

Tabla 10.

Filtros empleados en la fabricación de la vacuna contra el VPH y ensayos asociados de validación

Composición del filtro	Función del filtro	Ensayos			
		Extraíbles	Retención microbiana	Integridad ^a	Enjuague
Fluoruro de polivinilideno (FPVD)	esterilización, reducción de la carga biológica	E ^b	C ^c	C	E
Polipropileno	clarificación	E	N/A ^d	N/A	E
Ésteres de celulosa mixtos	clarificación	E	N/A	N/A	E
Polietersulfona, celulosa y FPVD	recolección celular	C	N/A	N/A	C
Polietersulfona	ultrafiltración	C	N/A	N/A	C
Polisulfona	microfiltración	C	N/A	N/A	C
Polisulfona	ultrafiltración	C	N/A	N/A	C

^a El punto de burbuja se estableció experimentalmente.

^b E: Validados con base en la equivalencia con los filtros que se emplean actualmente en otros procesos de fabricación aprobados.

^c C: Validación completa ejecutada bajo el nuevo protocolo.

^d N/A: no aplicable. No se requiere la ensayo indicada para el filtro especificado.

2.5.5 Reutilización de los filtros

Se realizaron estudios de validación de la vida útil para los filtros que entran en contacto con los productos y que están destinados a usarse en repetidas ocasiones. En tales estudios, se analizaron los parámetros de integridad y performance en los procesos a lo largo de varios ciclos de producción normales, para 1) demostrar el almacenamiento y sanitización efectivos de los filtros de ultrafiltración (UF) mediante el control de la carga biológica y la endotoxina en los filtros reutilizados; 2) demostrar la vida útil de los filtros UF con respecto a los requerimientos de los procesos de purificación; y 3) demostrar la limpieza efectiva de los filtros UF después de su uso en los procesos. En dichos estudios se validaron un total de diez usos del mismo filtro, un periodo máximo de vigencia sucia de 24 horas y un periodo de vigencia post-sanitización (húmeda) de 31 horas entre 2 y 8 °C.

2.5.6 Sanitización y reutilización de las columnas

Se validó la reutilización de los medios para las columnas de cromatografía HS y de cromatografía HA en los procesos de purificación. Las columnas se emplearon para dos pasos diferentes de la purificación y se validaron de manera independiente, usando un método similar. Una columna empaquetada se reutilizó sólo para el mismo tipo de VPH. Esta


Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.
José Verone
Apoderado

MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.
Farm. Sebastián Darío Goldentul
DIRECTOR TÉCNICO
MATRICULA NACIONAL 15436

validación incluye la regeneración y la sanitización de las columnas usadas, así como la sanitización de las columnas recién empaquetadas. Los estudios de validación de la reutilización de las columnas demostraron una performance uniforme (consistente) de la cromatografía HS o HA a lo largo de los usos repetidos, una regeneración efectiva de la columna a lo largo del control de las proteínas residuales entre usos sucesivos y un almacenamiento y sanitización efectivos de la columna de cromatografía a lo largo del control de la carga biológica y la endotoxina en las columnas reutilizadas. La reutilización de las columnas de cromatografía HS se validó exitosamente hasta por diez usos para los tipos 11, 16 y 18 y hasta por cinco usos para el tipo 6. La reutilización de las columnas de cromatografía HA se validó exitosamente hasta por cinco usos para todos los tipos de VPH.

2.5.7 Análisis para los estudios de validación

La Tabla 11 presenta los métodos empleados durante los estudios de validación. Para algunos procedimientos se mencionan dos números de procedimiento diferentes. En estos casos, los dos métodos son idénticos en cuanto a los procedimientos. El uso de números de procedimiento diferentes refleja el hecho de que los ensayos se realizaron en diferentes laboratorios. En cuanto a la potencia relativa in vitro y el grado de adsorción, los números de procedimiento diferentes también reflejan el empleo de diferentes patrones de referencia. Cada análisis no registrado en las farmacopeas ha sido validado. En la Tabla 12 se presentan las descripciones de aquellos análisis usados exclusivamente para la validación de los procesos.


Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.
José Nerone
Aptoderado

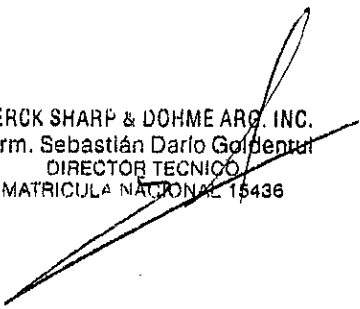

MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.
Farm. Sebastián Darío Goldentul
DIRECTOR TÉCNICO
MATRICULA NACIONAL 15436

Tabla 11.

Resumen de los análisis empleados en los estudios de validación

Nombre del análisis	Procedimiento ^a	Estudio de validación cuando se empleó el análisis
Peso celular seco	PEO 204-204W	Fermentación
Concentración de proteínas	PA 919.6032/PC 9110.768	Fermentación Purificación Reutilización de filtros
Hematócrito (biomasa)	PEO 204-204	Fermentación
Ruptura celular	PEO 204-205KK	Purificación
Porcentaje de pureza del PHS y del PHA ^b	PA 919.3040	Purificación Reutilización de columnas
Porcentaje de pureza (pureza de las proteínas) ^c	PA 919.3029/PC 9110.767	Purificación Reutilización de filtros
Productividad HS/HA	PA 919.6032/PC 9110.768	Purificación Reutilización de columnas
pH	PA 919.7007/PEO 224-388	Purificación Reutilización de filtros
	PEO 255-PWT-021	Reutilización de filtros
Desensamblado (porcentaje de reensamblado de PPV)	PA 919.1088	Purificación
Enlaces cruzados	PA 919.1087	Purificación
Potencia relativa <i>in vitro</i> (antigenicidad)	PA 919.4048/PC 9110.769	Purificación-Reutilización de filtros
Tamaño de las partículas y polidispersidad	PA 919.6039	Purificación
Polisorbato 80	PA 919.2018	Purificación Reutilización de filtros
Histidina	PA 919.1091	Purificación
Punto de congelación	PEO 160-160/ PEO 224-384X	Purificación Reutilización de los filtros
Grado de adsorción	PA 919.4035/PC 9110.769	Purificación-Reutilización de filtros
Carga biológica	PC 9110.679	Purificación Reutilización de los filtros Reutilización de las columnas
	PA 9110.001	Purificación
Esterilidad	PA 9110.001	Purificación
Aluminio	PC 9110.899	Purificación
AEN	PA 919.5043	Purificación Reutilización de las columnas
ARN	PA 919.5044	Purificación Reutilización de las columnas
Lípidos	PA 919.2022	Purificación Reutilización de las columnas
Carbohidratos	PA 919.2021	Purificación Reutilización de las columnas
DTT	PA 919.1085	Purificación
Porcentaje de monómeros intactos	PA 919.3029/ PC 9110.767	Purificación Reutilización de los filtros
Endotoxina	PC 9110.678/ PEO WGM030	Purificación Reutilización de los filtros Reutilización de las columnas
	PEO 223-280 PEO 223-294 ^d	Reutilización de los filtros
Conductividad	PEO 255-PWT-002	Reutilización de los filtros

^a PA: procedimiento analítico; PC: procedimiento de control; PEO: procedimiento estándar de operación.

^b PHS: producto de la cromatografía HS; PHA: producto de la cromatografía HA.

^c El PA 919.3040 describe el procedimiento para realizar la precipitación del ácido tricloroacético requerida para el análisis de los pasos intermedios del proceso. El PA 919.3029/PC 9110.767 describe el procedimiento para realizar el análisis de SDS-PAGE (siglas en inglés de "electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio").

^d El PEO 223-280 describe el procedimiento de manejo de las muestras. El PEO 223-294 describe el procedimiento para realizar el análisis de conductividad.

Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.
José A. Meron
Apodado

MERCK SHARP & DOHME ARG. INC
Farm. Sebastián Darío Goldento
DIRECTOR TÉCNICO
MATRICULA NACIONAL 15436

Tabla 12.

Descripción de los análisis de validación de los procesos

Nombre del análisis	Procedimiento	Descripción
Peso celular seco	PEO 204-204W	Se emplea para cuantificar la masa biológica de levaduras en muestras del caldo de fermentación. Se pipetea alícuotas de un volumen conocido en papeles filtro destarados, que se secan con microondas y se pesan. El peso celular seco se expresa en gramos de peso celular seco por litro.
Hematocrito (biomasa)	PEO 204-204	Se emplea para determinar el porcentaje de células en muestras de los procesos del VPH. Se transfieren muestras a tubos capilares y se centrifugan. La fracción celular se lee con un aparato lector de hematocrito.
Ruptura celular	PEO 204-205KK	Se emplea para determinar la eficiencia de la ruptura de las células. Se transfieren muestras de la suspensión celular, tomadas antes y después de la homogeneización, a tubos capilares que se centrifugan. Se calcula el porcentaje de células íntegras para cada muestra, y el porcentaje de ruptura celular se calcula a partir de la tracción de células íntegras en las muestras previas y posteriores a la homogeneización.
Desensamblado (porcentaje de reensamblado de PPV ^A)	PA 919.1088	Se emplea para medir las cantidades relativas de partículas parecidas a virus, capsómeros y proteínas L1 de muestras del PHA ^B y del producto acuoso final. Las muestras se separan en una columna de exclusión por tamaños. Las partículas parecidas a virus se eluyen en el volumen vacío, seguidas por los capsómeros y el pico de proteínas L1 que contiene las especies subcapsoméricas.
Enlaces cruzados	PA 919.1087	Se emplea para evaluar las cantidades relativas de monómeros, dímeros, trímeros y multímeros de L1. Las muestras se estudian en condiciones desnaturalizadas y no reductoras, calentándolas en dodecilsulfato de sodio al 5% durante 10 minutos a un pH bajo. A continuación se separan las especies de L1 en una columna de exclusión por tamaños, con detección UV a 220 y 280 nm. La cantidad relativa de cada especie se obtiene dividiendo el área del pico entre el área total del pico. Cuando los hay, los multímeros mayores de un trímero se coeluyen en el volumen vacío de la columna.
Tamaño de las partículas y polidispersidad	PA 919.6039	Se emplea para medir el radio hidrodinámico medio de las partículas en solución. Las muestras se diluyen hasta cierta concentración de proteínas o 50 µg/ml antes del análisis. A partir de los resultados obtenidos de tres muestras (con cinco mediciones de cada una), se calculan un diámetro hidrodinámico promedio (D _h) y un valor de polidispersidad.
Polisorbato 80 (PS-80)	PA 919.2018	Se emplea para medir la concentración de PS-80 con base en la formación de un complejo entre los grupos de estearato de polioxietileno del PS-80 y la fracción amilosa del almidón de papa. La amilosa libre se combina cuantitativamente con el yodo para formar un complejo amilosa-yodo de color azul, con una absorbancia máxima a 605 nm. La absorbancia a 605 nm disminuye en presencia de PS-80. La concentración se mide comparando la absorbancia de la muestra con una curva estándar del PS-80.
Histidina	PA 919.1091	Se emplea para medir la concentración de histidina. Las muestras se filtran y se inyectan en una columna C18 usando una fase móvil de 10 mM de fosfato de sodio que contiene 0.5 M de cloruro de sodio. La concentración de histidina se mide comparando el área pico de la muestra (detectada por la absorbancia de la luz UV a 220 nm) con la de una curva estándar de la histidina.
Carga biológica	PC 9110.679	Se emplea para determinar el número total de microorganismos por unidad de volumen de la muestra. Se colocan sendas alícuotas de la muestra en dos placas de Petri estériles que contienen agar de soya con Trypticase® y se incuban entre 30 y 35 °C durante dos días.


 Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.
 José Nerone
 Apoderado

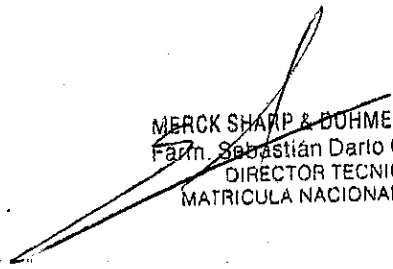

 MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.
 FIRM. Sebastián Darío Goldentul
 DIRECTOR TÉCNICO
 MATRICULA NACIONAL 15436

Tabla 12.

Descripción de los análisis de validación de los procesos

Nombre del análisis	Procedimiento	Descripción
ADN	PA 919.5043	Se emplea para medir el ADN genómico residual de las levaduras. Las muestras se tratan con proteinasa K para facilitar la liberación de los ácidos nucleicos y se realiza la extracción. A continuación, los gránulos de ácidos nucleicos se lavan con etanol y se resuspenden en agua. La cantidad de ADN genómico residual de las levaduras se determina mediante RCP ^a cuantitativa en tiempo real, usando el sistema TaqMan [®] de fluoróforo Indicador (<i>reporter</i>) y grupo extintor de la fluorescencia (<i>quencher</i>) (Perkin-Elmer Applied Biosystems).
ARN	PA 919.5044	Se emplea para medir el ARN residual de las levaduras. Las muestras se tratan con proteinasa K para facilitar la liberación de los ácidos nucleicos y se realiza la extracción. A continuación, los gránulos de ácidos nucleicos se tratan con desoxirribonucleasa para digerir el ADN residual. Las concentraciones de ARN de las muestras se determinan comparando los valores de fluorescencia contra una curva estándar de referencia de ARN ribosómico.
Lípidos	PA 919.2022	Se emplea para medir el contenido total de lípidos. Los lípidos reaccionan con la fosfovalinilina en presencia de ácidos sulfúrico y fosfórico para formar un producto de color, que se detecta a 530 nm y se cuantifica por comparación con una curva estándar lineal.
Carbohidratos	PA 919.2021	Se emplea para medir el contenido total de carbohidratos por un método colorimétrico basado en la reacción del fenol y el ácido sulfúrico con los carbohidratos. La concentración se determina comparando las absorbancias con una curva estándar.
Ditiotreitol (DTT)	PA 919.1085	Método de cromatografía líquida de alta resolución para medir las concentraciones de DTT reducido y total (reducido + oxidado). El contenido de DTT total se calcula reduciendo las muestras antes del análisis. La detección se realiza usando una sonda fluorescente que reacciona con el DTT reducido. La cuantificación se lleva a cabo comparando la señal de la muestra con una curva estándar.
Punto de congelación	PEO 224-384X	Se emplea para determinar la depresión del punto de congelación de la sustancia farmacéutica y del producto farmacéutico. El instrumento se calibra con soluciones patrón comerciales, y se calcula la depresión del punto de congelación multiplicando el número de milímetros medidos en la muestra analizada por el factor de depresión del punto de congelación.

PA: procedimiento analítico; PC: procedimiento de control; PEO: procedimiento estándar de operación.

^a PPV: partículas parecidas a virus

^b PHA: producto de la cromatografía HA

^c RCP: reacción en cadena de la polimerasa


Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.
José Verone
Apoderado


MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.
Farm. Sebastián Darío Goidentul
DIRECTOR TÉCNICO
MATRICULA NACIONAL 15436

1. Productos de degradación y límites de detección:

1.1 Presentar validación del método para demostrar que el DTT residual en el producto terminado no causa efectos adversos en humanos:

Impurezas:

El DTT corresponde a un tipo de impureza derivada de los residuos de los procesos.

Se utilizó para monitorear los niveles de DTT un método de valoración por cromatografía líquida de alta resolución (HLPC) con detección de fluorescencia. Esta valoración se validó, de manera de soportar los procesos de validación. Más adelante se muestra la validación de este método.

El DTT se eliminó de manera consistente a niveles por debajo del límite de validación del proceso de 200 nM.

A continuación se explica que el DTT residual en el producto terminado se encuentra por debajo de los límites establecidos por FDA/ EMEA:

Justificación:

No se han establecido aún límites específicos para el DTT residual en productos administrados por vía intramuscular; sin embargo, para tratar dicho tema se puede utilizar el concepto de los niveles de seguridad convenidos internacionalmente (umbral de preocupación toxicológica, o TTC). El TTC es un principio que se refiere a un valor de exposición para todos los productos químicos por debajo del cual no habría ningún riesgo apreciable para la salud humana [1]. Tanto la Food and Drug Administration [FDA] (Dirección de Alimentos y Medicamentos de EE.UU.), como la Agencia de Evaluación de Medicamentos Europea (EMA) utilizan un umbral de regulación, el cual se refiere a la concentración de la dieta dando un límite de ingesta de 1,5 µg por persona por día para contaminantes alimentarios indirectos (Incluidos los carcinógenos genotóxicos) durante el transcurso de la vida de una persona [2]. Para compuestos con otros tipos de toxicidad (neurotoxicidad, toxicidad reproductora, e inmunotoxicidad) los TTCs son superiores a dicho límite y varían hasta 120 µg/día [3]. Debe hacerse notar que el límite TTC de 1,5 µg/día es muy conservador (protector de la salud) por los efectos compuestos de las diferentes suposiciones conservadoras utilizadas para derivar dicho límite [4]. Si bien este límite es

Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.

José Nerone
Apoderado


MERCK SHARP & DOHME ARG INC
Firm. Sebastián Darío Goldenti
DIRECTOR TÉCNICO
MATRICULA NACIONAL 15436

desarrolló para impurezas administradas por vía oral, el límite TTC de 1,5 µg/día se puede tomar en consideración cuando se comparan los efectos posibles del DTT residual en este producto.

Sólo tres de los cuatro procesos de producción de los principios activos utilizan DTT. El DTT se remueve en forma subsiguiente a través de diafiltrado. La validación del proceso de purificación del proceso de manufactura ha sido validada para confirmar un clearance consistente del DTT. Todas las partidas analizadas se han encontrado por debajo del límite de cuantificación del ensayo (200 nM). Se efectúan diluciones adicionales para producir el Producto Cuadrivalente en Contenedor Final, el cual contiene 200 µg de proteína L1/ml de los tres componentes que utilizan DTT (diluido de una concentración típica de 900 µg de proteína L1/ml). De tal modo el factor de dilución acumulado de los tipos de virus HPV que pueden contener DTT es de aproximadamente 0,22 (200 µg/ml + 900 µg/ml). Si se asume una concentración máxima de DTT de 200 nM para los tres de dichos tipos de HPV, el máximo de DTT en el producto final es 44 nM (0,22 x 200 nM). Ésto se traduce en un máximo de 3,4 ng DTT por dosis de 0,5 ml, tal como se observa en el cálculo a continuación.

$$[(44 \times 10^{-9} \text{ mol/L}) \times (154,25 \text{ g/mol}) \times (1000 \text{ mg/g}) \times (1 \times 10^{-3} \text{ L/mL}) \times (0,5 \text{ mL}) \times (1 \times 10^6 \text{ ng/mg})] = 3.4 \text{ ng}$$

Este nivel de menos de 3,4 ng de DTT logrado en el producto final es al menos 440 veces inferior al límite de TTC de 1,5 µg/día. Además, este producto se administra únicamente en tres ocasiones cuando se compara con la dosis diaria que se tiene en cuenta para el límite de TTC. Por lo tanto, aún cuando las drogas administradas por vía intramuscular cuentan con un riesgo mayor de TTC que las drogas administradas por vía oral, los bajos niveles de DTT en el producto y la dosificación poco frecuente deberían hacer que los residuos de DTT sean de inquietud toxicológica mínima a nula. Respecto a cualquier preocupación referida a posibles efectos locales, son necesarias concentraciones milimolares de DTT para provocar citotoxicidad o daño al ADN *in vitro* [5], por lo tanto, los niveles nanomolares que podrían encontrarse presentes en el producto no plantean ninguna inquietud.


Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.
José Heron
Apodado


MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.
Farm. Sebastián Darlo Goldentul
DIRECTOR TECNICO
MATRICULA NACIONAL 15436

Referencias:

1. R. Kroes *et al.* "Structure-based thresholds of toxicological concern (TTC): guidance for application to substances present at low levels in the diet" *Food and Chemical Toxicology* 42 (2004) 65-83.
2. CHMP Guideline on the Limits of Genotoxic Impurities, 23-Jun-2004. CHMP/SWP/5199/02.
3. L. Müller *et al.* "A rationale for determining, testing and controlling specific impurities in pharmaceuticals that possess potential for genotoxicity" *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 43 (2006) 198-211.
4. D. G. Dolan *et al.* "Application of the threshold of toxicological concern concept to pharmaceutical manufacturing operations" *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 43 (2005) 1-9.
5. Threitol, 1,4-dithio-, DL. Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS).

A continuación se agrega la validación de esta valoración.

Validación del método de valoración del DTT:

El AP 919.1085, el ensayo por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) para la Cuantificación de la Concentración de Ditiotreitól (DTT) en las Muestras de Proceso de la Vacuna contra el Papilomavirus Humano (HPV), describe el método para cuantificar las concentraciones de DTT tanto reducidas como totales (reducidas y oxidadas) en las muestras Tipo 6, 11 y 16. El contenido total de DTT se determinó reduciendo las muestras antes de su análisis. El método consiste en un ensayo por HPLC de fase reversa. La detección se lleva a cabo utilizando un detector de fluorescencia que reacciona con el DTT reducido. La cuantificación se lleva a cabo comparando la señal de la muestra con una curva estándar. La concentración residual de DTT podría afectar tanto el ensamble de los VLPS como la unión cruzada molecular inter-L1.

Este ensayo fue validado en tres experimentos. Primero, se analizó un buffer de filtración estéril (el control negativo) y muestras de HPV FAP (Producto acusoso final) preparadas tanto solas como mezcladas con DTT en tres niveles (200 nM, 300 nM, y 500 nM), y en seis corridas del ensayo. Los datos resultantes se utilizaron para evaluar la exactitud, repetibilidad, precisión y especificidad. En un segundo experimento, se prepararon y analizaron en forma independiente curvas estándar extendidas de DTT en siete niveles de concentración (100 nM, 200 nM, 300 nM, 400 nM, 600 nM, 800 nM y 1.200 nM) durante tres días en duplicado para un total de 6 corridas. Los datos se utilizaron para evaluar la exactitud, repetibilidad, precisión y el límite de cuantificación. La especificidad se evaluó en la

Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.
José Berone
Apoderado

MERCK SHARP & DOHME ARG-INC
Pharm. Division
DIRECTOR TÉCNICO
MATRICULA NACIONAL 15436

partida de la columna se evaluó realizando dos corridas utilizando cada una de las dos partidas diferentes de columnas. Además, se analizaron cinco combinaciones diferentes de tiempos de reducción y derivatización.

Los parámetros analizados, los criterios de aceptación, y los resultados se observan en la Tabla 1. Los criterios de aceptación se establecieron sobre la base del desempeño exigido por la aplicación. En este caso el ensayo se utilizó para medir el contenido residual de DTT para respaldar la validación del proceso. Como tales, los criterios especificados se consideraron aceptables.

Tabla 1

Validation Summary for AP 919.1085 (DTT)

Validation Parameter	Acceptance Criteria	Validation Results	
Linearity	Proportional bias per twofold dilution $\leq 20\%$	Proportional bias per twofold dilution = 6.3%	
Accuracy	Average Recovery ^a : 200 nM: 100 \pm 50% 300 nM: 100 \pm 40% 500 nM: 100 \pm 30%	Spike	Average recovery
		200 nM	86%
		300 nM	93%
		500 nM	105%
Repeatability	RSD $\leq 20\%$	Spike	RSD
		unspiked	1.0%
		200 nM	4.5%
		300 nM	4.7%
		500 nM	0.13%
Precision	RSD $\leq 20\%$	Overall	8.7%
		Spike	RSD
		unspiked	14%
		200 nM	4.5%
		300 nM	4.7%
Specificity	Average interpolated concentration of DTT $<$ LOD	500 nM	9.6%
		Overall	9.4%
		Ultrafiltration Buffer: 71.5 nM FAP: 97.9 nM	
		200 nM	
		100 nM	
Limit of Quantitation	Lowest concentration in a range across which RSD will be $<20\%$	200 nM	
Limit of Detection	LOD \leq LOQ	100 nM	
Ruggedness	Difference $<$ 20%	Variable	Difference
		Reduction Time	6.1%
		Derivatization Time	4.6%
		Column Lot ^b	4.4%

^a Percent recovery calculated by subtracting the measured DTT concentration for unspiked samples from the measured concentration for spiked sample and dividing by the spike level.

^b This value represents the maximum percent difference across all samples.

Linealidad

La linealidad se evaluó calculando el efecto de dilución (sesgo porcentual por una dilución de dos veces), el cual se define como:

Jose Verone
Apostado
Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.

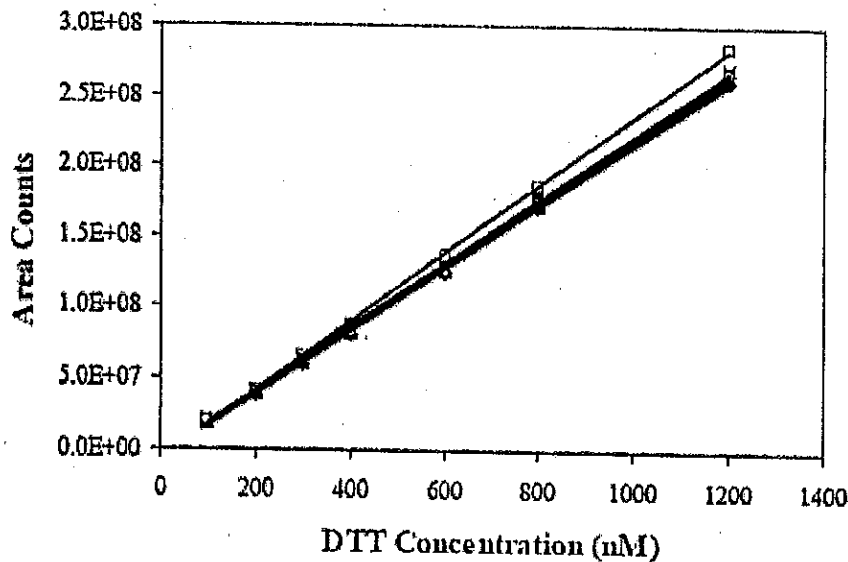
MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.
Farm. Sebastián Darío Goldentul
DIRECTOR TÉCNICO
MATRICULA NACIONAL 15436

$$\text{Dilution Effect} = 100 \times (2^{1-b} - 1)$$

donde b es la pendiente de la línea obtenida de la regresión de la concentración pronosticada respecto a la concentración esperada en las muestras mezcladas. El efecto global de la dilución fue 6,3%. En la Figura 1 se observa un gráfico de las curvas estándar ampliadas.

Figura 1

Graph of Extended Standard Curves for the DTT Assay



Exactitud

La exactitud se evaluó utilizando los datos provenientes del experimento de recuperación. La exactitud del método se expresó en términos de recuperación porcentual de la mezcla de DTT, la cual se define como:

$$\text{Percent Recovery} = \frac{\text{DTT Concentration After Spiking} - \text{DTT Concentration Before Spiking}}{\text{DTT Spike Level}}$$

Donde las concentraciones de DTT se obtuvieron interpolando las curvas estándar ajustadas. Las recuperaciones globales de mezclado fueron 86%, 93% y 105% para los niveles de mezclado de 200-nM, 300-nM, y 500-nM, respectivamente.

Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.
 José [Signature]
 Apoderado

MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.
 Farm. Sebastián Darío Goldentul
 DIRECTOR TÉCNICO
 MATRICULA NACIONAL 15486

Repetibilidad y precisión

Asumiendo un modelo lineal mixto, se llevó a cabo un análisis de los componentes de variancia sobre las concentraciones interpoladas de DTT por nivel de mezclado y a lo largo de todos los niveles de mezclado combinados. La repetibilidad y la precisión se evaluaron por desvío estándar relativo (RSD) intra-corrída e inter-corrída, respectivamente. El RSD para repetibilidad y precisión fue 8,7% y 9,4%, respectivamente.

Especificidad

La especificidad se evaluó demostrando que las concentraciones interpoladas promedio del buffer de filtración estéril derivado (0,5 M de cloruro de sodio y polisorbato al 0,05%) y de HPVP11PR9901 FAP (producto final acuoso) derivado, se encontraban por debajo de límite de detección (LOD) del ensayo (100 nM). Las concentraciones de DTT promedio fueron 72 nM para el buffer de filtración estéril y 98 nM para el producto final acuoso (FAP).

Límite de detección (LOD)

El límite de detección (LOD) se definió como la menor concentración que puede detectarse, pero que no necesariamente se cuantifica en forma precisa. Este se define por una concentración correspondiente a una respuesta que se encuentra 3,3 desvíos estándar por encima de la respuesta de fondo. El desvío estándar se tomó como la raíz del error cuadrático medio del análisis de regresión lineal. Ésta es la variación en los datos que aún no se tomó en cuenta después de ajustar la curva estándar. De este modo, el LOD se calcula como:

$$LOD = \frac{3.3s}{b}$$

En donde *b* es la pendiente estimada y *s* es la raíz del error cuadrático medio. Para cada corrida de la curva estándar ampliada, se determinó un LOD. Los resultados del LOD variaron de 25 a 37 nM, todos los cuales se hallaron por debajo del punto inferior de la curva estándar. Por lo tanto, el LOD se tomó como 100 nM, el punto más bajo de la curva estándar.

Límite de Cuantificación (LOQ)

El límite de cuantificación (LOQ) se define como la concentración de DTT más baja en una muestra que puede medirse en forma cuantitativa con precisión y exactitud apropiadas. De acuerdo con las guías de la ICH, el LOQ se derivó de una fórmula aproximada para la

Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.
Jose Nerone
Aprobado

MERCK SHARP & DOHME ARG. INC
Farm. Sebastián Darío Goldentu
DIRECTOR TÉCNICO
MATRICULA NACIONAL 15436

variancia de una concentración interpolada. Ello se llevó a cabo a través de una aproximación de series de Taylor de primer orden. Como todos los puntos de la curva estándar cumplieron con el requisito de precisión, el ensayo puede cuantificar la concentración de DTT en forma precisa hasta la preparación estándar más baja analizada en este estudio, 100 nM. Sin embargo, dado que la exactitud sólo se analizó a niveles de mezcla tan bajos como 200 nM, el LOQ se tomó como de 200nM.

Robustez

Se evaluaron los parámetros de robustez: partida de columna, tiempo de reducción y tiempo de derivación. Durante la validación se evaluaron dos partidas de columnas diferentes. Se llevaron a cabo dos corridas en dos columnas diferentes para un total de cuatro corridas.

Las concentraciones de DTT en las muestras de prueba se obtuvieron interpolando las curvas estándar ajustadas. La robustez entre las dos columnas se evaluó por diferencia porcentual en las concentraciones interpoladas promedio. Las diferencias en las concentraciones interpoladas promedio entre las dos columnas variaron de 0,55% a 4,40%, con una diferencia global de 0,00%.

El tiempo de reducción y el tiempo de derivatización se evaluaron reduciendo un estándar de DTT de 600 nM con borohidruro sódico durante 12, 15 y 17 minutos, como así también derivando el estándar de igual concentración con mBrB durante 2,5, 3,0 y 3,5 minutos. La diferencia porcentual máxima fue de 6,14% a través de los tiempos de reducción y fue de 4,65% a través de los tiempos de derivación.

Conclusión.

Los resultados generados durante el estudio de validación cumplieron con todos los criterios de aceptación. Por ello, el ensayo se consideró validado para el rango de 200 a 500 nM.

1.2 Modelos de certificados para materias primas:


Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.
Jose Nerone
Apoesado



MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.
Farm. Sebastián Dario Goldentul
DIRECTOR TÉCNICO
MATRICULA NACIONAL 15436



**WEST POINT QUALITY OPERATIONS
RESULTS WORKSHEET**

User Submission ID 20040524-961
 User Sample ID WT4
 Material Name WATER FOR INJECTION
 Material Type WATER FOR INJECTION
 Sample Plan 204T4170.01
 Login Date/Time 24-MAY-04 12:02 AM
 Sampling Site WT4
 Sample Plan Description TANK 4170 HOT CHEMISTRY
 (B.60)
 BUILDING_ROOM 60_6327

Logger ID SCHEDULER
 DEPARTMENT 57204_BTMC CHEMISTRY
 NUMBER_DESCRIPTION
 TEAM Utilities



* 2 0 0 8 7 2 1 9 8 *

Sample ID 200872198
 Submission ID 101230961

Method UTILITIES SAMPLING INFO Method ID

Component	Value	Units	Specification
SAMPLING DATE.DATETIME	05/24/2004 03:18	MM/DD/YYYY HH24:MI	N/A
SAMPLING INFO.COMPLETE	YES	YES/NO	

Method WATER FILTRATION/SAMPLE PREP Method ID

Component	Value	Units	Specification
FILTRATION DATE.DATETIME	05/24/2004 10:11	MM/DD/YYYY HH24:MI	N/A
WATER CONTROLS NUMBER.NUMBER	04145	NONE	N/A
FILTRATION INFO.COMPLETE	YES	YES/NO	
FILTRATION.INTERVAL	6.88	HOURS	≤24

Method WATER MICRO TESTING Method ID

Component	Value	Units	Specification
BACTERIA.COUNT	0	CFU	N/A
MOLD.COUNT	0	CFU	N/A
ACTION SUM.BACTERIA + MOLD	0	CFU	Less than 20
ALERT SUM.BACTERIA + MOLD	0	CFU	Less than 8
INCUBATION INTERVAL.HOURS	142.2	HOURS	Greater than or equal to 120

Method CONDUCTIVITY MEL. COMPLETE Method ID

LAB GROUP MEL

Component	Value	Units	Specification
DATE.ON TEST DATE.DATE	05/25/2004 00:00	MM/DD/YYYY HH24:MI	N/A
INST.CONDUCTIVITY.EQUIPMENT NUMBER	C1	NONE	N/A
IND.CONDUCTIVITY.CONDUCTIVITY	1.0	µS/cm	N/A
ACTION IND.CONDUCTIVITY.CONDUCTIVITY	1	µS/cm	Less than or equal to 2.1
ALERT IND.CONDUCTIVITY.CONDUCTIVITY	1	µS/cm	Less than or equal to 1.8

[Signature]
 Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.
 José Nerone
 Apoderado

[Signature]
 MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.
 Farm. Sebastián Dario Goldentul
 DIRECTOR TECNICO
 MATRICULA NACIONAL 15436



WEST POINT QUALITY OPERATIONS
RESULTS WORKSHEET

84

User Submission ID 20040524-961
 User Sample ID WT4
 Material Name WATER FOR INJECTION
 Material Type WATER FOR INJECTION
 Sample Plan 204T4170.01
 Login Date/Time 24-MAY-04 12:02 AM

* 2 0 0 8 7 2 1 9 8 *

Sample ID 200872198
 Submission ID 101230961

Logger ID SCHEDULER

Method	CONDUCTIVITY MEL. COMPLETE	Method ID
--------	----------------------------	-----------

Method	COLOR AND APPEARANCE MEL.WATER	Method ID
--------	--------------------------------	-----------

LAB GROUP MEL

Component	Value	Units	Specification
TXT.COLOR AND APPEARANCE.COLOR	CONFORMS	PASS/FAIL	CONFORMS
DATE.ON TEST DATE.DATE	05/26/2004 00:00	MM/DD/YYYY HH24:MI	N/A

Method	TOTAL ORGANIC CARBON.WATER	Method ID
--------	----------------------------	-----------

LAB GROUP 8K

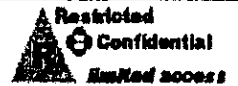
Component	Value	Units	Specification
IND.TOC RESULT.RESULT	120	ppb	N/A
ACTION IND.TOC RESULT.RESULT	120	ppb	Less than or equal to 500
ALERT IND.TOC RESULT.RESULT	120	ppb	Less than or equal to 300
IND.TOC SAMPLE RSD.RSD	1	%	N/A
INST.TOC ANALYZER.EQUIPMENT NUMBER	223256	NONE	N/A
DATE.ON TEST DATE.DATE	05/25/2004 00:00	MM/DD/YYYY HH24:MI	N/A
DATE.OFF TEST DATE.DATE	05/26/2004 00:00	MM/DD/YYYY HH24:MI	N/A

Method	LAL FOR WFI.WATER	Method ID	LAL.WATER
--------	-------------------	-----------	-----------

LAB GROUP 8K

Component	Value	Units	Specification
IND.LAL_RESULT.CONCENTRATION	< 0.05	EU/ml	N/A
ACTION IND.LAL_RESULT.CONCENTRATION	< 0.05	EU/ml	Less than or equal to .25
ALERT IND.LAL_RESULT.CONCENTRATION	< 0.05	EU/ml	Less than or equal to 0.10
IND.LAL_SPIKE_RECOVERY.RECOVERY	91.785	%	50<=x<=150
INST.MICROPLATE READER.NUMBER	223033	NONE	N/A
DATE.ON TEST DATE.DATE	05/25/2004 00:00	MM/DD/YYYY HH24:MI	N/A

Instance: NGLWPR Report Version 2.0
 Date Printed: 25-JAN-2006 (01:43:26 PM)
 Printed By: BANKIN CHRISTINE



Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.
 Jose Nelone
 Apoderado

MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.
 Farm. Sebastian Dario Goldentui
 DIRECTOR TECNICO
 MATRICULA NACIONAL 15436

