



Lista de tablas

Tabla 1: Ensayo de formaldehído residual, resumen de la validación: especificidad y linealidad .12	12
Tabla 2: Ensayo de formaldehído residual, resumen de la validación: exactitud, precisión y límite de cuantificación.....13	13
Tabla 3: Especificidad: concentraciones de formaldehído medidas <i>frente</i> a concentraciones teóricas (µg/mL).....14	14
Tabla 4: Especificidad: porcentaje de recuperación entre el agregado medido y el agregado teórico (%)14	14
Tabla 5: Linealidad: concentraciones medidas frente a concentraciones teóricas previstas (µg/mL)15	15
Tabla 6: Linealidad - Ecuación de la recta de regresión16	16
Tabla 7: Exactitud: porcentaje de recuperación promedio por concentración18	18
Tabla 8: Exactitud: porcentaje de recuperación promedio global y límite de confianza del 95 %.19	19
Tabla 9: Precisión: concentración de formaldehído residual (µg/mL).....19	19
Tabla 10: Precisión: características de repetibilidad y precisión intermedia20	20
Tabla 11: Límite de cuantificación: concentraciones de formaldehído residual (µg/mL)21	21
Tabla 12: Límite de cuantificación: características de repetibilidad y precisión intermedia21	21
Tabla 13: Resultados de la validación: especificidad y linealidad23	23
Tabla 14: Resultados de la validación: exactitud y precisión en el nivel de rutina.....24	24
Tabla 15: Resultados de la validación: límite de cuantificación25	25
Tabla 16: Especificidad: concentraciones medidas <i>frente a</i> concentraciones teóricas (µg/mL) - PRP no adsorbido total26	26
Tabla 17: Especificidad: concentraciones medidas <i>frente a</i> concentraciones teóricas (µg/mL) - PRP despolimerizado26	26
Tabla 18: Especificidad: porcentaje de recuperación entre el agregado medido y el agregado teórico (%) - PRP no adsorbido total.....27	27
Tabla 19: Especificidad: porcentaje de recuperación entre el agregado medido y el agregado teórico (%) - PRP despolimerizado27	27
Tabla 20: Linealidad: concentraciones medidas <i>frente a</i> concentraciones teóricas previstas (µg/mL) - PRP no adsorbido total28	28
Tabla 21: Linealidad: concentraciones medidas frente a concentraciones teóricas previstas (µg/mL) - PRP despolimerizado.....29	29
Tabla 22: Linealidad: ecuación de la recta de regresión -PRP no adsorbido total.....30	30





Tabla 23: Linealidad: ecuación de la recta de regresión - Porcentaje de PRP despolimerizado.....31

Tabla 24: Exactitud: porcentaje de recuperación medio por concentración - PRP no adsorbido total.....33

Tabla 25: Exactitud: porcentaje de recuperación medio por concentración - Porcentaje de PRP despolimerizado.....34

Tabla 26: Precisión: concentraciones de PRP no adsorbido total ($\mu\text{g/mL}$) en el nivel de rutina....35

Tabla 27: Precisión: PRP despolimerizado ($\mu\text{g/mL}$) en el nivel de rutina.....35

Tabla 28: Precisión: porcentaje de PRP despolimerizado (%) en el nivel de rutina36

Tabla 29: Precisión: características de repetibilidad y precisión intermedia - PRP no adsorbido total en el nivel de rutina ($\mu\text{g/mL}$).....36

Tabla 30: Precisión: características de repetibilidad y precisión intermedia - Porcentaje de PRP despolimerizado en el nivel de rutina (%).....37

Tabla 31: Precisión: porcentaje de PRP despolimerizado ($\mu\text{g/mL}$) en el nivel +338

Tabla 32: Precisión: porcentaje de PRP despolimerizado (%) en el nivel +338

Tabla 33: Precisión: características de repetibilidad y precisión intermedia - Porcentaje de PRP despolimerizado en el nivel +3 (%).....39

Tabla 34: Precisión: porcentaje de PRP despolimerizado ($\mu\text{g/mL}$) en el nivel 2.....39

Tabla 35: Precisión: porcentaje de PRP despolimerizado (%) en el nivel -240

Tabla 36: Límite de cuantificación de la matriz para el PRP despolimerizado: características de repetibilidad y precisión intermedia (%)40

Tabla 37: Resultados de la validación: especificidad y linealidad.....42

Tabla 38: Resultados de la validación: exactitud y precisión.....44

Tabla 39: Especificidad: resultados.....45

Tabla 40: Linealidad: concentraciones medidas frente a concentraciones teóricas (Lf/mL).....45

Tabla 41: Linealidad - Ecuación de la recta de regresión46

Tabla 42: Exactitud: porcentaje de recuperación promedio global y límite de confianza del 95 %48

Tabla 43: Precisión: concentración de toxoide diftérico purificado no adsorbido (Lf/mL) y porcentaje de adsorción49

Tabla 44: Precisión: características de repetibilidad y precisión intermedia49

Tabla 45: Precisión: características de repetibilidad y precisión intermedia50

Tabla 46: Contenido de antígeno de hepatitis B mediante ELISA, resumen de los resultados de la validación: especificidad y linealidad52

Tabla 47: Contenido de antígeno de hepatitis B mediante ELISA, resumen de los resultados de la validación: exactitud y precisión53


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
COORDINADOR
SANOFI PASTEUR S.A.

Tabla 48: Contenido de antígeno de hepatitis B mediante ELISA, resumen de los resultados de la validación: precisión y límite de cuantificación para HBsAg no adsorbido54

Tabla 49: Especificidad: resultados55

Tabla 50: HBsAg total - Linealidad: concentraciones medidas frente a concentraciones teóricas previstas (µg/mL)56

Tabla 51: HBsAg total - Linealidad: Ecuación de la recta de regresión57

Tabla 52: HBsAg no adsorbido - Linealidad: concentraciones medidas frente a concentraciones teóricas previstas (µg/mL).....59

Tabla 53: HBsAg no adsorbido - Linealidad: ecuación de la recta de regresión60

Tabla 54: HBsAg total - Exactitud: porcentaje de recuperación promedio por concentración.....62

Tabla 55: HBsAg total - Exactitud: porcentaje de recuperación promedio global y límite de confianza del 95 %62

Tabla 56: HBsAg no adsorbido - Exactitud: porcentaje de recuperación promedio por concentración.....63

Tabla 57: HBsAg no adsorbido - Exactitud: porcentaje de recuperación promedio global y límite de confianza del 95 %.....63

Tabla 58: Precisión: concentraciones de HBsAg total (µg/mL).....64

Tabla 59: HBsAg total - Precisión: características de repetibilidad y precisión intermedia65

Tabla 60: Precisión: mediciones de la potencia relativa *in vitro*65

Tabla 61: Potencia relativa *in vitro*, precisión: características de repetibilidad y precisión intermedia66

Tabla 62: Precisión: concentraciones de HBsAg no adsorbido (µg/mL)66

Tabla 63: HBsAg no adsorbido. Precisión: características de repetibilidad y precisión intermedia67

Tabla 64: Precisión: porcentaje de adsorción (%)67

Tabla 65: Porcentaje de adsorción - Precisión: características de repetibilidad y precisión intermedia68

Tabla 66: Límite de cuantificación en el nivel -2: concentraciones de HBsAg no adsorbido (µg/mL)69

Tabla 67: Límite de cuantificación en el nivel -1: concentraciones de HBsAg no adsorbido (µg/mL)69

Tabla 68: Límite de cuantificación de la matriz en el nivel 2: características de repetibilidad y precisión intermedia70

Tabla 69: Límite de cuantificación de la matriz en el nivel -1: características de repetibilidad y precisión intermedia71

Tabla 70: Resultados de la validación: especificidad.....73

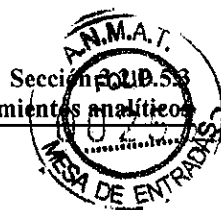


Tabla 71: Resultados de la validación: Linealidad.....	74
Tabla 72: Resultados de la validación: Exactitud.....	74
Tabla 73: Resultados de la validación: Precisión.....	75
Tabla 74: Especificidad intertipo, promedios del valor de densidad óptica (DO) del testigo del reactivo para el tipo 1	76
Tabla 75: Especificidad intertipo, promedios del valor de densidad óptica (DO) del testigo del reactivo para el tipo 2	76
Tabla 76: Especificidad intertipo, promedios del valor de densidad óptica (DO) del testigo del reactivo para el tipo 3	76
Tabla 77: Especificidad intervalencia: densidades ópticas	77
Tabla 78: Linealidad: concentraciones medidas frente a concentraciones teóricas previstas (UD/mL).....	79
Tabla 79: Linealidad: ecuación de la recta de regresión (tipo 1)	80
Tabla 80: Linealidad: ecuación de la recta de regresión (tipo 2)	81
Tabla 81: Linealidad: ecuación de la recta de regresión (tipo 3)	82
Tabla 82: Exactitud: porcentaje de recuperación promedio por concentración (tipo 1)	83
Tabla 83: Exactitud: porcentaje de recuperación promedio por concentración (tipo 2)	84
Tabla 84: Exactitud: porcentaje de recuperación promedio por concentración (tipo 3)	84
Tabla 85: Precisión: concentraciones de ensayo de antígeno D en la vacuna Hexaxim (UD/mL).....	85
Tabla 86: Precisión: características de repetibilidad y precisión intermedia para tipo 1	86
Tabla 87: Precisión: características de repetibilidad y precisión intermedia para tipo 2	86
Tabla 88: Precisión: características de repetibilidad y precisión intermedia para tipo 3	86
Tabla 89: Resultados de la validación (especificidad, linealidad y exactitud).....	88
Tabla 90: Resultados de la validación (precisión).....	89
Tabla 91: Especificidad y linealidad: concentraciones medidas <i>frente a</i> concentraciones teóricas (mg/mL).....	90
Tabla 92: Especificidad: porcentaje de recuperación entre el agregado medido y el agregado teórico (%).....	90
Tabla 93: Ecuación de la recta de regresión.....	92
Tabla 94: Exactitud: porcentaje de recuperación promedio global y límite de confianza del 95 %	94
Tabla 95: Precisión: concentraciones de aluminio (mg/mL).....	95
Tabla 96: Precisión: características de repetibilidad y precisión intermedia	95
Tabla 97: Especificación de la vacuna Hexaxim.....	96



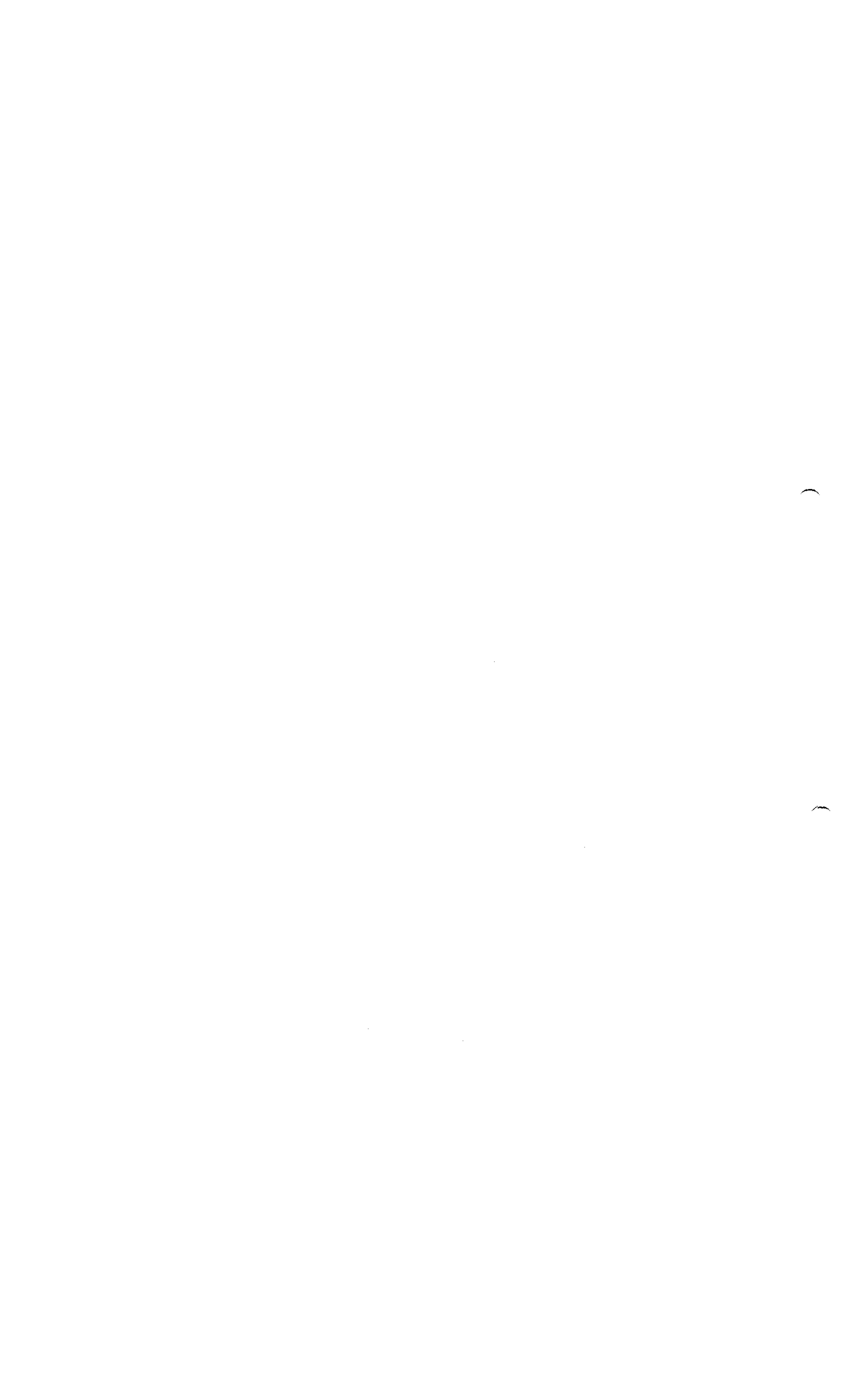


Tabla 98: Identificación de cada valencia por el método Luminex, resumen de validación.....97
Tabla 99: Resultados obtenidos para el control positivo y los controles negativos98
Tabla 100: Resultados de la vacuna Hexaxim.....99
Tabla 101: Resumen de la validación de Ouchterlony100
Tabla 102: Identificación del HBsAg mediante ELISA, resumen de validación.....104
Tabla 103: Especificidad: resultados.....105
Tabla 104: Resultados de la vacuna Hexaxim.....105



Lista de figuras

Figura 1: Gráfico de linealidad.....	17
Figura 2: Gráfico de linealidad - PRP no adsorbido total	31
Figura 3: Gráfico de linealidad - Porcentaje de PRP despolimerizado ($\mu\text{g}/\text{mL}$).....	32
Figura 4: Gráfico de linealidad.....	47
Figura 5: HBsAg total - Gráfico de linealidad	57
Figura 6: HBsAg no adsorbido - Gráfico de linealidad.....	60
Figura 7: Gráfico de linealidad del tipo 1	80
Figura 8: Gráfico de linealidad del tipo 2.....	81
Figura 9: Gráfico de linealidad del tipo 3.....	82
Figura 10: Gráfico de linealidad.....	93





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

1 Introducción

En esta sección se presenta el informe de validación de los métodos analíticos utilizados para la liberación del producto final a granel y el producto llenado cuando la prueba no se lleva a cabo de conformidad con la Farmacopea Europea o cuando la prueba no está detallada en la Farmacopea Europea.

Por motivos éticos, las pruebas *in vivo* relacionadas a continuación no están validadas dado que son métodos de la farmacopea:

- Potencia diftérica: prueba de desafío en cobayos (Ph. Eur. 2.7.6);
- Potencia tetánica: prueba de desafío en ratones (Ph. Eur. 2.7.8);
- Inmunogenicidad contra pertussis: prueba de inmunogenicidad en ratones (Ph. Eur. 2.7.16);
- Actividad de sensibilización a la histamina (Ph. Eur. 2.6.7);
- Prueba de pirógenos (Ph. Eur. 2.6.8).

1.1 Pruebas farmacopeicas detalladas en la Farmacopea Europea

Las pruebas siguientes fueron validadas de conformidad con los requisitos de la Farmacopea Europea (los informes de validación están disponibles pero no se suministran):

1.1.1 Producto final a granel

- Medición de la osmolalidad (Ph. Eur. 2.2.35);
- Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica (Ph. Eur. 2.6.1.).

1.1.2 Producto llenado

- Medición del pH (Ph. Eur. 2.2.3);
- Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica (Ph. Eur. 2.6.1.).





1.2 Pruebas no descritas o no detalladas en la Farmacopea Europea

Las pruebas siguientes no se describen o no se detallan en la Ph. Eur., por consiguiente en esta sección se presentan los estudios de validación.

1.2.1 Etapa de producto final a granel

- Contenido de formaldehído libre;
- PRP no adsorbido/PRP despolimerizado;
- Porcentaje de adsorción del toxoide diftérico (electroforesis en cohete)
- Porcentaje de adsorción de hepatitis B (ELISA)
- Potencia relativa *in vitro* de la hepatitis B (IVRP)
- Contenido de antígeno D (potencia de la poliomielitis *in vitro*)

1.2.2 Etapa de producto llenado

- Contenido de aluminio;
- Pruebas de identidad.

2 Precisiones sobre el vocabulario

"Nivel +" representa diferentes niveles de agregado del componente de interés en la muestra.

"Nivel -" representa diferentes niveles de dilución de la muestra estudiada.

"k =" representa el número de series realizadas en la condición de precisión inmediata (día u operador diferente, etc.).

"n =" representa la cantidad de mediciones realizadas en cada serie, efectuadas en condiciones de repetibilidad (réplicas).





3 Resúmenes de validación de las pruebas de liberación del producto final a granel

3.1 Contenido de formaldehído libre

3.1.1 Panorama

De conformidad con la guía de la International Conference on Harmonisation (ICH) y como parte de las Buenas Prácticas de Fabricación (BPF), este estudio describe la validación del ensayo de formaldehído residual en la vacuna Hexaxim en la fase de producto final a granel.

Con acetyl acetona y en presencia de exceso de sales de amoniaco, el formaldehído produce un compuesto de color amarillo: 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina, que se mide fotométricamente a 413 nm (pico de adsorción).

La intensidad de la coloración generada es proporcional a la cantidad de formaldehído presente en la muestra.

Dado que el método es un ensayo cuantitativo, las características estudiadas son la especificidad, linealidad, exactitud, precisión y límite de cuantificación (lote N° FDV01420).

Los resultados de la validación se resumen en la Tabla 1 y la Tabla 2:

Tabla 1: Ensayo de formaldehído residual, resumen de la validación: especificidad y linealidad

Características	Criterios de aceptación	Resultados
Especificidad	En el nivel +2, el porcentaje de recuperación entre la concentración medida del agregado y el agregado teórico debe hallarse entre el 80 % y el 120 %.	El porcentaje de recuperación del agregado teórico de formaldehído en el nivel +2 es: $\bar{R} = 97\%$
Linealidad	$P_{\text{linealidad}} \leq 0,01$ $P_{\text{Falta de ajuste}} > 0,05$ (de lo contrario, la curvatura debe ser insignificante)	$P_{\text{linealidad}} < 0,0001$ $P_{\text{Falta de ajuste}} = 0,70$ $Y = -0,009 + 1,010 X$ Donde X = concentración teórica prevista del formaldehído residual (log($\mu\text{g/mL}$)) e Y = concentración medida del formaldehído residual (log($\mu\text{g/mL}$)). $R^2 = 0,9991$ Rango de linealidad: [0,36-43,19] $\mu\text{g/mL}$



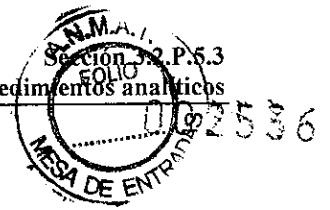


Tabla 2: Ensayo de formaldehído residual, resumen de la validación: exactitud, precisión y límite de cuantificación

Características	Criterios de aceptación	Resultados
Exactitud	El porcentaje de recuperación promedio calculado para los 5 niveles de concentración teórica prevista debe hallarse entre el 90% y el 110%.	El porcentaje de recuperación promedio global y sus límites de confianza del 95 % son los siguientes: 99% [96-101]%
Precisión	El intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia debe ser $\leq x/1,2$.	Media general: $\bar{m} = 0,105$; forma aritmética: 1,27 $\mu\text{g/mL}$ obtenido con un agregado para imitar el nivel de rutina en T0 La desviación estándar relativa de la repetibilidad y de la precisión intermedia es respectivamente: 2,2% y 7,3%. Intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia para 1 serie con 1 medición: $\pm 0,067$; que en forma aritmética equivale a $x/1,17$
Límite de cuantificación	El porcentaje de recuperación promedio calculado para este nivel debe hallarse entre el 80 % y el 120 %. El intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia debe ser $\leq x/1,2$.	El límite de cuantificación de la matriz es: LC = 0,36 $\mu\text{g/mL}$ Porcentaje de recuperación promedio en el límite de cuantificación: 97% Intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia para 1 serie con 1 medición: $\pm 0,061$; que en forma aritmética equivale a $x/1,15$

El método es específico, lineal y exacto en el rango [0,36-43,19] $\mu\text{g/mL}$, y preciso en el nivel del límite de cuantificación.

El método es válido para medir el formaldehído residual en la vacuna Hexaxim en las etapas de producto final a granel y de producto llenado.

3.1.2 Resultados

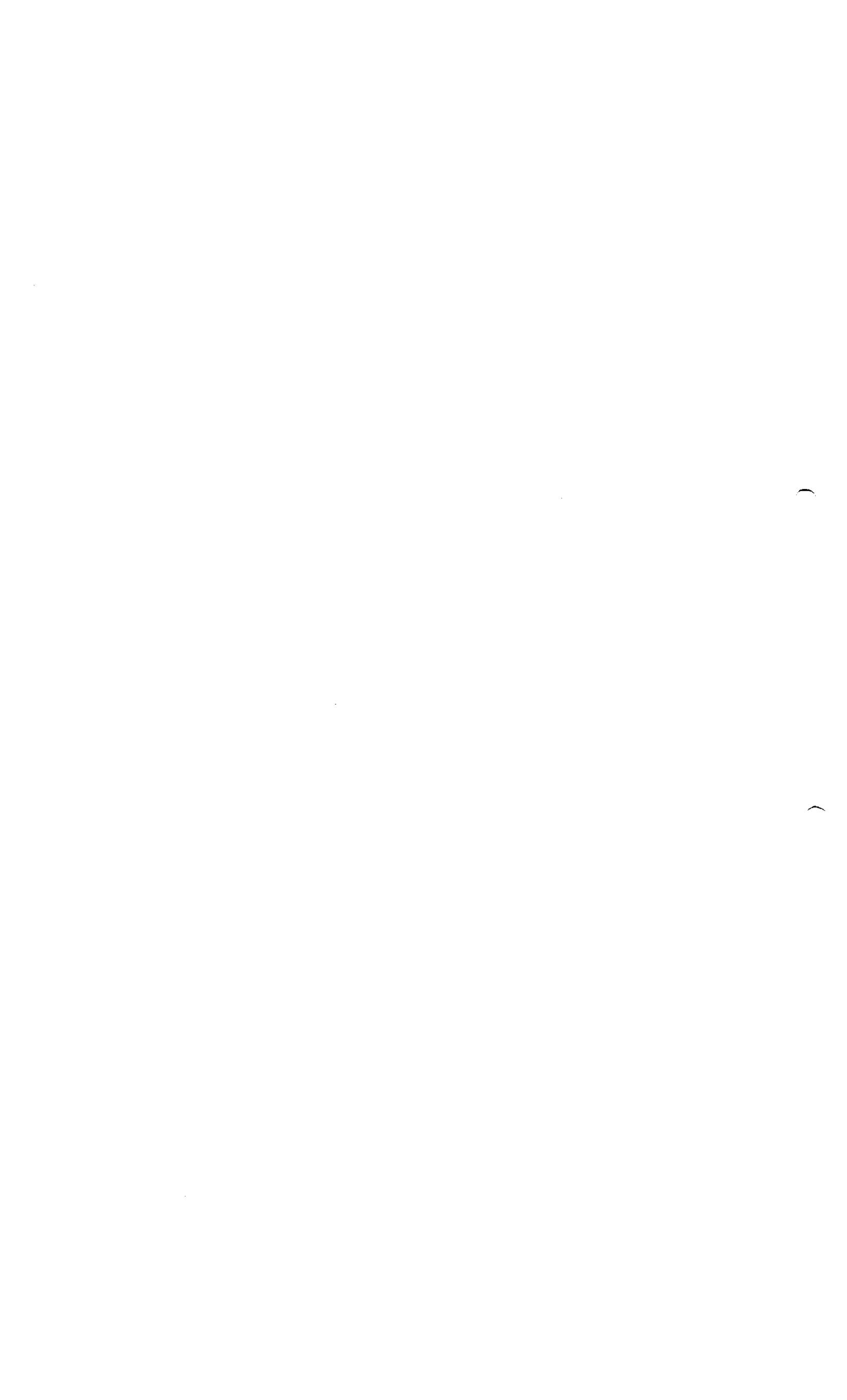
3.1.2.1 Especificidad

El diseño experimental fue (lote N° FDV01420): 3 operadores llevaron a cabo 3 series separadas. Cada serie evaluó 2 concentraciones de formaldehído residual (1 vacuna con agregado y 1 vacuna sin diluir).

3.1.2.1.1 Resultados analíticos

El dato sometido a análisis es la concentración de formaldehído residual, expresada en $\mu\text{g/mL}$.

En la Tabla 3, se resumen los resultados del estudio.



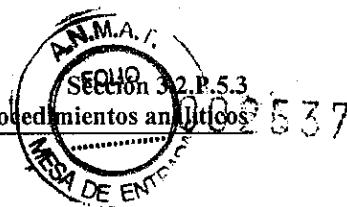


Tabla 3: Especificidad: concentraciones de formaldehído medidas frente a concentraciones teóricas (µg/mL)

Nivel	Muestra de Hexaxim		Agregado: solución de formaldehído residual		Concentración medida (µg/mL)		
	Concentración (µg/mL)	Volumen (mL)	Concentración (µg/mL)	Volumen (mL)	Serie 1	Serie 2	Serie 3
0	0,37	10	4000	0,00	0,336	0,411	0,359
+2		10		0,01	4,284	3,975	4,512

La concentración de la vacuna sin agregado es la concentración media de formaldehído residual de la vacuna sin diluir (= 0,37 µg/mL: media geométrica de 3 series descrita en el apartado 3.1.2.2.1).

3.1.2.1.2 Análisis

La especificidad se analiza por el método de agregado y recuperación.

Para estudiar la especificidad, se calcula la recuperación entre el agregado medido y el agregado teórico con la siguiente fórmula:

$$R(\text{in}\%) = \frac{(\text{measured concentration in the spiked sample} \times \text{total volume solution}) - (\text{concentration in Hexaxim batch} \times \text{volume of Hexaxim})}{\text{theoretical concentration spike} \times \text{volume of spike}} \times 100$$

Donde:

- Volumen total de la solución = volumen de Hexaxim + volumen de agregado

Tabla 4: Especificidad: porcentaje de recuperación entre el agregado medido y el agregado teórico (%)

Nivel	Porcentaje de recuperación promedio
+2	97%

En el nivel +2, el porcentaje de recuperación se encuentra entre el 80% y el 120%; el método se considera específico.

3.1.2.2 Linealidad

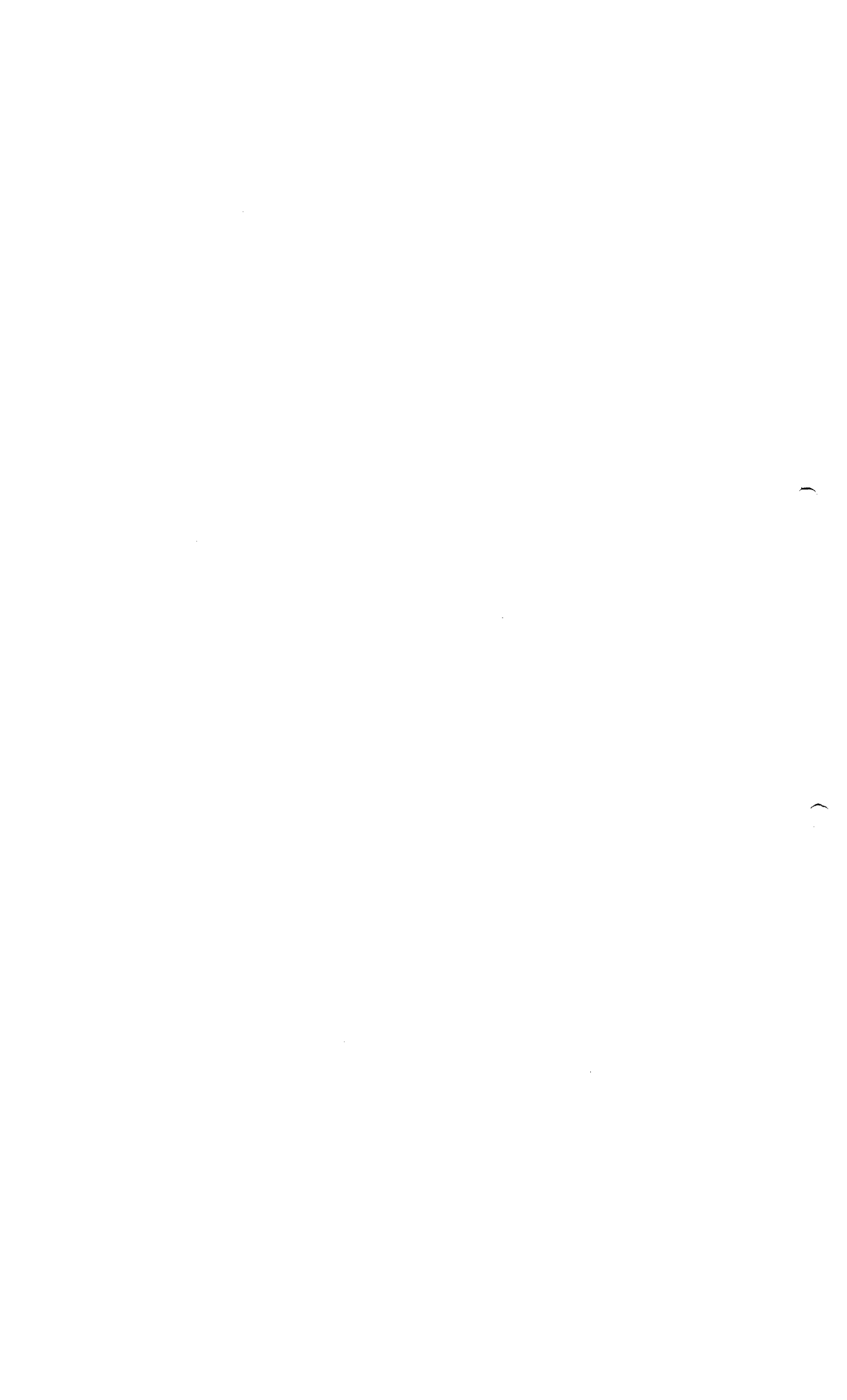
El diseño experimental fue (lote N° FDV01420): 3 operadores llevaron a cabo 3 series separadas en días diferentes. Cada serie incluía el ensayo de 6 concentraciones de formaldehído residual en la vacuna Hexaxim (1 diluida, 1 sin diluir y 4 con agregado).

3.1.2.2.1 Resultados analíticos

El dato sometido a análisis es la concentración de formaldehído residual, expresada en µg/mL. En la Tabla 5, se resumen los resultados del estudio.

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
COORDINADOR
SANOFI PASTEUR S.A.





La concentración media de formaldehído residual en la vacuna Hexaxim (nivel 0) es igual a **0,37 µg/mL** (media geométrica de las 3 series).

Por lo tanto, la concentración teórica prevista de formaldehído residual de la muestra se calcula del siguiente modo:

Theoretical expected concentration (µg/ml) =

$$\frac{[\text{concentration of sample Hexaxim } (\mu\text{g/mL}) \times \text{volume of sample Hexaxim (mL)}] + [\text{concentration of spike } (\mu\text{g/mL}) \times \text{volume of spike (mL)}]}{\text{volume of sample Hexaxim (mL)} + \text{volume of diluent H}_2\text{O (mL)} + \text{volume of spike (mL)}}$$

Donde:

- Concentración de la muestra = media geométrica de la concentración de formaldehído residual en la vacuna Hexaxim de las 3 series en µg/mL.

Ejemplo:

- En el nivel -1:

$$\text{Concentración teórica prevista} = \frac{(0.37 \times 8.7) + (0.00 \times 0.00)}{8.7 + 1.3 + 0.00} = 0,320 \mu\text{g/mL}$$

- En el nivel +2:

$$\text{Concentración teórica prevista} = \frac{(0.37 \times 10) + (4000 \times 0.01)}{10 + 0.0 + 0.01} = 4,363 \mu\text{g/mL}$$

Se obtienen los siguientes resultados:

Tabla 5: Linealidad: concentraciones medidas frente a concentraciones teóricas previstas (µg/mL)

Nivel	Muestra de Hexaxim		Agregado: solución de formaldehído residual		Diluyente: H2O	Concentración teórica prevista (µg/mL)	Concentración medida (µg/mL)		
	Concentración (µg/mL)	Volumen (mL)	Concentración (µg/mL)	Volumen (mL)	Volumen (mL)		Serie 1	Serie 2	Serie 3
-1	0,37	8,7	4000	0,00	1,3	0,320	0,292*	0,317	0,319
0		10		0,00	0,0	0,367	0,336	0,411	0,359
+1		160		0,04	0,0	1,367	1,385	1,258	1,259
+2		10		0,01	0,0	4,363	4,284	3,975	4,512
+3		10		0,03	0,0	12,330	12,584	12,400	12,549
+4		10		0,09	0,0	36,043	38,198	36,378	36,222

* La concentración de formaldehído residual se mide por extrapolación (porque la concentración es inferior al primer punto del rango de la curva).

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





3.1.2.2.2 Análisis

La linealidad en el rango seleccionado se prueba mediante los siguientes pasos, aplicados a los datos de la Tabla 5:

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

En la Tabla 6 se presenta la ecuación de la recta de regresión.

En la Figura 1 aparece el gráfico de linealidad.

Tabla 6: Linealidad - Ecuación de la recta de regresión

Ecuación de la recta de regresión	Coefficiente de determinación	Rango de linealidad en $\mu\text{g/mL}$
$Y = (-0,009 \pm 0,014) + (1,010 \pm 0,016) \cdot X$	$R^2 = 0,9991$	[0,26-43,19]
donde: X= concentración teórica ($\log(\mu\text{g/mL})$) Y = concentración medida ($\log(\mu\text{g/mL})$)		

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

$P_{\text{Falta de ajuste}} = 0,70$

El método es lineal en el rango [0,26-43,19] $\mu\text{g/mL}$.

Teniendo en cuenta el límite de cuantificación de 0,36 $\mu\text{g/mL}$, el método es lineal en el rango [0,36-43,19] $\mu\text{g/mL}$.

Se cumplen todos los criterios de aceptación; por lo tanto, el método es lineal.

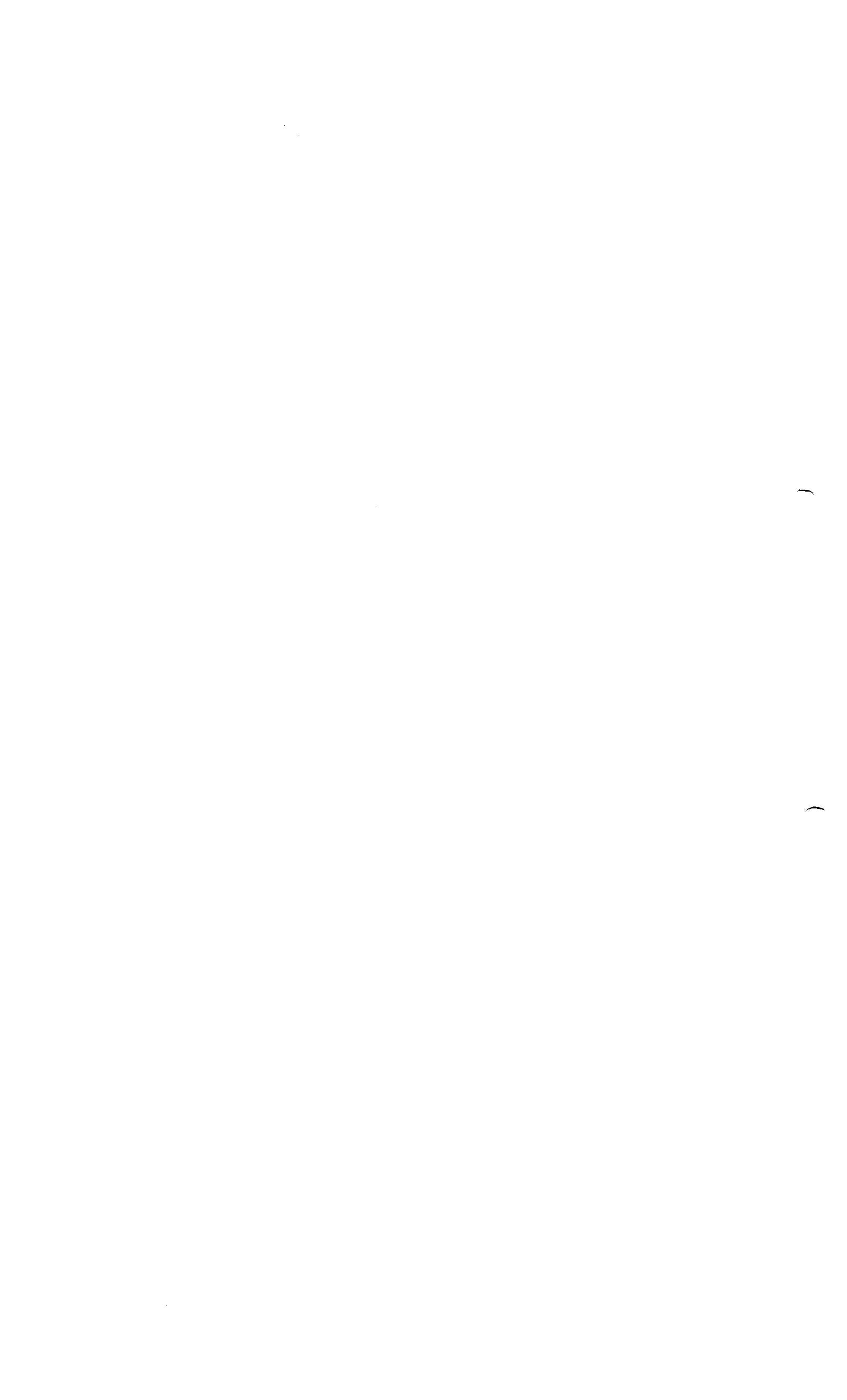
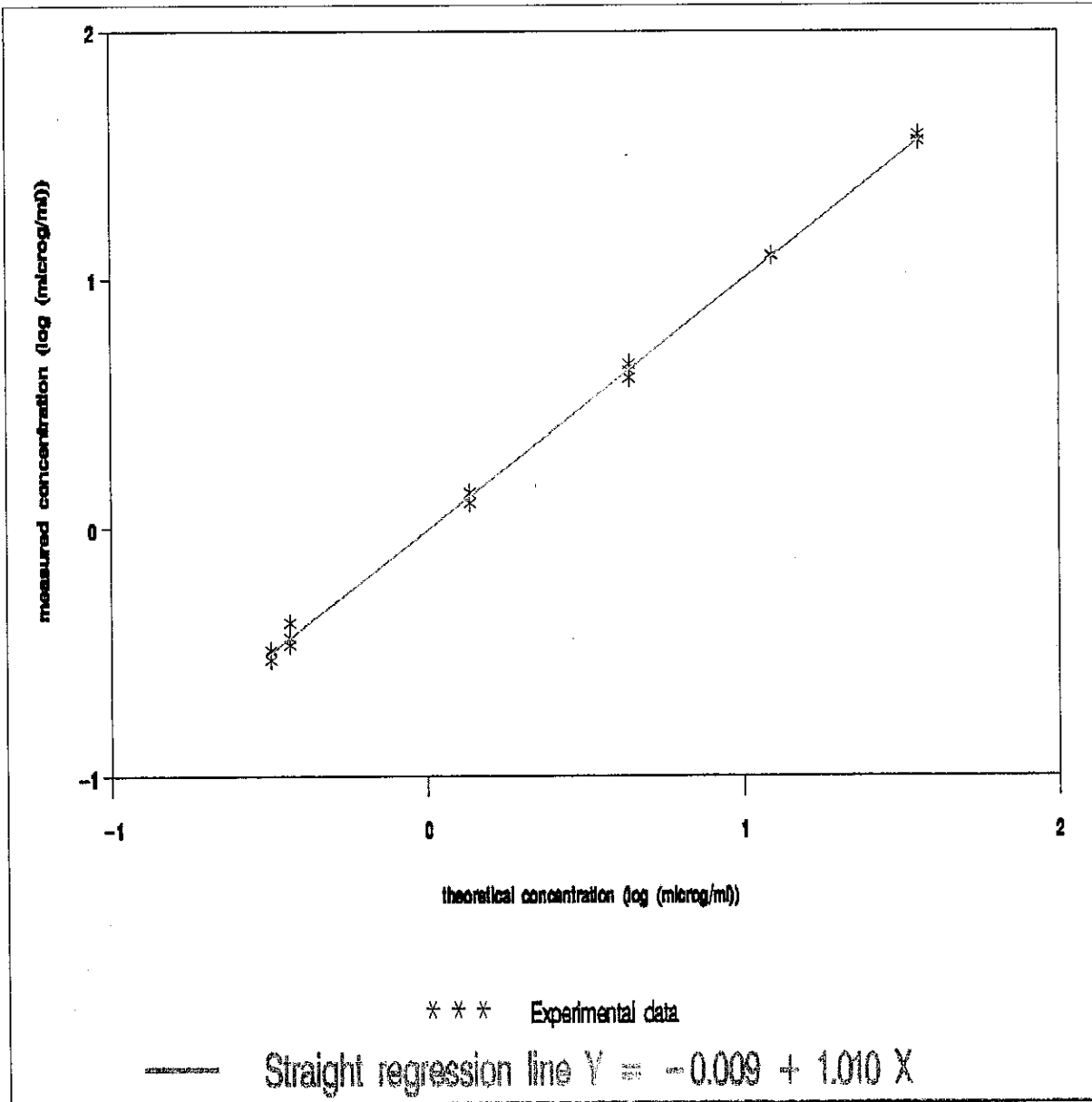


Figura 1: Gráfico de linealidad



3.1.2.3 Exactitud

Puesto que la concentración media de formaldehído residual en la vacuna Hexaxim (media geométrica de las 3 concentraciones medidas) en el nivel 0 se utiliza para calcular las concentraciones teóricas previstas, este nivel no se incluye en los cálculos de exactitud.

Por lo tanto, la exactitud se estudia en 5 niveles de concentración.





El diseño experimental fue (lote N° FDV01420): 3 operadores llevaron a cabo 3 series separadas en días diferentes. Cada serie incluía el ensayo de 6 concentraciones de formaldehído residual en la vacuna Hexaxim (1 diluida, 1 sin diluir y 4 con agregado).

3.1.2.3.1 Resultados analíticos

El dato sometido a análisis es la concentración de formaldehído residual, expresada en µg/mL. En la Tabla 5 del apartado 3.1.2.2 se resumen los resultados del estudio.

3.1.2.3.2 Análisis

La exactitud se prueba mediante los siguientes pasos, aplicados a los datos de la Tabla 5.

- Los porcentajes de recuperación se calculan para cada nivel de concentración teórica prevista y para cada grupo (media de las series);
- La homogeneidad de las varianzas intraniveles se verifica mediante la prueba de Cochran;
- La no significancia de las diferencias entre los niveles de concentración teórica prevista se demuestra mediante un análisis de varianza si la prueba de Cochran no es significativa o mediante el análisis de varianza Anova con ponderación de Welch si la prueba de Cochran es significativa;
- Cuando se comprueba la igualdad de las medias interniveles, se calcula el porcentaje de recuperación promedio con unos límites de confianza del 95 %.

Los resultados se presentan en la Tabla 7 y en la Tabla 8.

Tabla 7: Exactitud: porcentaje de recuperación promedio por concentración

Cálculo de recuperación (%):	
Concentración teórica prevista (µg/mL)	Media
0,320	97%
1,367	95%
4,363	98%
12,330	101%
36,043	102%

La prueba de Cochran muestra que las varianzas de los niveles de titulación teórica prevista son homogéneas.

El análisis de varianza permite concluir la igualdad de las medias interniveles.





Tabla 8: Exactitud: porcentaje de recuperación promedio global y límite de confianza del 95 %

Porcentaje de recuperación	Límite de confianza del 95 %
99%	[96-101]%

Puesto que el porcentaje de recuperación promedio global se encuentra entre el 90% y el 110%, el método es exacto.

3.1.2.4 Precisión

El diseño experimental fue (lote N° FDV01420 con agregado a 1,39 µg/mL):

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

Los valores se obtienen con un agregado para imitar el nivel de rutina en T0 ya que el contenido de formaldehído disminuye con el tiempo (vea la sección 3.2.P.8.3 Datos de estabilidad).

3.1.2.4.1 Resultados analíticos

El dato sometido a análisis es la concentración de formaldehído residual en la formulación de Hexaxim, expresada en µg/mL.

En la Tabla 9 se resumen los resultados del estudio.

Tabla 9: Precisión: concentración de formaldehído residual (µg/mL)

Serie 1	Serie 2	Serie 3
1,455	1,213	1,209
1,363	1,216	1,224
1,344	1,249	1,216
1,400	1,173	1,227
1,363	1,234	1,238
1,355	1,224	1,238

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





3.1.2.4.2 Análisis

La precisión del método se prueba mediante los siguientes pasos, aplicados a los datos de la Tabla 9:

- La homogeneidad de las varianzas intragrupos se verifica mediante la prueba de Cochran;
- Al adquirir la homogeneidad, se calculan los parámetros de repetibilidad y precisión intermedia.

Los resultados se presentan en la Tabla 10.

Media general = 0,105; en forma aritmética: 1,27 µg/mL.

La prueba de Cochran demuestra que las varianzas de los 3 grupos son homogéneas.

Tabla 10: Precisión: características de repetibilidad y precisión intermedia

Características	Desviación estándar relativa	Desviación estándar	Intervalo de confianza del 95 % con k=1 y n=1
Características de repetibilidad	2,17%	0,009	± 0,020; lo que equivale a x/: 1,05 en forma aritmética
Características de precisión intermedia	7,31%	0,032	± 0,067; lo que equivale a x/: 1,17 en forma aritmética

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

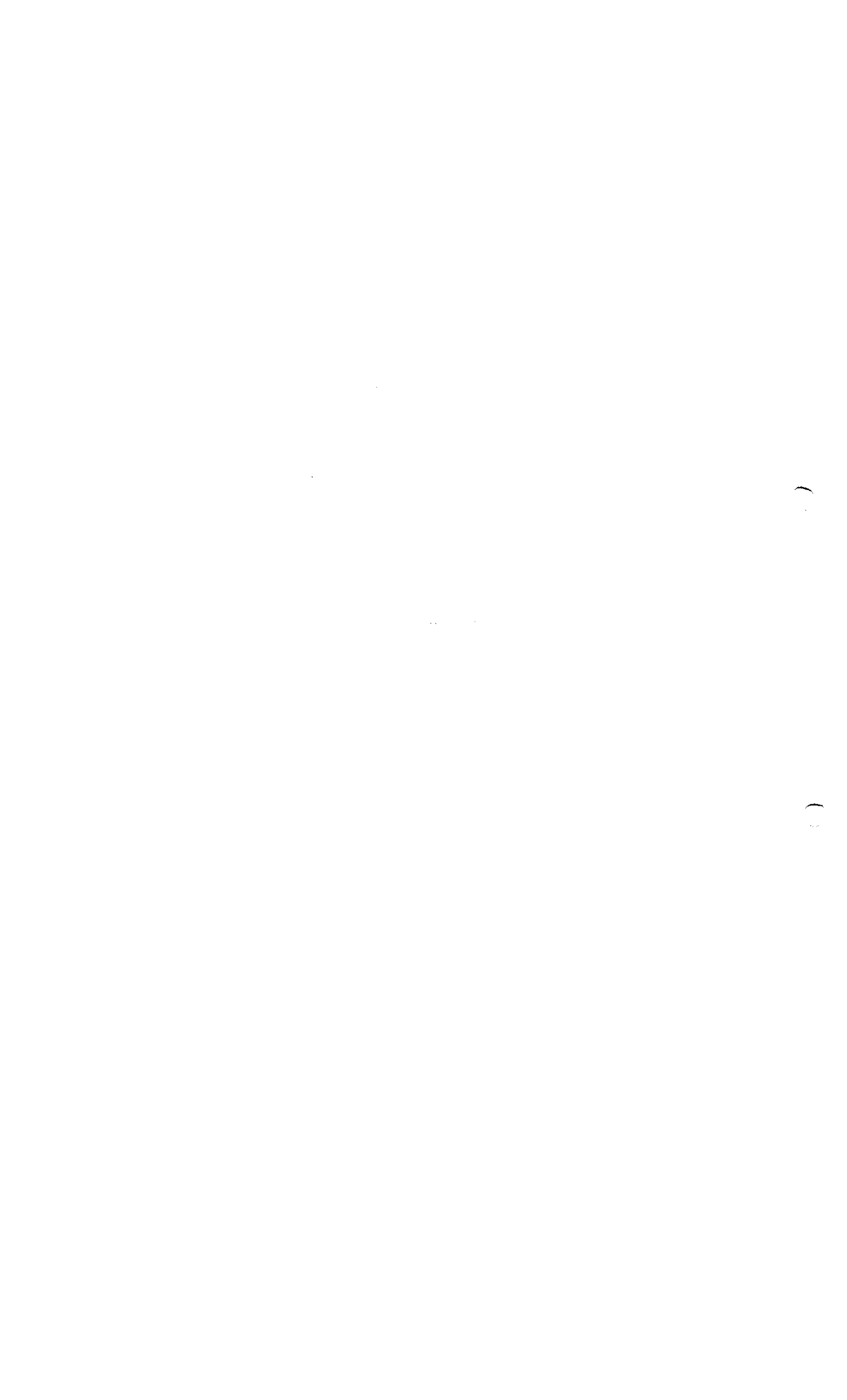
3.1.2.5 Límite de cuantificación

Se ha aplicado el diseño siguiente en el nivel -1 para determinar el límite de cuantificación (lote N° FDV01420).

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

3.1.2.5.1 Resultados analíticos

El dato sometido a análisis es la concentración de formaldehído residual, expresada en µg/mL.



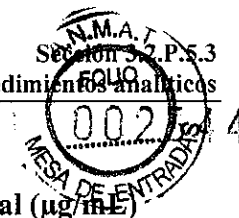


Tabla 11: Límite de cuantificación: concentraciones de formaldehído residual ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

Serie 1	Serie 2	Serie 3
0,362	0,384	0,325
0,351	0,373	0,343
0,366	0,373	0,347
0,398	0,343	0,322
0,355	0,380	0,333
0,377	0,354	0,336

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

3.1.2.5.2 Análisis

El objetivo de este estudio es demostrar la exactitud y la precisión en el nivel del límite de cuantificación.

La precisión del límite de cuantificación en este nivel se prueba mediante los siguientes pasos, aplicados a los datos de la Tabla 11:

- La homogeneidad de las varianzas intragrupos se verifica mediante la prueba de Cochran;
- Al adquirir la homogeneidad, se calculan los parámetros de repetibilidad y precisión intermedia.

La exactitud se ha demostrado en el apartado relativo a la exactitud: $\bar{R} = 97\%$.

Media global = 0,448; en forma aritmética: **0,36 $\mu\text{g}/\text{mL}$.**

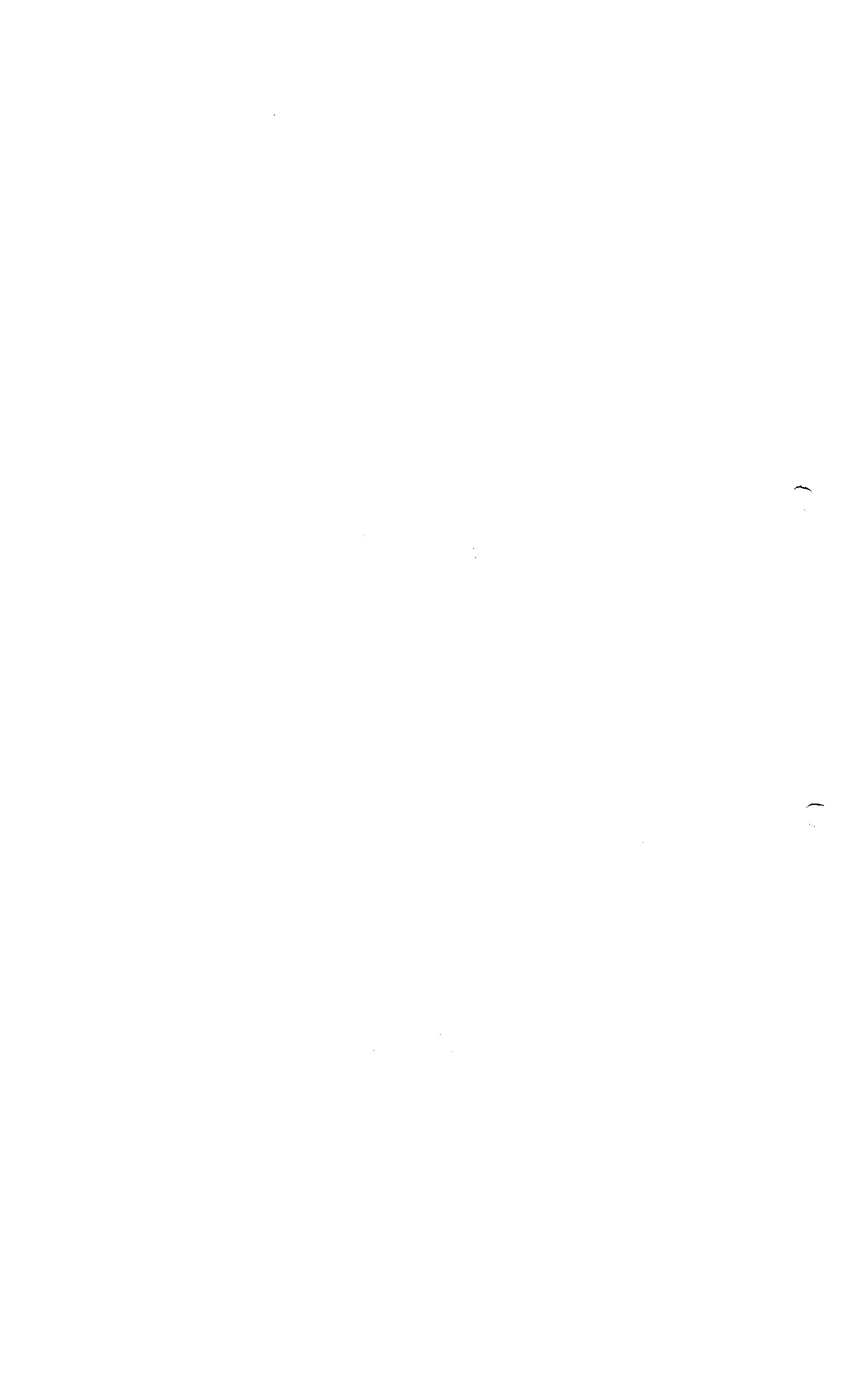
Tabla 12: Límite de cuantificación: características de repetibilidad y precisión intermedia

Características	Desviación estándar relativa	Desviación estándar	Intervalo de confianza del 95 % con $k=1$ y $n=1$
Características de repetibilidad	4,04%	0,018	$\pm 0,037$; lo que equivale a $\times/:$ 1,09 en forma aritmética
Características de precisión intermedia	6,64%	0,029	$\pm 0,061$; lo que equivale a $\times/:$ 1,15 en forma aritmética

Puesto que la recuperación media se encuentra entre el 80% y el 120% y el **intervalo de confianza del 95%** de la precisión intermedia es menor o igual que $\times/:$ 1.2, el método es preciso y exacto en el nivel de concentración de 0,36 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

3.1.3 Conclusión

- 1) El método es específico.
- 2) El método es lineal en el rango: **[0,36-43,19] $\mu\text{g}/\text{mL}$.**
- 3) Se demuestra la exactitud en el mismo rango, con una recuperación media del 99%.





- 4) La precisión se obtiene con un agregado para imitar el nivel de rutina en T0. El método es preciso dado que:
- La desviación estándar relativa de la repetibilidad y de la precisión intermedia es respectivamente 2,2% y 7,3%;
 - El intervalo de confianza del 95% de la precisión intermedia para 1 serie con 1 medición es $\times/:$ 1,17;
 - La media general es de 1,27 $\mu\text{g/mL}$.
- 5) El límite de cuantificación se define a la concentración $\text{LC} = 0,36 \mu\text{g/mL}$.
- El método es exacto y preciso en el nivel del límite de cuantificación (LC):
 - i) Exacto, con un porcentaje de recuperación igual a $\bar{R} = 97\%$
 - ii) Preciso, puesto que el intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia para 1 serie con una medición es: 1,15.

3.2 PRP no adsorbido y PRP despolimerizado

3.2.1 Panorama

Como parte de la guía de la ICH, este estudio describe la validación de la determinación del PRP no adsorbido total y el porcentaje de PRP despolimerizado mediante HPAEC-PAD en la vacuna Hexaxim en la etapa de producto final a granel.

El PRP despolimerizado se separa en primer lugar del PRP conjugado mediante ultracentrifugación. El contenido de PRP de ambas fracciones se hidroliza para formar disacárido ribosil-ribitol fosfato con hidróxido de sodio y luego se cuantifica mediante cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD).

Dado que el método es un ensayo cuantitativo, las características estudiadas son la especificidad, linealidad, exactitud, precisión y límite de cuantificación de la matriz.

Como la única diferencia entre la etapa de producto llenado y la etapa de producto final a granel es el paso de llenado, los resultados de esta validación se aplican también a la etapa de producto llenado.

Los resultados de la validación se resumen en la Tabla 13, Tabla 14 y Tabla 15.

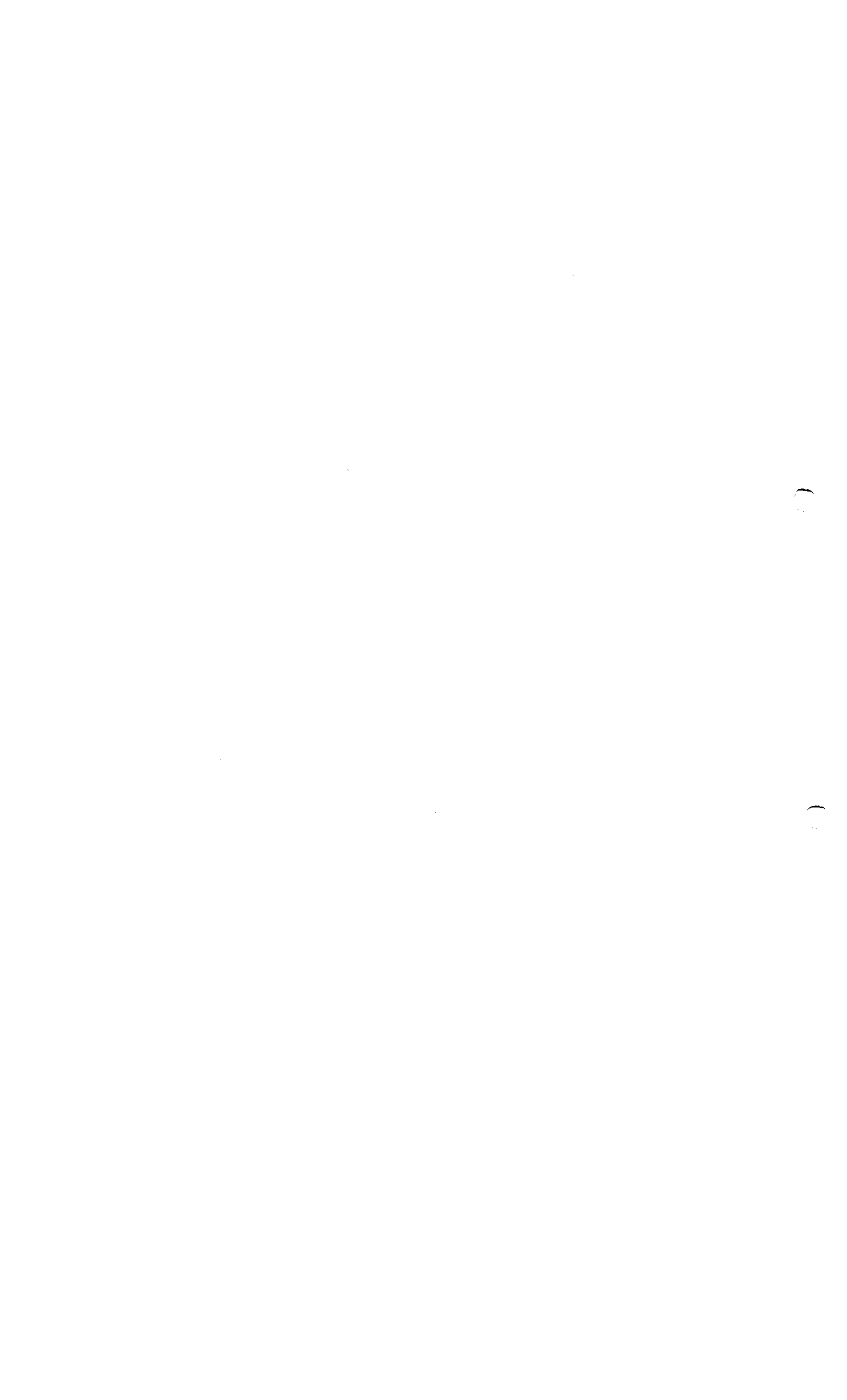




Tabla 13: Resultados de la validación: especificidad y linealidad

Características	Criterios de aceptación	Resultados
Especificidad	El porcentaje de recuperación entre la concentración medida del agregado y el agregado teórico debe hallarse entre el 80 % y el 120 %.	<p>Determinación del PRP no adsorbido total:</p> <p>Nivel +1: 103%</p> <p>Nivel +2: 102%</p> <p>Determinación del porcentaje de PRP despolimerizado:</p> <p>Nivel +1: 98%</p> <p>Nivel +2: 97%</p> <p>Nivel +3: 95%</p>
Linealidad	$P_{\text{linealidad}} \leq 0,01$ $P_{\text{Falta de ajuste}} > 0,05$ (de lo contrario, la curvatura debe ser insignificante)	<p>Determinación del PRP no adsorbido total:</p> <p>$P_{\text{linealidad}} < 0,0001$</p> <p>$P_{\text{Falta de ajuste}} = 0,97$</p> <p>$Y = 0,554 + 0,988 \cdot X$</p> <p>Donde X = concentración teórica prevista de PRP no adsorbido total ($\mu\text{g/mL}$) e Y = concentración medida de PRP no adsorbido total ($\mu\text{g/mL}$).</p> <p>$R^2 = 0,9840$ y rango de linealidad: [8,1-38,1] $\mu\text{g/mL}$</p> <p>Determinación del porcentaje de PRP despolimerizado:</p> <p>$P_{\text{linealidad}} < 0,0001$</p> <p>$P_{\text{Falta de ajuste}} = 0,90$</p> <p>$Y = 0,411 + 0,937 \cdot X$</p> <p>Donde X = concentración teórica prevista de PRP despolimerizado ($\mu\text{g/mL}$) e Y = concentración medida de PRP despolimerizado ($\mu\text{g/mL}$).</p> <p>$R^2 = 0,9925$ y rango de linealidad: [0,5-15,7] $\mu\text{g/mL}$, que equivale a [7,1-71,2]% de PRP despolimerizado</p>



Tabla 14: Resultados de la validación: exactitud y precisión en el nivel de rutina

Características	Criterios de aceptación	Resultados
Exactitud	El porcentaje de recuperación promedio calculado para los niveles de concentración teórica prevista se debe encontrar entre el 80% y el 120%.	Determinación del PRP no adsorbido total: En función del nivel de concentración, el porcentaje de recuperación promedio se sitúa entre el 101% y el 105% Determinación del porcentaje de PRP despolimerizado: En función del nivel de concentración, el porcentaje de recuperación promedio se sitúa entre 96% y 118%.
Precisión en el nivel de rutina	El intervalo de confianza del 95% de la repetibilidad debe ser: $\leq \pm 2,4 \mu\text{g/mL}$ para el PRP no adsorbido total $\leq \pm 5,3\%$ para el PRP despolimerizado El intervalo de confianza del 95% de la precisión intermedia debe ser: $\leq \pm 3,6 \mu\text{g/mL}$ para el PRP no adsorbido total $\leq \pm 7\%$ para el PRP despolimerizado	Determinación del PRP no adsorbido total: Media general: 24,2 $\mu\text{g/mL}$. Las desviaciones estándar relativas de la repetibilidad y de la precisión intermedia son respectivamente: 1,8% y 8,0%. Intervalo de confianza del 95% de la repetibilidad: $\pm 0,9 \mu\text{g/mL}$. Intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia para 1 serie con 1 medición que se realiza de manera habitual: $\pm 4,0 \mu\text{g/mL}$. Intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia para 2 series con 1 medición que se realiza de manera habitual: $\pm 2,8 \mu\text{g/mL}$. Determinación del porcentaje de PRP despolimerizado: Media general: 17,9% Las desviaciones estándar relativas de la repetibilidad y de la precisión intermedia son: 4,7% Intervalo de confianza del 95% de la repetibilidad: $\geq 1,8\%$ Intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia para 1 serie con 1 medición que se realiza de manera habitual: $\geq 1,8\%$ Intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia para 2 series con 1 medición que se realiza de manera habitual: $\geq 1,2\%$

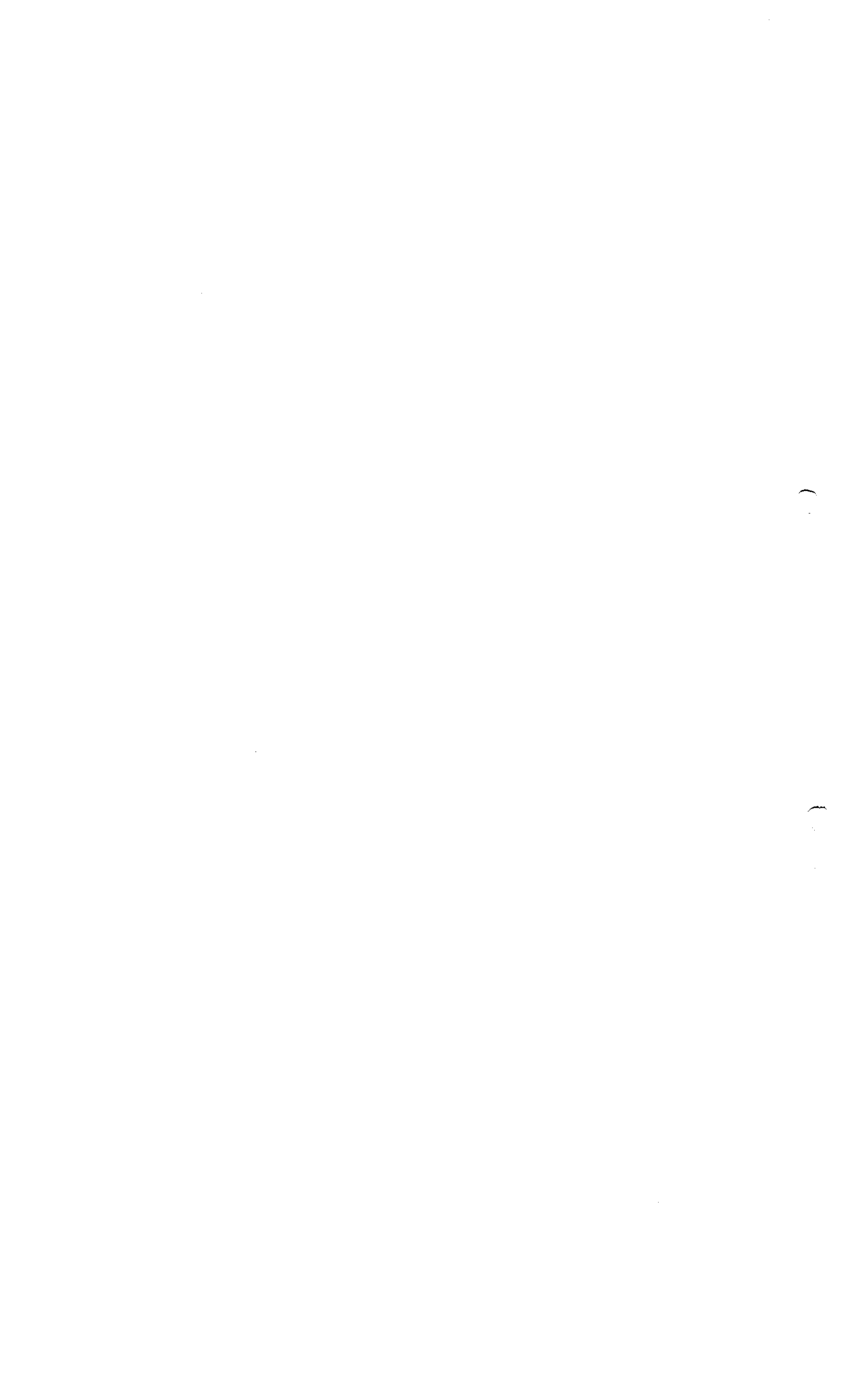




Tabla 15: Resultados de la validación: límite de cuantificación

Características	Criterios de aceptación	Resultados
Límite de cuantificación en la matriz	<p>El intervalo de confianza del 95% de la repetibilidad debe ser: $\leq \pm 1,5\%$ para el PRP despolimerizado</p> <p>El intervalo de confianza del 95% de la precisión intermedia debe ser: $\leq \pm 2\%$ para el PRP despolimerizado</p>	<p>El límite de cuantificación en la matriz es: $LC = 7,1\%$</p> <p>Porcentaje de recuperación promedio en el límite de cuantificación: 118%</p> <p>Las desviaciones estándar relativas de la repetibilidad y de la precisión intermedia son respectivamente: 7,1% y 7,2%</p> <p>Intervalo de confianza del 95% de la repetibilidad: $\geq 1,1\%$</p> <p>Intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia para 1 serie con 1 medición que se realiza de manera habitual: $\pm 1,1\%$</p> <p>Intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia para 2 series con 1 medición que se realiza de manera habitual: $\pm 0,8\%$</p>

Como conclusión, el método es específico, lineal, exacto y preciso para 2 series con 1 medición que se realiza de manera habitual y el límite de cuantificación de 7,1% de PRP despolimerizado es exacto y preciso.

El método con HPAEC-PAD es válido para determinar el PRP no adsorbido total y el porcentaje de PRP despolimerizado en la etapa de producto final a granel.

La validación en la etapa de producto final a granel cubre la etapa de producto llenado.

3.2.2 Resultados

3.2.2.1 Especificidad

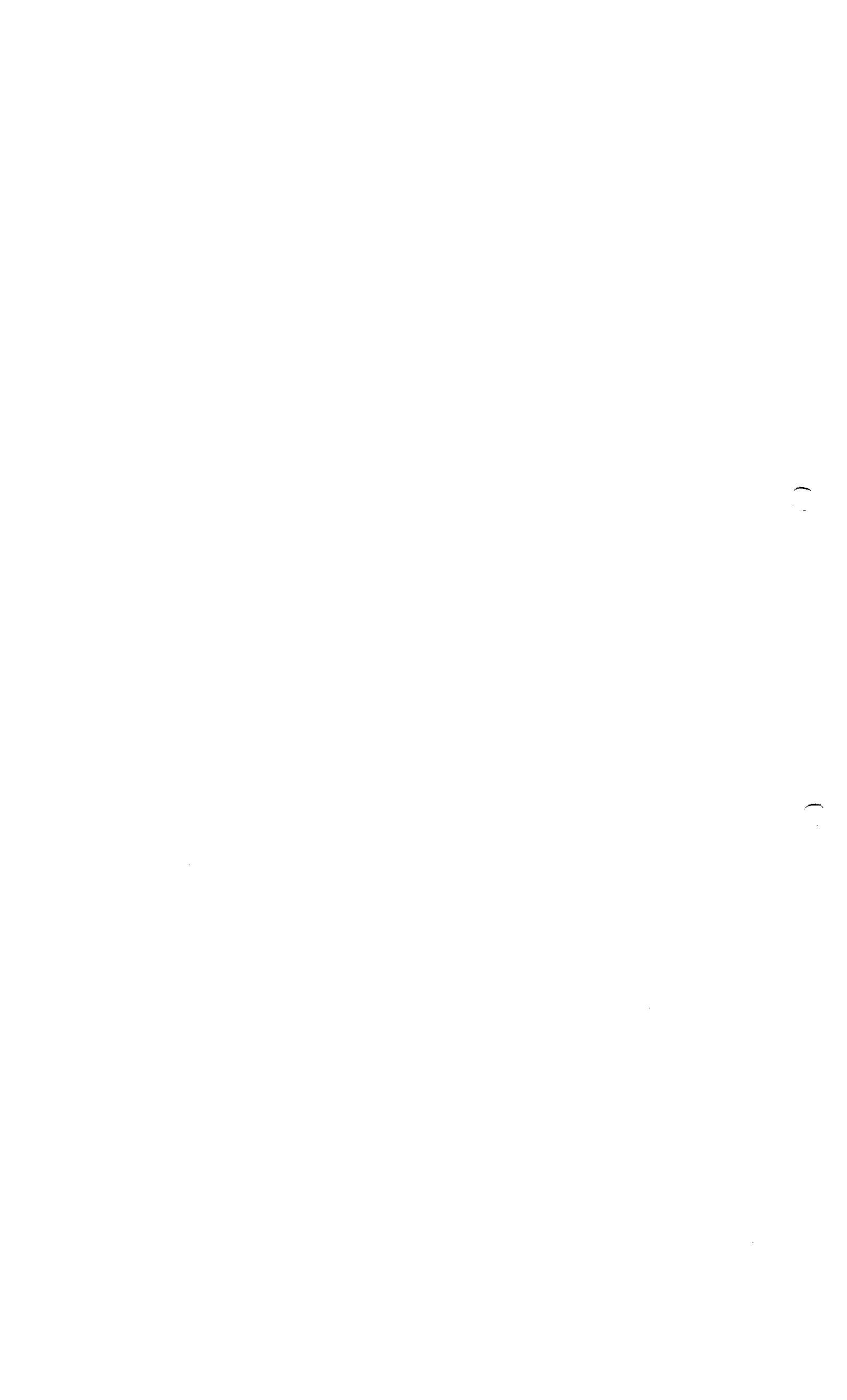
El diseño experimental fue el siguiente: 2 operadores realizaron 3 series separadas en días diferentes. Para el PRP no adsorbido total, cada serie incluía el ensayo de un rango de 5 concentraciones (2 vacunas diluidas, 1 vacuna sin diluir y 2 vacunas con agregado).

Para el porcentaje de PRP despolimerizado, cada serie incluía el ensayo de un rango de 6 concentraciones (2 vacunas diluidas, 1 vacuna sin diluir y 3 vacunas con agregado).

3.2.2.1.1 Resultados analíticos

El dato sometido a análisis es la concentración de PRP no adsorbido total, expresada en $\mu\text{g/mL}$.

En la Tabla 16 se resumen los resultados del estudio.





3.2.2.1.1.1 Determinación del PRP no adsorbido total

Tabla 16: Especificidad: concentraciones medidas frente a concentraciones teóricas (µg/mL) - PRP no adsorbido total

Nivel	Vacuna Hexaxim		Solución PRPT		Concentración teórica prevista	Concentración medida		
	Concentración (µg/mL)	Volumen (mL)	Concentración (µg/mL)	Volumen (mL)		Serie 1	Serie 2	Serie 3
0	22,0154	/	175	/	22,0154	22,4319	21,3801	22,2341
+1		1		0,040	27,8994	29,1782	27,8767	27,2178
+2		1		0,090	34,6471	37,5867	33,0340	34,1202

La concentración de la vacuna sin agregado es la concentración media de PRP no adsorbido total de la vacuna sin diluir (= 22,0154 µg/mL: media de las 3 series).

3.2.2.1.1.2 Determinación del porcentaje de PRP despolimerizado

Tabla 17: Especificidad: concentraciones medidas frente a concentraciones teóricas (µg/mL) - PRP despolimerizado

Nivel	Vacuna Hexaxim		Solución PRP-AH		Concentración teórica prevista	Concentración medida		
	Concentración (µg/mL)	Volumen (mL)	Concentración (µg/mL)	Volumen (mL)		Serie 1	Serie 2	Serie 3
0	4,1576	/	150	/	4,1576	4,3341	4,2302	3,9084
+1		1		0,025	7,7147	8,0813	7,3699	7,5162
+2		1		0,050	11,1024	11,4548	10,6533	10,6438
+3		1		0,080	14,9607	15,6000	13,4223	14,5124

La concentración de la vacuna sin agregado es la concentración media de PRP no adsorbido total de la vacuna sin diluir (= 4,1576 µg/mL: media de las 3 series).

3.2.2.1.2 Análisis

3.2.2.1.2.1 Determinación del PRP no adsorbido total

La especificidad se analiza por el método de agregado y recuperación.

Para estudiar la especificidad, se calcula la recuperación entre el agregado medido y el agregado teórico con la siguiente fórmula:

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

