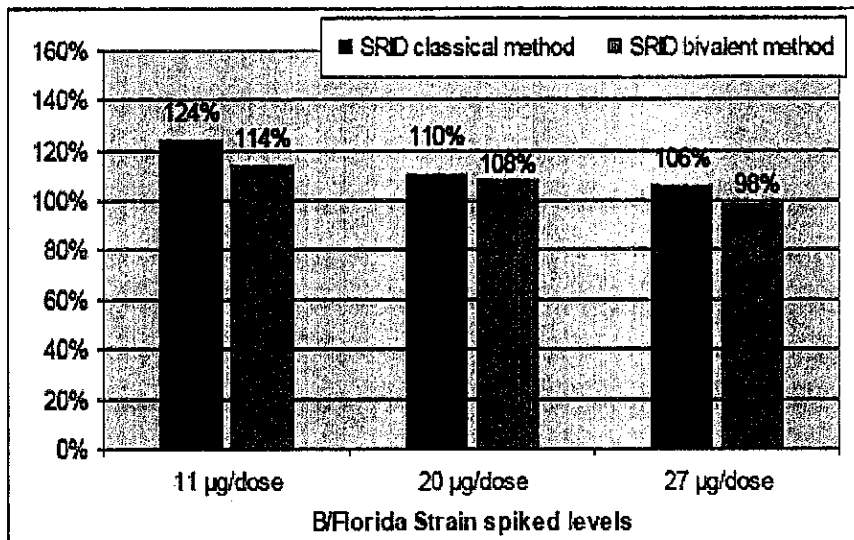


Tabla 60: Resultados del contenido de antígeno HA para la combinación de cepas B, experimento 2 [contenido variable de B/Florida/4/2006 (linaje Yamagata)]

Contenido previsto de antígeno HA de B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria)	Contenido previsto de antígeno HA de B/Florida/4/2006 (linaje Yamagata)	Método de SRID clásico		Método de SRID bivalente	
		Contenido de antígeno HA, B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria) (recuperación entre paréntesis)	Contenido de antígeno HA, B/Florida/4/2006 (linaje Yamagata) (recuperación entre paréntesis)	Contenido de antígeno HA, B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria) (recuperación entre paréntesis)	Contenido de antígeno HA, B/Florida (recuperación entre paréntesis)
13 µg/dosis	11 µg/dosis	17 µg/dosis (131%)	13 µg/dosis (124%)	15 µg/dosis (115%)	12 µg/dosis (114%)
13 µg/dosis	20 µg/dosis	18 µg/dosis (135%)	22 µg/dosis (110%)	15 µg/dosis (115%)	21 µg/dosis (108%)
13 µg/dosis	27 µg/dosis	17 µg/dosis (131%)	28 µg/dosis (106%)	15 µg/dosis (112%)	26 µg/dosis (98%)

Figura 9: Resultados de recuperación (%) para la cepa B/Florida/4/2006 (linaje Yamagata) en el estudio de agregado, experimento 2



Los resultados presentados en la Tabla 59 y en la Tabla 60 demuestran que tanto el método clásico como el bivalente pueden detectar niveles decrecientes de la cepa B específica independientemente del nivel de la cepa B no específica.

Además, para los tres niveles de agregado de una cepa B y para las diferentes cepas B, los resultados del contenido de antígeno HA obtenidos con el método bivalente son siempre más bajos en comparación con los resultados obtenidos por el método clásico, y más próximos al valor

ROXANA MONTEMLONE  
 DIRECTORA TÉCNICA  
 APODERADA  
 SANOFI PASTEUR S.A.





objetivo de formulación. La recuperación calculada para cada nivel de agregado es aproximadamente el 100 % con el método de SRID bivalente (vea la Figura 8 y la Figura 9).

Para los niveles de agregado medio (es decir, 18-20  $\mu\text{g}/\text{dosis}$ ) y superior (es decir, 24-27  $\mu\text{g}/\text{dosis}$ ), los resultados de contenido de antígeno HA y la recuperación calculada concuerdan con los valores previstos cuando se utiliza el método de SRID bivalente para la determinación del contenido de antígeno HA. Para las concentraciones más bajas de agregado (es decir, de aproximadamente 10  $\mu\text{g}/\text{dosis}$ ), la recuperación porcentual promedio calculada por ambos métodos en ambos experimentos es superior al 110 %. Esta sobrestimación con el contenido más bajo de antígeno HA puede deberse a la variabilidad del método bivalente de SRID y se ha observado solo con esta combinación de la cepa B (vea los resultados de otras combinaciones de las cepas B a continuación).

El estudio de agregado se llevó a cabo para verificar la sensibilidad e investigar los límites de los métodos de SRID. Este estudio demostró claramente que ambos métodos de SRID detectan concentraciones diferentes de una cepa B específica independientemente de la concentración de la cepa B no específica. El método bivalente resulta particularmente adecuado para la determinación exacta y precisa de la potencia del antígeno HA en la formulación tetravalente de la vacuna antigripal, ya que el método minimiza el efecto de la reactividad cruzada que da lugar a la sobrestimación con todos los niveles de agregado de cepas B específicas.

#### 3.2.3.2.3.1.2 Estudio de degradación

Para obtener diferentes niveles de cepas B degradadas, se tratan los monovalentes de las cepas B hasta reducir por completo el contenido de antígeno HA. La degradación de las cepas B se evaluó a 56 °C durante varios días. Sin embargo, debido a la gran cantidad de tiempo que se necesita para obtener cepas B totalmente degradadas (no hubo disminución del contenido de antígeno HA después de 6 días), la degradación de las cepas B se realizó a una temperatura más alta, mediante procesamiento en autoclave durante 20 a 40 minutos a una temperatura de entre 121 °C y 123,5 °C. Después del tratamiento, el contenido de antígeno HA se redujo a 0 (por debajo del límite de detección). Luego, el monovalente específico de cepas B degradadas por tratamiento térmico se mezcló con el monovalente específico de cepas B intactas para obtener diferentes combinaciones de cepa B intacta y degradada. Estas combinaciones se mezclan además con la formulación trivalente que contiene la concentración fija de la otra cepa B.

Cada vacuna de la formulación tetravalente que contiene diferentes niveles de una cepa B degradada mientras se mantiene fija la concentración de la otra, se analiza para determinar el contenido de antígeno HA con ambos métodos de SRID, como se indica en el plan experimental detallado en la Tabla 61. Los resultados del contenido de antígeno HA se presentan a continuación en la Tabla 62 y en la Tabla 63, para ambos experimentos de degradación. Además, se calcularon las recuperaciones para ambos métodos y cepas B con base en la concentración prevista de antígeno HA (vea la Figura 11 y la Figura 13).





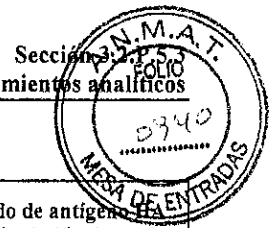
**Tabla 61: Plan experimental para la combinación cepa B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria) / cepa B/Florida/4/2006 (linaje Yamagata), estudios de degradación**

Número de experimento	B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria)	B/Florida/4/2006 (linaje Yamagata)	Prueba de contenido de antígeno HA realizada y método utilizado
3	Niveles variables de degradación 0 % degradado (es decir, 19 µg/dosis) 25% degradado (es decir, 14 µg/dosis) 50% degradado (es decir, 9 µg/dosis) 75% degradado (es decir, 5 µg/dosis) 100% degradado (es decir, 0 µg/dosis)	Contenido fijo: 19 µg/dosis	Contenido de antígeno HA de B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria) mediante los métodos clásico y bivalente de SRID
4	Contenido fijo: 19 µg/dosis	Niveles variables de degradación 0 % degradado (es decir, 19 µg/dosis) 25% degradado (es decir, 14 µg/dosis) 50% degradado (es decir, 9 µg/dosis) 75% degradado (es decir, 5 µg/dosis) 100% degradado (es decir, 0 µg/dosis)	Contenido de antígeno HA de B/Florida/4/2006 (linaje Yamagata) mediante los métodos clásico y bivalente de SRID

**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]**

Nivel de la cepa B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria) degradada	Contenido previsto de antígeno HA de B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria) (después de la degradación)	Contenido de antígeno HA por el método clásico de SRID (recuperación entre paréntesis)	Contenido de antígeno HA por el método bivalente de SRID (recuperación entre paréntesis)
0%	19 µg/dosis	22 µg/dosis (116%)	19 µg/dosis (100%)
25%	14 µg/dosis	17 µg/dosis (119%)	15 µg/dosis (105%)
50%	9 µg/dosis	12 µg/dosis	11 µg/dosis





Nivel de la cepa B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria) degradada	Contenido previsto de antígeno HA de B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria) (después de la degradación)	Contenido de antígeno HA por el método clásico de SRID (recuperación entre paréntesis)	Contenido de antígeno HA por el método bivalente de SRID (recuperación entre paréntesis)
		(124%)	(114%)
75%	5 µg/dosis	7 µg/dosis (141%)	6 µg/dosis (119%)
100%	0 µg/dosis	Inferior al límite de detección (LOD)	Inferior al LOD

ROXANA MONTEMILONE  
DIRECTORA TÉCNICA  
APODERADA  
SANOFI PASTEUR S. A.





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

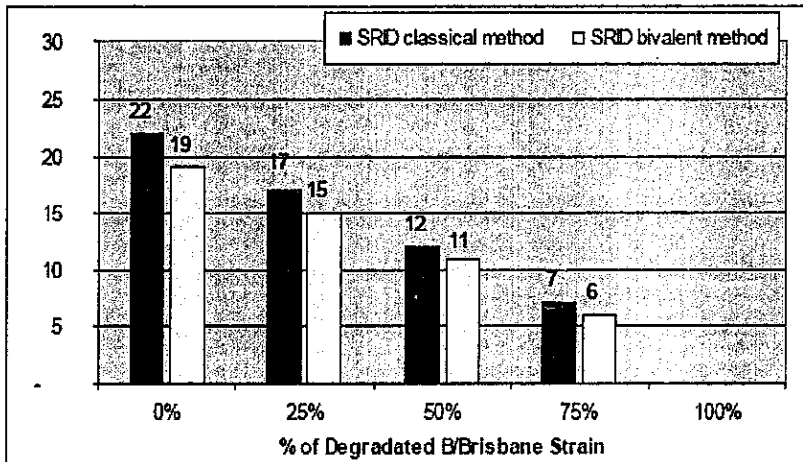
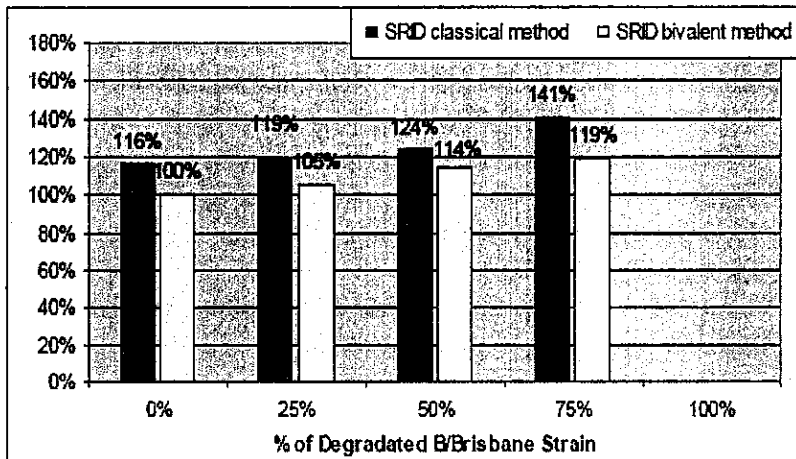
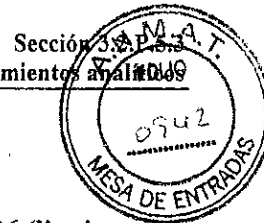


Figura 11: Resultados de recuperación (%) para la cepa B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria) en el estudio de degradación, experimento 3



ROXANA MONTEMILONE  
 DIRECTORA TÉCNICA  
 APODERADA  
 SANOFI PASTEUR S.A.





**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]**

Nivel de la cepa B/Florida/4/2006 (linaje Yamagata) degradada	Contenido previsto de antígeno HA de la cepa B/Florida/4/2006 (linaje Yamagata) (después de la degradación)	Contenido de antígeno HA por el método clásico de SRID (recuperación entre paréntesis)	Contenido de antígeno HA por el método bivalente de SRID (recuperación entre paréntesis)
0%	19 µg/dosis	21 µg/dosis (114%)	19 µg/dosis (100%)
25%	14 µg/dosis	17 µg/dosis (119%)	15 µg/dosis (108%)
50%	9 µg/dosis	12 µg/dosis (130%)	12 µg/dosis (130%)
75%	5 µg/dosis	6 µg/dosis (130%)	6 µg/dosis (130%)
100%	0 µg/dosis	Inferior al LOD	Inferior al LOD





Figura 12: Resultados del contenido de antígeno HA (en  $\mu\text{g}/\text{dosis}$ ) para B/Florida/4/2006 (linaje Yamagata) en el estudio de degradación, experimento 4

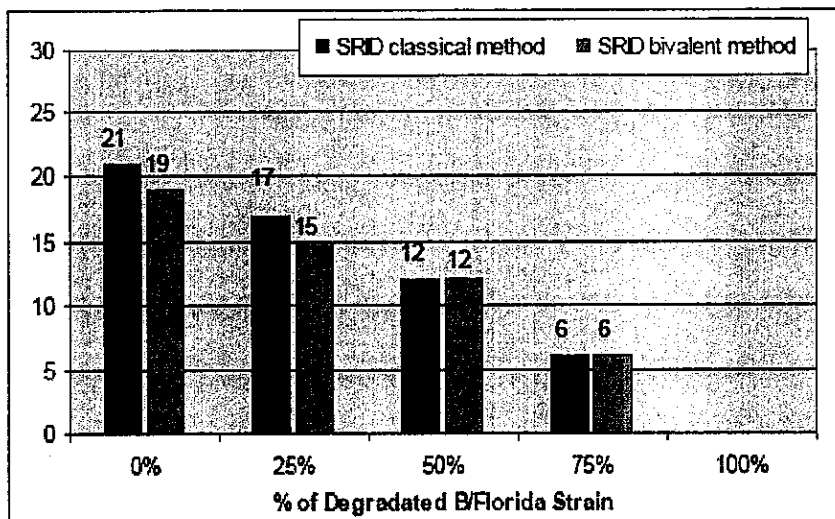
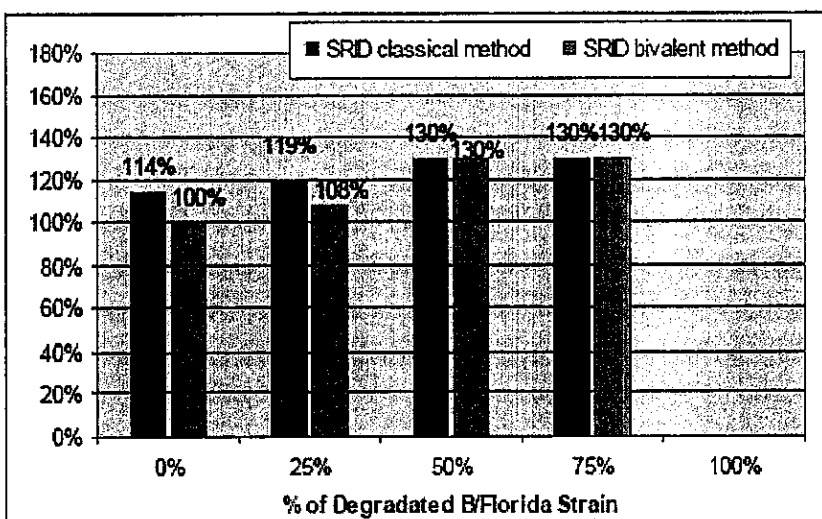


Figura 13: Resultados de recuperación (%) para la cepa B/Florida/4/2006 (linaje Yamagata) en el estudio de degradación, experimento 4



Los resultados presentados en la Tabla 62 y en la Tabla 63 demuestran que tanto el método clásico como el bivalente pueden detectar niveles de degradación diferentes del antígeno HA de la cepa B específica independientemente del nivel de la cepa B no específica. Esto se observa con la cepa B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria) degradada en presencia de un contenido más alto de antígeno HA de la cepa B/Florida/4/2006 (linaje Yamagata) y con la cepa B/Florida/4/2006 (linaje

ROXANA MONTEMILONE  
 DIRECTORA TÉCNICA  
 APODERADA  
 SANOFI PASTEUR S.A.





Yamagata) degradada en presencia de un contenido más alto de antígeno HA de la cepa B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria).

Además, para los tres niveles de degradación de una cepa B y para las diferentes cepas B, los resultados del contenido de antígeno HA obtenidos con el método bivalente son siempre más bajos en comparación con los resultados obtenidos por el método clásico, y más próximos al valor objetivo de formulación. La recuperación calculada para cada nivel de agregado es de aproximadamente el 100 % con el método de SRID bivalente (vea la Figura 11 y la Figura 13).

Para los niveles de degradación de 0 % y 25 %, los resultados del contenido de antígeno HA y la recuperación calculada coinciden con los valores previstos cuando se utiliza el método de SRID bivalente para la determinación del contenido de antígeno HA. Para los contenidos más bajos de las cepas B (niveles de degradación del 50 % al 100 %) que corresponden a las concentraciones de 6 y 12 µg/dosis, la recuperación porcentual promedio calculada por ambos métodos en ambos experimentos es superior al 110 %. Esta sobrestimación puede deberse a la variabilidad del método de SRID bivalente.

En cualquier caso, los estudios de degradación forzada han demostrado que utilizando el método de SRID bivalente se detecta una reducción del contenido de antígeno HA de cada cepa B en la QIV en presencia de la otra cepa B no degradada.

### 3.2.3.2.3.2 Segunda combinación de cepas B "B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria) vs. B/Massachusetts/2/2012 (linaje Yamagata)"

Los resultados y el análisis de la combinación de la cepa B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria) vs. la cepa B/Massachusetts/2/2012 (linaje Yamagata) se resumen a continuación.

El principio del análisis y las condiciones operativas son idénticos a los utilizados para la primera combinación de cepas B.

#### 3.2.3.2.3.2.1 Estudio de agregado

El plan experimental se indica a continuación en la Tabla 64. Con base en los resultados de contenido de antígeno HA, se calculó la recuperación del antígeno HA para ambos métodos y cepas B, con base en la concentración esperada de antígeno HA. Los resultados se presentan a continuación en la Figura 14 y en la Figura 15, para ambos experimentos de agregado.





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

Número de experimento	B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria)	B/Massachusetts/2/2012 (linaje Yamagata)	Prueba de contenido de antígeno HA realizada	Método utilizado
5	Contenido variable mediante agregado: 10 µg/dosis, 19 µg/dosis y 26 µg/dosis	Contenido fijo: 14 µg/dosis	Contenido de antígeno HA de la cepa B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria) Contenido de antígeno HA de la cepa B/Massachusetts/2/2012 (linaje Yamagata)	Métodos clásico y bivalente de SRID
6	Contenido fijo: 12 µg/dosis	Contenido variable mediante agregado: 10 µg/dosis, 19 µg/dosis y 26 µg/dosis	Contenido de antígeno HA de la cepa B/Massachusetts/2/2012 (linaje Yamagata) Contenido de antígeno HA de la cepa B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria)	Métodos clásico y bivalente de SRID





Figura 14: Resultados de recuperación (%) para la cepa B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria) en el estudio de agregado, experimento 5

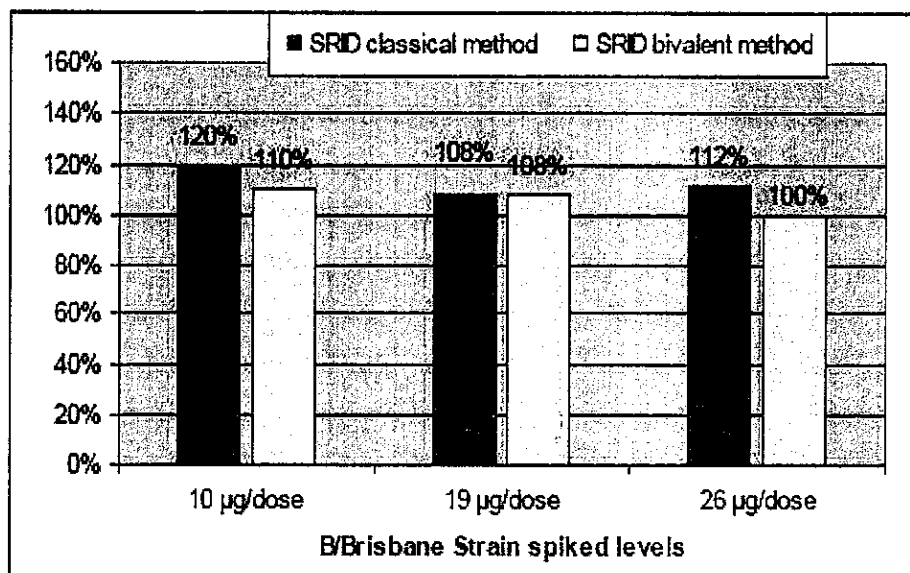
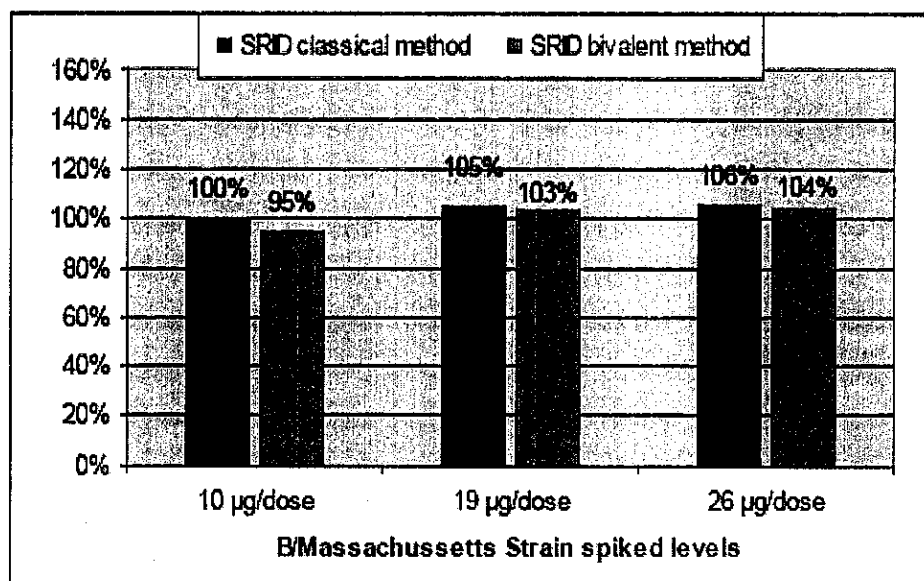


Figura 15: Resultados de recuperación (%) para la cepa B/Massachusetts/2/2012 (linaje Yamagata) en el estudio de agregado, experimento 6



Los resultados presentados en la Figura 14 y en la Figura 15 demuestran que tanto el método clásico como el bivalente pueden detectar niveles decrecientes de la cepa B específica independientemente del nivel de la cepa B no específica.





Además, para los tres niveles de agregado de una cepa B y para las diferentes cepas B, los resultados del contenido de antígeno HA obtenidos con el método bivalente son siempre más bajos en comparación con los resultados obtenidos por el método clásico, y más próximos al valor objetivo de formulación. La recuperación calculada para cada nivel de agregado es más próxima al 100 % con el método de SRID bivalente (vea la Figura 14 y la Figura 15).

Para los niveles de agregado más bajo (es decir, 10 µg/dosis), medio (es decir, 19 µg/dosis) y superior (es decir, 26-27 µg/dosis), los resultados de contenido de antígeno HA y la recuperación calculada son compatibles con los valores previstos cuando se utiliza el método de SRID bivalente para la determinación del contenido de antígeno HA.

El estudio de agregado se llevó a cabo para verificar la sensibilidad e investigar los límites de los métodos de SRID. Este estudio demostró claramente que ambos métodos de SRID detectan concentraciones diferentes de una cepa B específica independientemente de la concentración de la cepa B no específica. El método bivalente resulta particularmente adecuado para la determinación exacta y precisa de la potencia del antígeno HA en la formulación tetravalente de la vacuna antigripal, ya que el método minimiza el efecto de la reactividad cruzada que da lugar a la sobrestimación con todos los niveles de agregado de cepas B específicas.

### 3.2.3.2.2 Estudio de degradación

Cada vacuna de la formulación tetravalente que contiene diferentes niveles de una cepa B degradada mientras se mantiene fija la concentración de la otra, se analiza para determinar el contenido de antígeno HA con ambos métodos de SRID, como se indica en el plan experimental detallado en la Tabla 65.

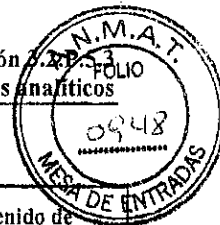
Los resultados del contenido de antígeno HA se presentan a continuación en la Figura 16 y en la Figura 17, para ambos experimentos de degradación. Los resultados de antígeno HA obtenidos para la formulación degradada al 100 % fueron, para todos los análisis, inferiores al LOD. Por lo tanto, no se grafican en la Figura 16 y en la Figura 17.

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

Número de experimento	B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria)	B/Massachusetts/2/2012 (linaje Yamagata)	Prueba de contenido de antígeno HA realizada y método utilizado
7	Niveles variables de degradación 0 % degradado (es decir, 19 µg/dosis) 25% degradado (es decir, 14 µg/dosis) 50% degradado (es decir, 9 µg/dosis) 75% degradado (es decir, 5 µg/dosis) 100% degradado (es decir, 0	Contenido fijo: 19 µg/dosis	Contenido de antígeno HA de B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria) Mediante los métodos clásico y bivalente de SRID

ROXANA MONTEMILONE  
 DIRECTORA TÉCNICA  
 APODERADA  
 SANOFI PASTEUR S.A.





Número de experimento	B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria)	B/Massachusetts/2/2012 (linaje Yamagata)	Prueba de contenido de antígeno HA realizada y método utilizado
	μg/dosis)		
8	Contenido fijo: 19 μg/dosis	Niveles variables de degradación 0 % degradado (es decir, 19 μg/dosis) 25% degradado (es decir, 14 μg/dosis) 50% degradado (es decir, 9 μg/dosis) 75% degradado (es decir, 5 μg/dosis) 100% degradado (es decir, 0 μg/dosis)	Contenido de antígeno HA de la cepa B/Massachusetts/2/2012 (linaje Yamagata) Mediante los métodos clásico y bivalente de SRID

ROXANA MONTEMILONE  
 DIRECTORA TÉCNICA  
 APODERADA  
 SANOFI PASTEUR S. A.





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

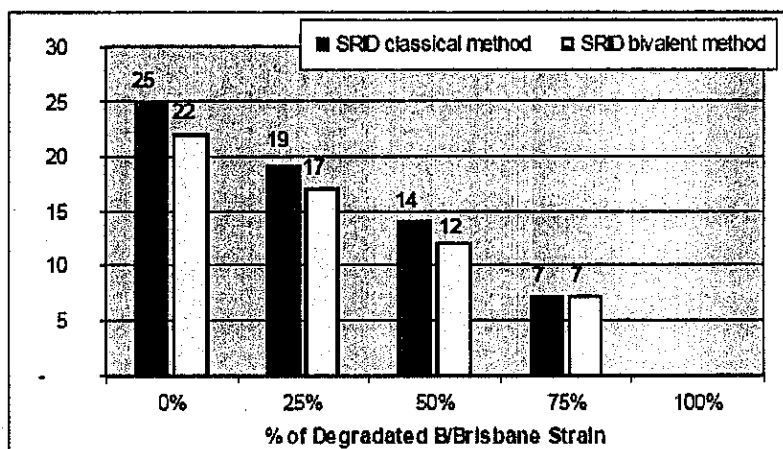
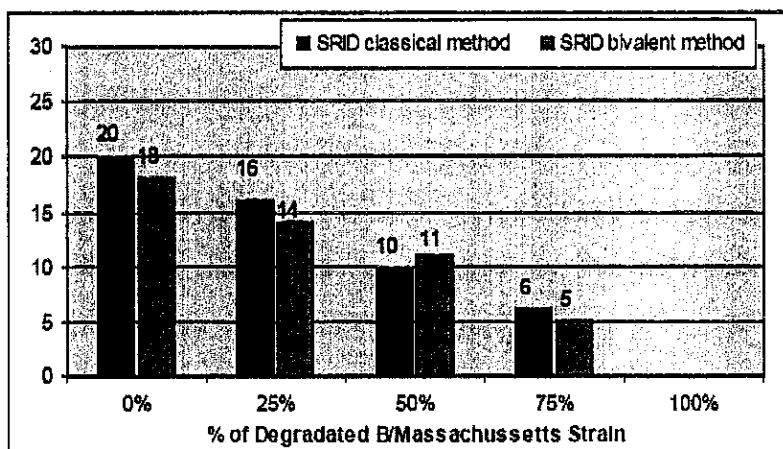


Figura 17: Resultados del contenido de antígeno HA (en µg/dosis) para la cepa B/Massachusetts/2/2012 (linaje Yamagata) en el estudio de degradación, experimento 8

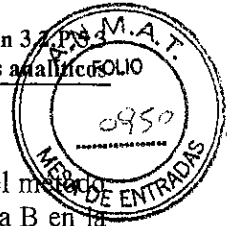


Los resultados presentados en la Figura 16 y en la Figura 17 demuestran que tanto el método clásico como el bivalente pueden detectar niveles de degradación diferentes del antígeno HA de la cepa B específica independientemente del nivel de la cepa B no específica. Esto se observa con la cepa B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria) degradada en presencia de un contenido más alto de antígeno HA de la cepa B/Massachusetts/2/2012 (linaje Yamagata) y con la cepa B/Massachusetts degradada en presencia de un contenido más alto de antígeno HA de la cepa B/Brisbane.

Además, para los tres niveles de degradación de una cepa B y para las diferentes cepas B, los resultados del contenido de antígeno HA obtenidos con el método bivalente son más bajos en comparación con los resultados obtenidos por el método clásico, y más próximos al valor objetivo de formulación.

ROXANA MONTEMILONE  
 DIRECTORA TÉCNICA  
 APODERADA  
 SANOFI PASTEUR S.A.





En cualquier caso, los estudios de degradación forzada han demostrado que utilizando el método de SRID bivalente se detecta una reducción del contenido de antígeno HA de cada cepa B en la QIV en presencia de la otra cepa B no degradada.

### 3.2.3.2.3.3 Tercera combinación de cepas B “B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria) vs. B/Hubei/Wujiagang/158/2009 (linaje Yamagata)”

Los resultados de la combinación B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria) vs. B/Hubei/Wujiagang/158/2009 (linaje Yamagata) se detallan a continuación. El principio del análisis y las condiciones operativas son idénticos a los utilizados para la primera combinación de cepas B.

#### 3.2.3.2.3.3.1 Estudio de agregado

El plan experimental se indica a continuación en la Tabla 66.

Con base en los resultados de contenido de antígeno HA, se calculó la recuperación del antígeno HA para ambos métodos y cepas B, con base en la concentración esperada de antígeno HA. Los resultados se presentan a continuación en la Figura 18 y en la Figura 19, para ambos experimentos de agregado.

**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**

Número de experimento	Cepa B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria)	Cepa B/Hubei/Wujiagang/158/2009 (linaje Yamagata)	Prueba de contenido de antígeno HA realizada	Método utilizado
9	Contenido variable mediante agregado: 11 µg/dosis, 20 µg/dosis y 27 µg/dosis	Fijo: 13 µg/dosis	Contenido de antígeno HA de la cepa B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria) Contenido de antígeno HA de la cepa B/Hubei/Wujiagang/158/2009 (linaje Yamagata)	Métodos clásico y bivalente de SRID
10	Contenido fijo: 14 µg/dosis	Contenido variable mediante agregado: 11 µg/dosis, 19 µg/dosis y 26 µg/dosis	Contenido de antígeno HA de la cepa B/Hubei/Wujiagang/158/2009 (linaje Yamagata) Contenido de antígeno HA de la cepa B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria)	Métodos clásico y bivalente de SRID





Figura 18: Resultados de recuperación (%) para la cepa B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria) en el estudio de agregado, experimento 9

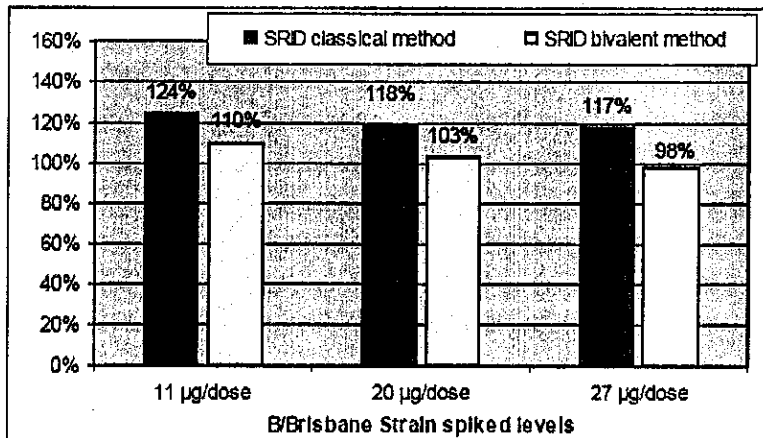
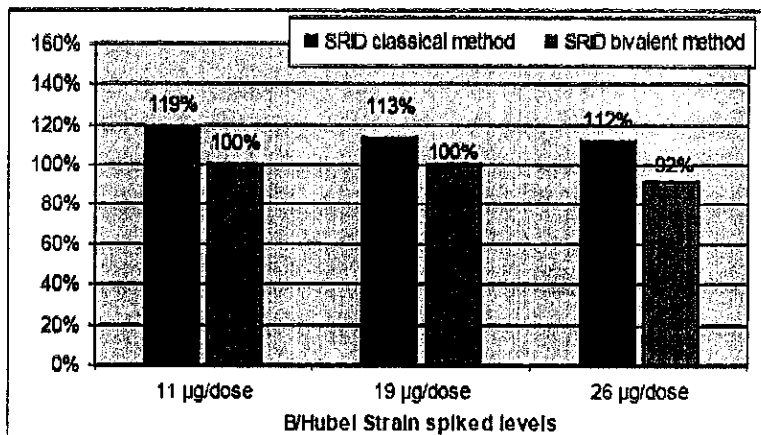


Figura 19: Resultados de recuperación (%) para la cepa B/Hubei/Wujiagang/158/2009 (linaje Yamagata) en el estudio de agregado, experimento 10



Los resultados presentados en la Figura 18 y en la Figura 19 demuestran que tanto el método clásico como el bivalente pueden detectar niveles decrecientes de la cepa B específica independientemente del nivel de la cepa B no específica.

Además, para los tres niveles de agregado de una cepa B y para las diferentes cepas B, los resultados del contenido de antígeno HA obtenidos con el método bivalente son siempre más bajos en comparación con los resultados obtenidos por el método clásico, y más próximos al valor objetivo de formulación. La recuperación calculada para cada nivel de agregado es de aproximadamente el 100 % con el método de SRID bivalente (vea la Figura 18 y la Figura 19).

Para los niveles de agregado más bajo (*es decir*, 11 µg/dosis), medio (*es decir*, 19-20 µg/dosis) y superior (*es decir*, 26-27 µg/dosis), los resultados de contenido de antígeno HA y la recuperación





calculada son compatibles con los valores previstos cuando se utiliza el método de SRID bivalente para la determinación del contenido de antígeno HA.

El estudio de agregado se llevó a cabo para verificar la sensibilidad e investigar los límites de los métodos de SRID. Este estudio demostró claramente que ambos métodos de SRID detectan concentraciones diferentes de una cepa B específica independientemente de la concentración de la cepa B no específica. El método bivalente resulta particularmente adecuado para la determinación exacta y precisa de la potencia del antígeno HA en la formulación tetravalente de la vacuna antigripal, ya que el método minimiza el efecto de la reactividad cruzada que da lugar a la sobrestimación con todos los niveles de agregado de cepas B específicas.

### 3.2.3.2.3.3.2 Estudio de degradación

Cada vacuna de la formulación tetravalente que contiene diferentes niveles de una cepa B degradada mientras se mantiene fija la concentración de la otra, se analiza para determinar el contenido de antígeno HA con ambos métodos de SRID, como se indica en el plan experimental detallado en la Tabla 67.

Los resultados del contenido de antígeno HA se presentan a continuación en la Figura 20 y en la Figura 21, para ambos experimentos de degradación. Los resultados de antígeno HA obtenidos para la formulación degradada al 100 % fueron, para todos los análisis, inferiores al límite de detección. Por lo tanto, no se grafican en la Figura 20 y en la Figura 21.

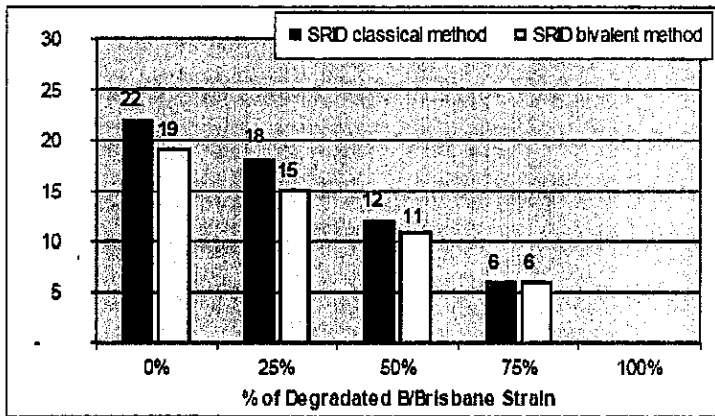
**Tabla 67: Plan experimental para la combinación cepa B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria) / cepa B/Hubei/Wujiagang/158/2009 (linaje Yamagata), estudios de degradación**

Número de experimento	Cepa B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria)	Cepa B/Hubei/Wujiagang/158/2009 (linaje Yamagata)	Prueba de contenido de antígeno HA realizada y método utilizado
11	Niveles variables de degradación 0 % degradado (es decir, 19 µg/dosis) 25% degradado (es decir, 14 µg/dosis) 50% degradado (es decir, 9 µg/dosis) 75% degradado (es decir, 5 µg/dosis) 100% degradado (es decir, 0 µg/dosis)	Contenido fijo: 19 µg/dosis	Contenido de antígeno HA de la cepa B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria) Mediante los métodos clásico y bivalente de SRID
12	Contenido fijo: 19 µg/dosis	Niveles variables de degradación 0 % degradado (es decir, 19 µg/dosis) 25% degradado (es decir, 14 µg/dosis) 50% degradado (es decir, 9 µg/dosis)	Contenido de antígeno HA de la cepa B/Hubei/Wujiagang/158/2009 (linaje Yamagata) Mediante los métodos clásico y bivalente de SRID



Número de experimento	Cepa B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria)	Cepa B/Hubei/Wujiagang/158/2009 (linaje Yamagata)	Prueba de contenido de antígeno HA realizada y método utilizado
		µg/dosis 75% degradado (es decir, 5 µg/dosis) 100% degradado (es decir, 0 µg/dosis)	

Figura 20: Resultados del contenido de antígeno HA (en µg/dosis) para la cepa B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria) en los estudios de degradación, experimento 11

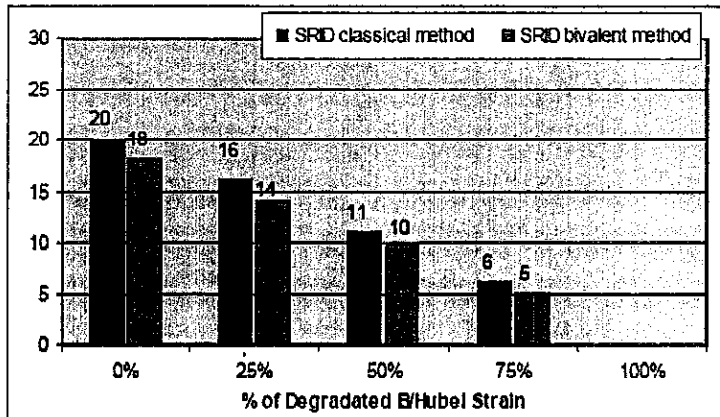


ROXANA MONTEMILONE  
 DIRECTORA TÉCNICA  
 APODERADA  
 SANOFI PASTEUR S.A.





**Figura 21: Resultados del contenido de antígeno HA (en µg/dosis) para la cepa B/Hubei/Wujiagang/158/2009 (linaje Yamagata) en los estudios de degradación, experimento 12**



Los resultados presentados en la Figura 20 y en la Figura 21 demuestran que tanto el método clásico como el bivalente pueden detectar niveles de degradación diferentes del antígeno HA de la cepa B específica independientemente del nivel de la cepa B no específica. Esto se observa con la cepa B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria) degradada en presencia de un contenido más alto de antígeno HA de la cepa B/Hubei/Wujiagang/158/2009 (linaje Yamagata) y con la cepa B/Hubei/Wujiagang/158/2009 (linaje Yamagata) degradada en presencia de un contenido más alto de antígeno HA de la cepa B/Brisbane/60/2008 (linaje Victoria).

Además, para los tres niveles de degradación de una cepa B y para las diferentes cepas B, los resultados del contenido de antígeno HA obtenidos con el método bivalente son más bajos en comparación con los resultados obtenidos por el método clásico, y más próximos al valor objetivo de formulación.

En cualquier caso, los estudios de degradación forzada han demostrado que utilizando el método de SRID bivalente se detecta una reducción del contenido de antígeno HA de cada cepa B en la QIV en presencia de la otra cepa B no degradada.

### 3.2.3.3 Conclusión

Los estudios de agregado y los estudios de degradación demuestran que la SRID (tanto el método clásico como el bivalente) puede detectar el cambio en la cantidad de una cepa y detectar la degradación de una cepa B, mientras se mantiene el nivel de la otra cepa B. Los resultados de recuperación se acercan al 100 % cuando se utiliza el método de SRID bivalente. Estos estudios respaldan la importancia del método de SRID bivalente para las cepas B en la etapa de DP. Con base en estos resultados, queda demostrado que el método de SRID bivalente es adecuado para la determinación específica, exacta y precisa del contenido de antígeno HA en la formulación tetravalente de las vacunas antigripales. El método de SRID bivalente minimiza el efecto de la reactividad cruzada y, por ende, la sobrestimación, y puede detectar la posible disminución del

