



Tabla 71: Resultados de la validación: Linealidad

Características	Criterios de aceptación	Resultados
Linealidad	$P_{\text{linealidad}} \leq 0,01$ $P_{\text{Falta de ajuste}} > 0,05$ (de lo contrario, la curvatura debe ser insignificante)	Tipo 1: $P_{\text{linealidad}} < 0,0001$ $P_{\text{Falta de ajuste}} = 0,41$ $Y = -0,001 + 0,994. X$ Donde X = concentración teórica prevista del antígeno D (log(UD/mL)) e Y = concentración medida del antígeno D (log(UD/mL)). $R^2 = 0,9962$ Rango de linealidad: [23,4-119,1] UD/mL
		Tipo 2: $P_{\text{linealidad}} < 0,0001$ $P_{\text{Falta de ajuste}} < 0,05$ Pero la curvatura es insignificante (Bliss) $Y = -0,132 + 1,096. X$ Donde X = concentración teórica prevista del antígeno D (log(UD/mL)) e Y = concentración medida del antígeno D (log(UD/mL)). $R^2 = 0,9949$ Rango de linealidad: [5,4-28,6] UD/mL
		Tipo 3: $P_{\text{linealidad}} < 0,0001$ $P_{\text{Falta de ajuste}} = 0,12$ $Y = -0,108 + 1,057. X$ Donde X = concentración teórica prevista del antígeno D (log(UD/mL)) e Y = concentración medida del antígeno D (log(UD/mL)). $R^2 = 0,9975$ Rango de linealidad: [20,9-110,9] UD/mL

Tabla 72: Resultados de la validación: Exactitud

Características	Criterios de aceptación	Resultados
exactitud	El porcentaje de recuperación promedio calculado para los 4 niveles de concentración teórica prevista debe hallarse entre el 80% y el 120%.	Tipo 1: En función del nivel de concentración, el porcentaje de recuperación promedio se sitúa entre 96% y 98%
		Tipo 2: En función del nivel de concentración, el porcentaje de recuperación promedio se sitúa entre 87% y 98%
		Tipo 3: En función del nivel de concentración, el porcentaje de recuperación promedio se sitúa entre 92% y 100%

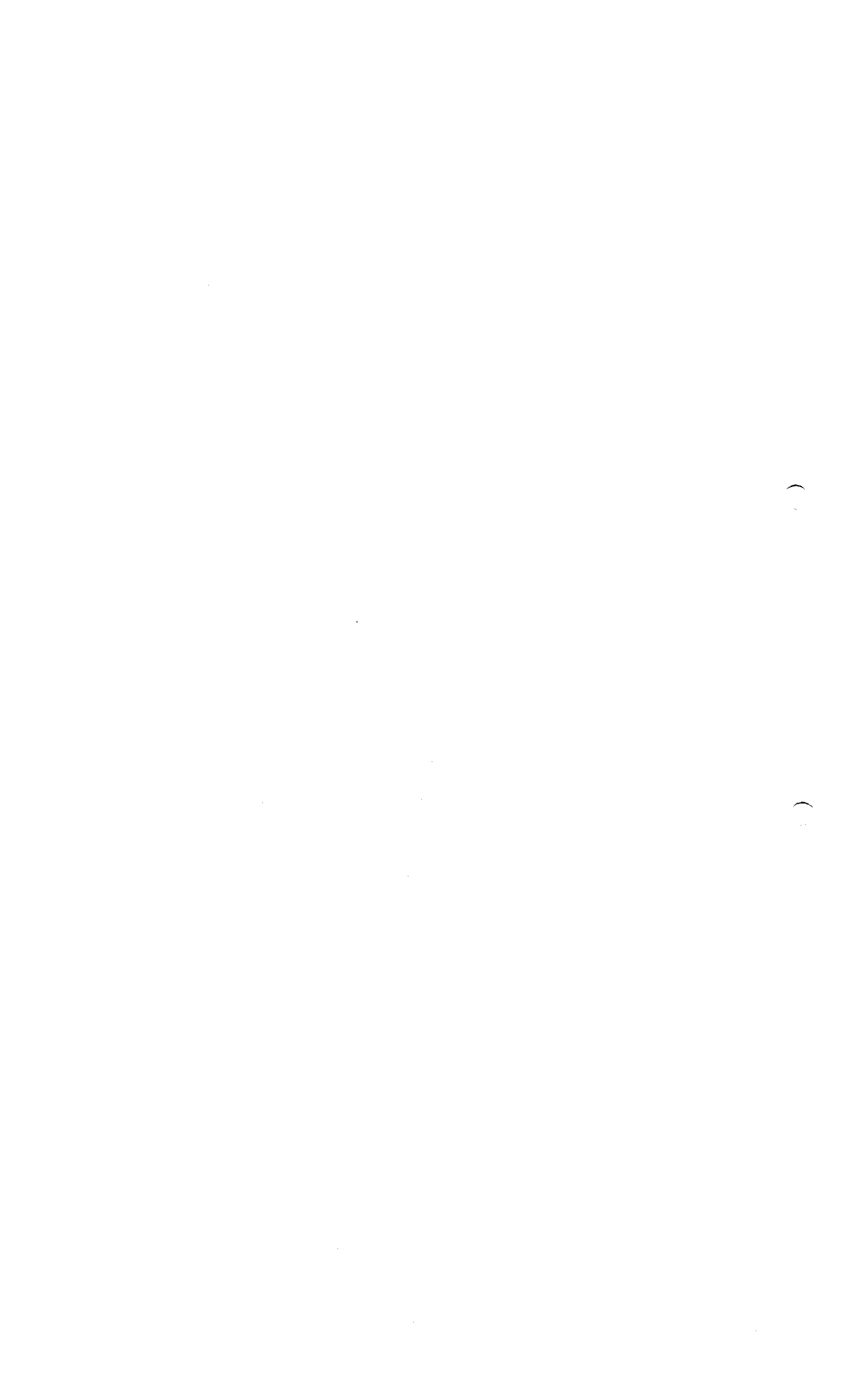




Tabla 73: Resultados de la validación: Precisión

Características	Criterios de aceptación	Resultados
precisión	<p>El intervalo de confianza del 95% de la repetibilidad para 1 serie con 1 medición debe ser igual o menor que $x/1,2$</p> <p>El intervalo de confianza del 95% de la precisión intermedia para 1 serie con 1 medición es igual o menor que $x/1,2$</p>	<p>Tipo 1:</p> <p>Media general: $\bar{m} = 1,741$ que equivale en forma aritmética a 55,1 UD/mL</p> <p>La desviación estándar relativa de la repetibilidad y de la precisión intermedia es respectivamente: 2,5% y 3,1%</p> <p>El intervalo de confianza del 95% de la repetibilidad es $\pm 0,023$, que equivale a $\times/\pm 1,05$ en forma aritmética</p> <p>El intervalo de confianza del 95% de la precisión intermedia para 1 serie con 1 medición es $\pm 0,029$, que equivale a $\times/\pm 1,07$ en forma aritmética</p>
		<p>Tipo 2:</p> <p>Media general: $\bar{m} = 1,130$ que equivale en forma aritmética a 13.5 UD/mL</p> <p>La desviación estándar relativa de la repetibilidad y de la precisión intermedia es respectivamente: 1,9% y 2,0%</p> <p>El intervalo de confianza del 95% de la repetibilidad es $\pm 0,018$, que equivale a $\times/\pm 1,04$ en forma aritmética</p> <p>El intervalo de confianza del 95% de la precisión intermedia para 1 serie con 1 medición es $\pm 0,018$, que equivale a $\times/\pm 1,04$ en forma aritmética</p>
		<p>Tipo 3:</p> <p>Media general: $\bar{m} = 695$ que equivale en forma aritmética a 49.6 UD/mL</p> <p>La desviación estándar relativa de la repetibilidad y de la precisión intermedia es respectivamente: 2,5% y 3,7%</p> <p>El intervalo de confianza del 95% de la repetibilidad es $\pm 0,023$, que equivale a $\times/\pm 1,05$ en forma aritmética</p> <p>El intervalo de confianza del 95% de la precisión intermedia para 1 serie con 1 medición es $\pm 0,033$, que equivale a $\times/\pm 1,08$ en forma aritmética</p>

El método es específico, lineal, exacto y preciso.

El método es valido para cuantificar el antígeno D por el método de líneas paralelas en la vacuna Hexaxim en la etapa de producto final a granel.

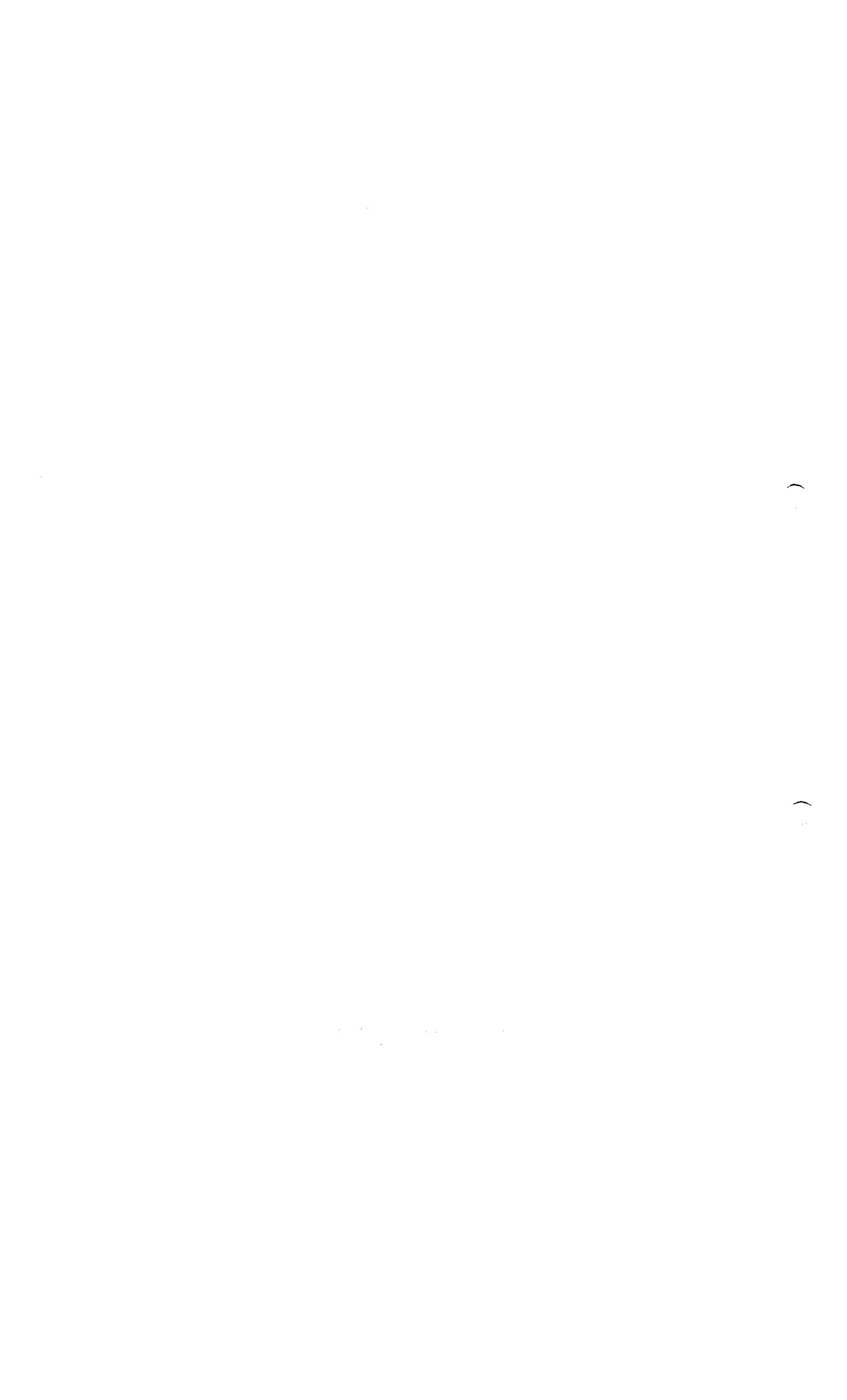
La validación en la etapa de producto final a granel cubre la etapa de producto llenado.

3.5.2 Resultados

3.5.2.1 Especificidad

El dato sometido a análisis es la densidad óptica.

En las Tabla 74, Tabla 75, Tabla 76 y Tabla 77 se resumen los resultados del estudio.





3.5.2.1.1 Especificidad intertipo

3.5.2.1.1.1 Resultados analíticos

Le especificidad intertipo ha sido validada en la etapa de cosecha sin procesar, como se describe en 3.2.S.4.3 Validación de los procedimientos analíticos. Se utilizan los mismos anticuerpos específicos en cada paso de la elaboración y la etapa de cosecha sin procesar cubre las etapas de producto final a granel y de producto llenado para la especificidad. A continuación se indican los principales resultados del estudio de especificidad intertipo.

Tabla 74: Especificidad intertipo, promedios del valor de densidad óptica (DO) del testigo del reactivo para el tipo 1

Media de los 2 valores de densidad óptica	Trivalente de control de validez FA213875		Testigo del reactivo tipo 1 FA213508		Testigo del reactivo tipo 2 FA180072		Testigo del reactivo tipo 3 FA224557	
La dilución inicial produce diluciones secundarias hasta factorial 2,5	1/2	0,7875	1/8	0,7290	1/1	0,0000	1/1	0,0000
Segunda dilución	1/5	0,6595	1/20	0,5720	1/2,5	0,0000	1/2,5	0,0000
Tercera dilución	1/12,5	0,4330	1/50	0,3520	1/6,25	0,0000	1/6,25	0,0000

Tabla 75: Especificidad intertipo, promedios del valor de densidad óptica (DO) del testigo del reactivo para el tipo 2

Media de los 2 valores de densidad óptica	Trivalente de control de validez FA213875		Testigo del reactivo tipo 1 FA213508		Testigo del reactivo tipo 2 FA180072		Testigo del reactivo tipo 3 FA224557	
La dilución inicial produce diluciones secundarias hasta factorial 2,5	1/2	0,5930	1/1	0,0000	1/5	0,6165	1/1	0,0000
Segunda dilución	1/5	0,4580	1/2,5	0,0000	1/12,5	0,4695	1/2,5	0,0000
Tercera dilución	1/12,5	0,3045	1/6,25	0,0000	1/31,25	0,2830	1/6,25	0,0000

Tabla 76: Especificidad intertipo, promedios del valor de densidad óptica (DO) del testigo del reactivo para el tipo 3

Media de los 2 valores de densidad óptica	Trivalente de control de validez FA213875		Testigo del reactivo tipo 1 FA283667		Testigo del reactivo tipo 2 FA180072		Testigo del reactivo tipo 3 FA224557	
La dilución inicial produce diluciones secundarias hasta factorial 2,5	1/2	0,5260	1/1	0,0000	1/1	0,0000	1/4	0,5070
Segunda dilución	1/5	0,4030	1/2,5	0,0000	1/2,5	0,0000	1/10	0,4130





Tercera dilución	1/12,5	0,2770	1/6,25	0,0000	1/6,25	0,0000	1/25	0,0200
------------------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	------	--------

3.5.2.1.1.2 Análisis

Los resultados son:

- Verificación por densidades ópticas positivas de que para la cosecha bruta del tipo 1: señal positiva en la placa del tipo 1 y ausencia de señal en las placas del tipo 2 y del tipo 3.
- Verificación por densidades ópticas positivas de que para la cosecha bruta del tipo 2: señal positiva en la placa del tipo 2 y ausencia de señal en las placas del tipo 1 y del tipo 3.
- Verificación por densidades ópticas positivas de que para la cosecha bruta del tipo 3: señal positiva en la placa del tipo 3 y ausencia de señal en la placa del tipo 1 y en la placa del tipo 2.

3.5.2.1.2 Especificidad intervalencia

El diseño experimental fue el siguiente: 1 operador llevó a cabo 1 serie.

La matriz de Hexaxim sin IPV (lote BB0 10.103) y un lote de PFAG (lote FDV01416) con todas las valencias de IPV se analizan como lote según la instrucción interna vigente, además del trivalente de control de validez (lote FA213875).

3.5.2.1.2.1 Resultados analíticos

Tabla 77: Especificidad intervalencia: densidades ópticas

	Trivalente de control de validez (FA213875)	Matriz de Hexaxim sin IPV (lote BBO 10.103)	PFAG de Hexaxim (sin IPV) (lote FDV01416)
Anticuerpo anti tipo 1	1,5550	-3,00 x 10 ³	1,5630
	1,5680	-1,00 x 10 ³	1,5110
Anticuerpo anti tipo 2	1,0835	3,50 x 10 ³	1,0815
	1,0765	1,50 x 10 ³	1,0175
Anticuerpo anti tipo 3	0,9485	-6,50 x 10 ³	0,9795
	0,9555	-5,50 x 10 ³	0,9835

3.5.2.1.2.2 Análisis

Para la matriz de Hexaxim sin IPV, las densidades ópticas son inferiores a los testigos, excepto para el serotipo 2. En este caso, las densidades ópticas son equivalentes al testigo, pero no inferiores a él (un poco superiores). La hipótesis es que los anticuerpos de conejo para el serotipo 2 utilizados en la prueba no han sido tratados previamente como anticuerpos de conejo para los serotipos 1 y 3 (tratamiento con anti-IgG bovina). Suponemos que la ausencia de tratamiento induce un valor inicial mayor que en los otros tipos. Por consiguiente, los resultados muestran que el método es específico.





Para el lote de PFAG de Hexaxim y el trivalente de control de validez, las densidades ópticas serán equivalentes.

El método es específico.

3.5.2.2 Linealidad

El diseño experimental fue el siguiente: 2 operadores realizaron 3 series separadas en días diferentes. Cada corrida incluía el análisis de un rango de 5 concentraciones de ensayo de antígeno D (2 vacunas diluidas, 1 vacuna sin diluir - PFAG Hexaxim lote FDV01416 - y 2 vacunas con agregado - Trivalente lote FA328827).

3.5.2.2.1 Resultados analíticos

El dato sometido a análisis es la concentración de antígeno D, expresada en UD/mL.

En la Tabla 78 se resumen los resultados del estudio.

La concentración media de antígeno D de la vacuna sin diluir es igual a 52,8 UD/mL (tipo 1), 13,6 UD/mL (tipo 2) y 48,5 UD/mL (tipo 3) (media geométrica de las 3 series). Por lo tanto, la concentración teórica prevista de antígeno D en la muestra se calcula del siguiente modo:

Theoretical expected concentration =

$$\frac{(\text{concentration of D antigen at level 0} \times \text{volume of D antigen solution}) + (\text{concentration of spike} \times \text{volume of spike})}{\text{volume of D antigen solution} + \text{volume of diluent} + \text{volume of spike}}$$

Donde:

Concentración del diluyente = 0 UD/mL

La concentración del agregado es:

- Tipo 1: 320 UD/mL;
- Tipo 2: 70 UD/mL;
- Tipo 3: 260 UD/mL.

Ejemplos:

- En el nivel -2 para el tipo 1:

$$\text{Concentración teórica prevista} = \frac{(52.8 \times 2.500) + (320 \times 0)}{2.500 + 2.500 + 0} = 26,4 \text{ UD/mL}$$

- En el nivel +2 para el tipo 1:

$$\text{Concentración teórica prevista} = \frac{(52.8 \times 3.910) + (320 \times 1.090)}{3.910 + 0 + 1.090} = 111,1 \text{ UD/mL}$$





Se obtienen los siguientes resultados:

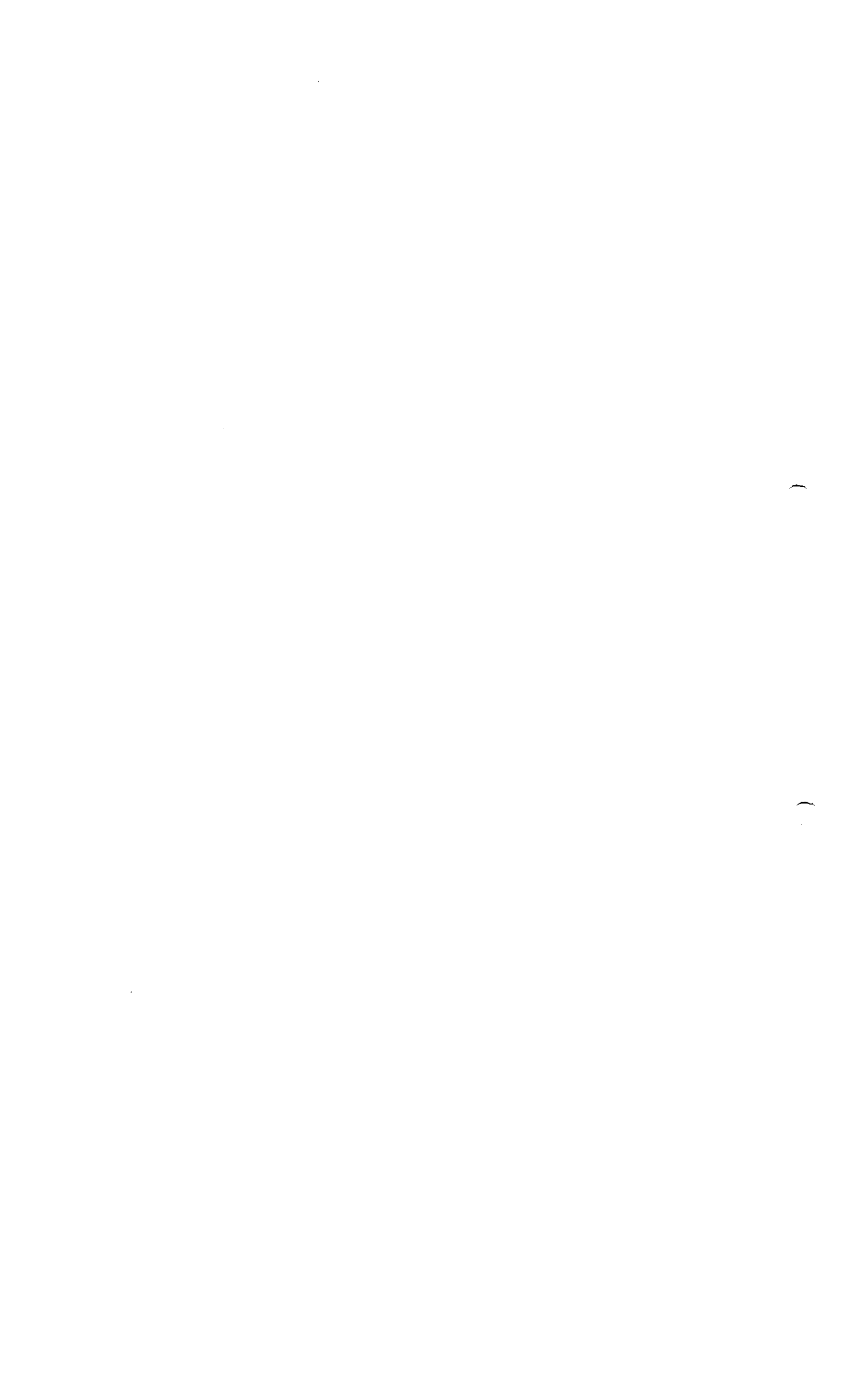
Tabla 78: Linealidad: concentraciones medidas frente a concentraciones teóricas previstas (UD/mL)

Tipo	Nivel	Solución de antígeno D (FDV01416)		Agregado de trivalente (FA328827)		Diluyente Volumen (mL)	Concentración teórica prevista (UD/mL)	Concentración medida (UD/mL)		
		Concentración (UD/mL)	Volumen (mL)	Concentración (UD/mL)	Volumen (mL)			Serie 1	Serie 2	Serie 3
Tipo 1	-2	52,8	2,500	320	0	2,500	26,4	26,4	24,6	25,2
	-1		3,545		0	1,455	37,4	37,4	37,3	35,8
	0		5,000		0	0	52,8	54,7	51,9	51,9
	+1		4,550		0,450	0	76,9	73,3	71,8	78,0
	+2		3,910		1,090	0	111,1	104,0	106,0	110,0
Tipo 2	-2	13,6	2,500	70	0	2,500	6,8	6,2	5,8	5,8
	-1		3,545		0	1,455	9,6	9,0	8,6	8,6
	0		5,000		0	0	13,6	13,4	14,2	13,2
	+1		4,570		0,430	0	18,4	17,7	17,9	18,2
	+2		3,965		1,035	0	25,3	24,4	24,8	25,3
Tipo 3	-2	48,5	2,500	260	0	2,500	24,2	21,8	22,4	22,5
	-1		3,570		0	1,430	34,6	32,7	33,4	34,1
	0		5,000		0	0	48,5	49,8	46,6	49,1
	+1		4,500		0,510	0	70,0	67,8	70,1	71,7
	+2		3,775		1,225	0	100,3	99,7	99,0	102,0

3.5.2.2.2 Análisis

La linealidad en el rango seleccionado se prueba mediante los siguientes pasos, aplicados a los datos de la Tabla 78:

- La homogeneidad de las varianzas vinculadas se verifica mediante la prueba de Cochran.
- La dependencia entre la concentración teórica prevista de antígeno D y la concentración medida de antígeno D, 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.





3.5.2.2.2.1 Resultados del tipo 1

La prueba de Cochran muestra que las varianzas de las 3 series son homogéneas.

El análisis de varianza permite concluir la significancia de la pendiente y el ajuste correcto de la regresión lineal: existe una dependencia lineal entre la concentración teórica y la concentración medida.

Tabla 79: Linealidad: ecuación de la recta de regresión (tipo 1)

Ecuación de la recta de regresión	Coefficiente de determinación (R ²)	Rango de linealidad en UD/mL
$Y = (-0,001 \pm 0,064) + (0,994 \pm 0,037) \cdot X$	$R^2 = 0,9962.$	[23,38-119,08]
donde: X= concentración teórica (log(UD/mL)) Y = concentración medida (log(UD/mL))		

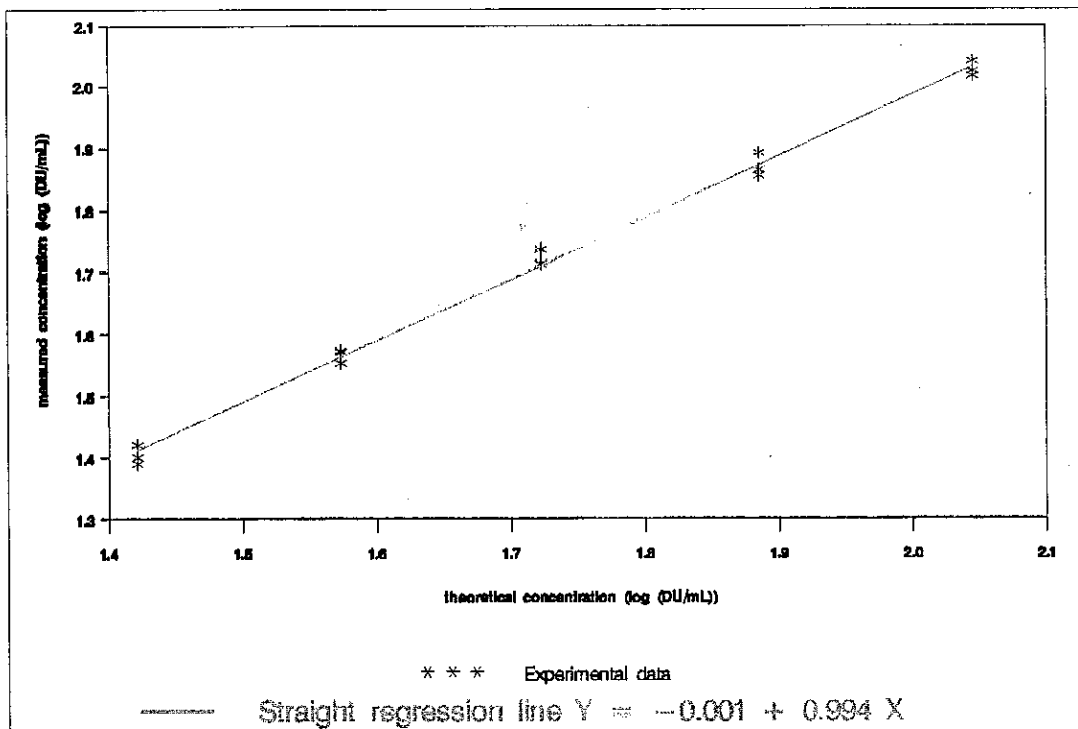
$P_{\text{linealidad}} < 0,0001$

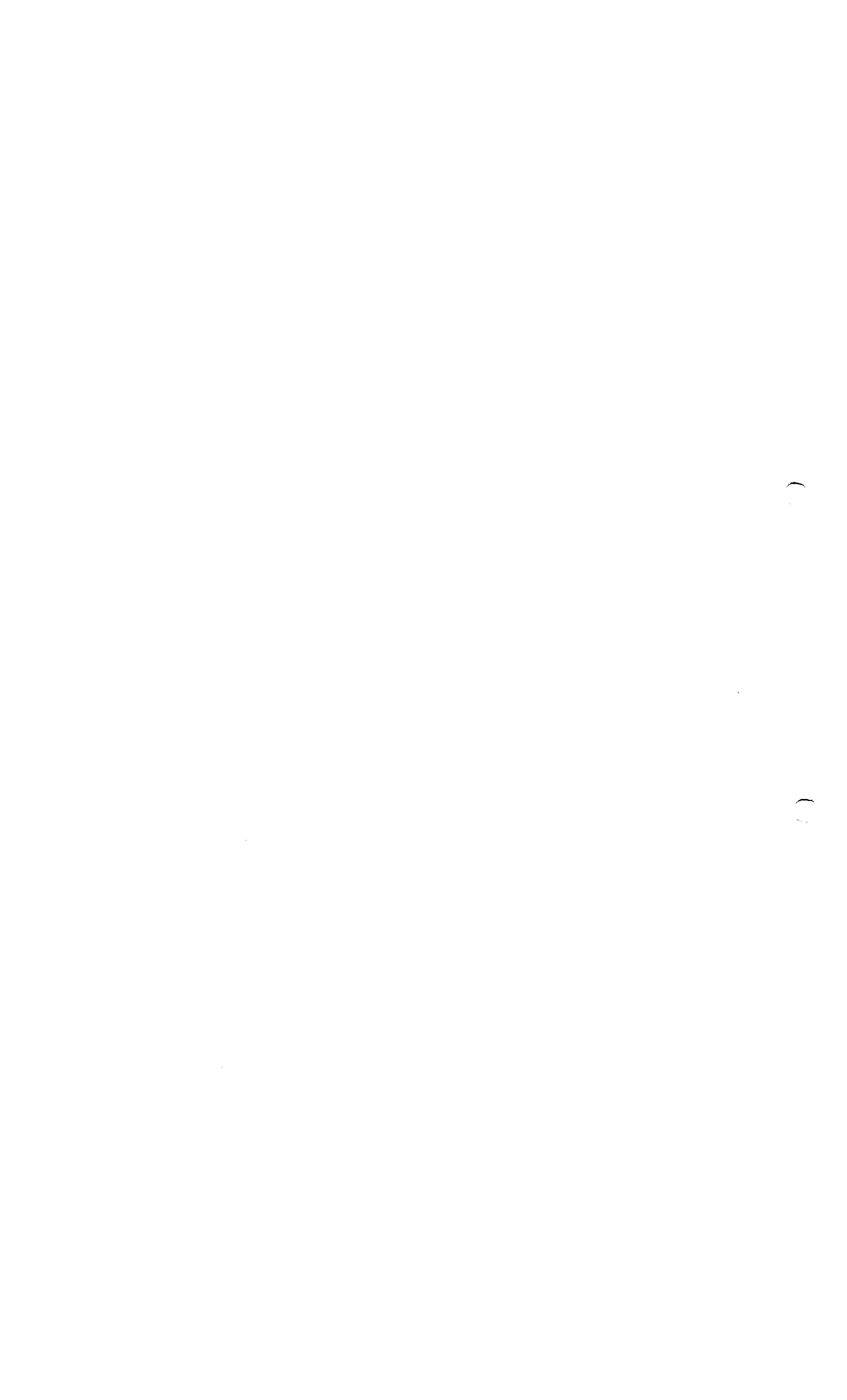
$P_{\text{Falta de ajuste}} = 0,41$

El método es lineal en el rango [23,4-119,1] UD/mL, que representa el [58-138]% de la especificación.

Se cumplen todos los criterios de aceptación; por lo tanto, el método es lineal para el tipo 1.

Figura 7: Gráfico de linealidad del tipo 1







3.5.2.2.2 Resultados del tipo 2

La prueba de Cochran muestra que las varianzas de las 3 series son homogéneas.

El análisis de varianza permite concluir la significancia de la pendiente y el ajuste correcto de la regresión lineal ya que la curvatura es insignificante con respecto a la regresión: existe una dependencia lineal entre la concentración teórica y la concentración medida.

Tabla 80: Linealidad: ecuación de la recta de regresión (tipo 2)

Ecuación de la recta de regresión	Coefficiente de determinación (R ²)	Rango de linealidad en UD/mL
$Y = (-0,132 \pm 0,054) + (1,096 \pm 0,047) \cdot X$	$R^2 = 0,9949$	[5,36-28,57]
donde: X= concentración teórica (log(UD/mL)) Y = concentración medida (log(UD/mL))		

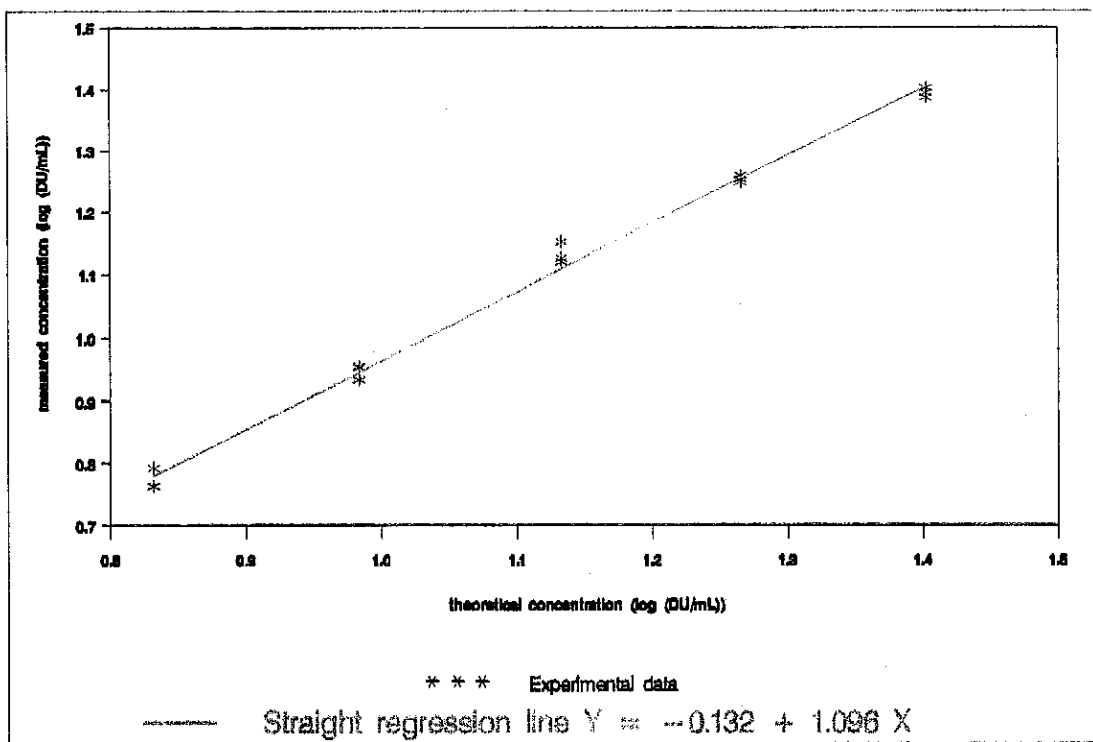
P_{linealidad} < 0,0001

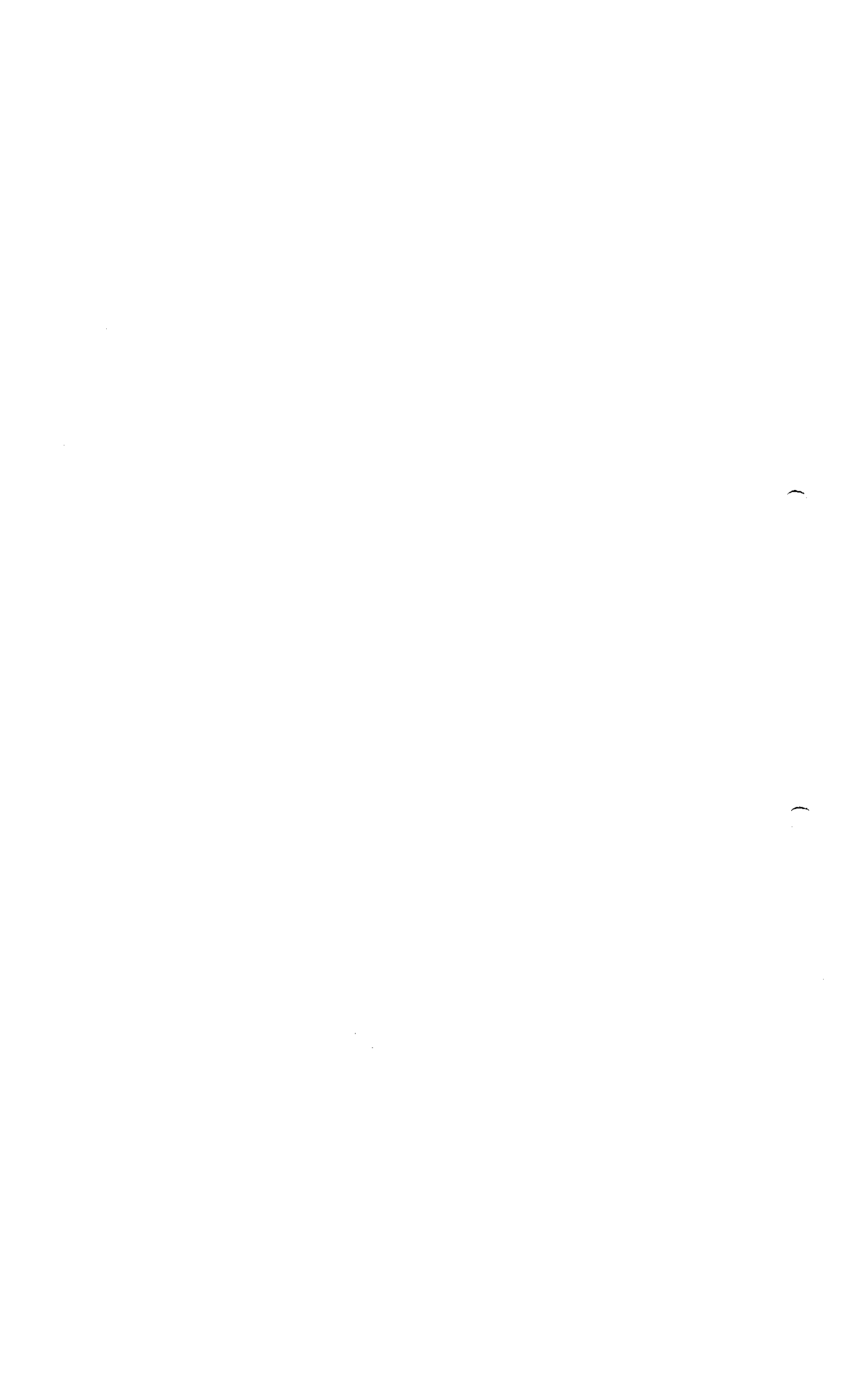
P_{Falta de ajuste} < 0,05 (pero insignificante según Bliss)

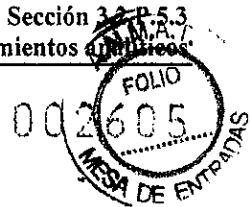
El método es lineal en el rango [5,4-28,6] UD/mL, que representa [54-159]% de la especificación.

Se cumplen todos los criterios de aceptación; por lo tanto, el método es lineal para el tipo 2.

Figura 8: Gráfico de linealidad del tipo 2







3.5.2.2.2.3 Resultados del tipo 3

La prueba de Cochran muestra que las varianzas de las 3 series son homogéneas.

El análisis de varianza permite concluir la significancia de la pendiente y el ajuste correcto de la regresión lineal: existe una dependencia lineal entre la concentración teórica y la concentración medida.

Tabla 81: Linealidad: ecuación de la recta de regresión (tipo 3)

Ecuación de la recta de regresión	Coefficiente de determinación (R ²)	Rango de linealidad en UD/mL
$Y = (-0,108 \pm 0,054) + (1,057 \pm 0,031) \cdot X$	$R^2 = 0,9975$	[20,85-110,94]
donde: X= concentración teórica (log(UD/mL)) Y = concentración medida (log(UD/mL))		

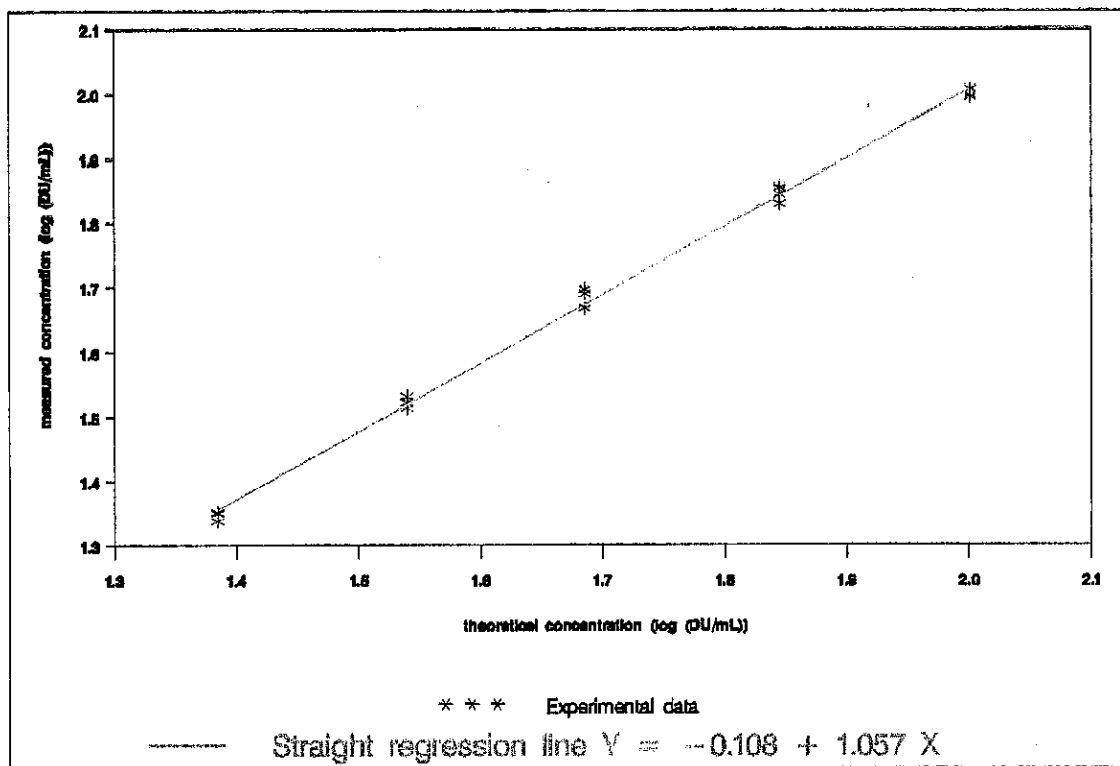
P_{linealidad} < 0,0001

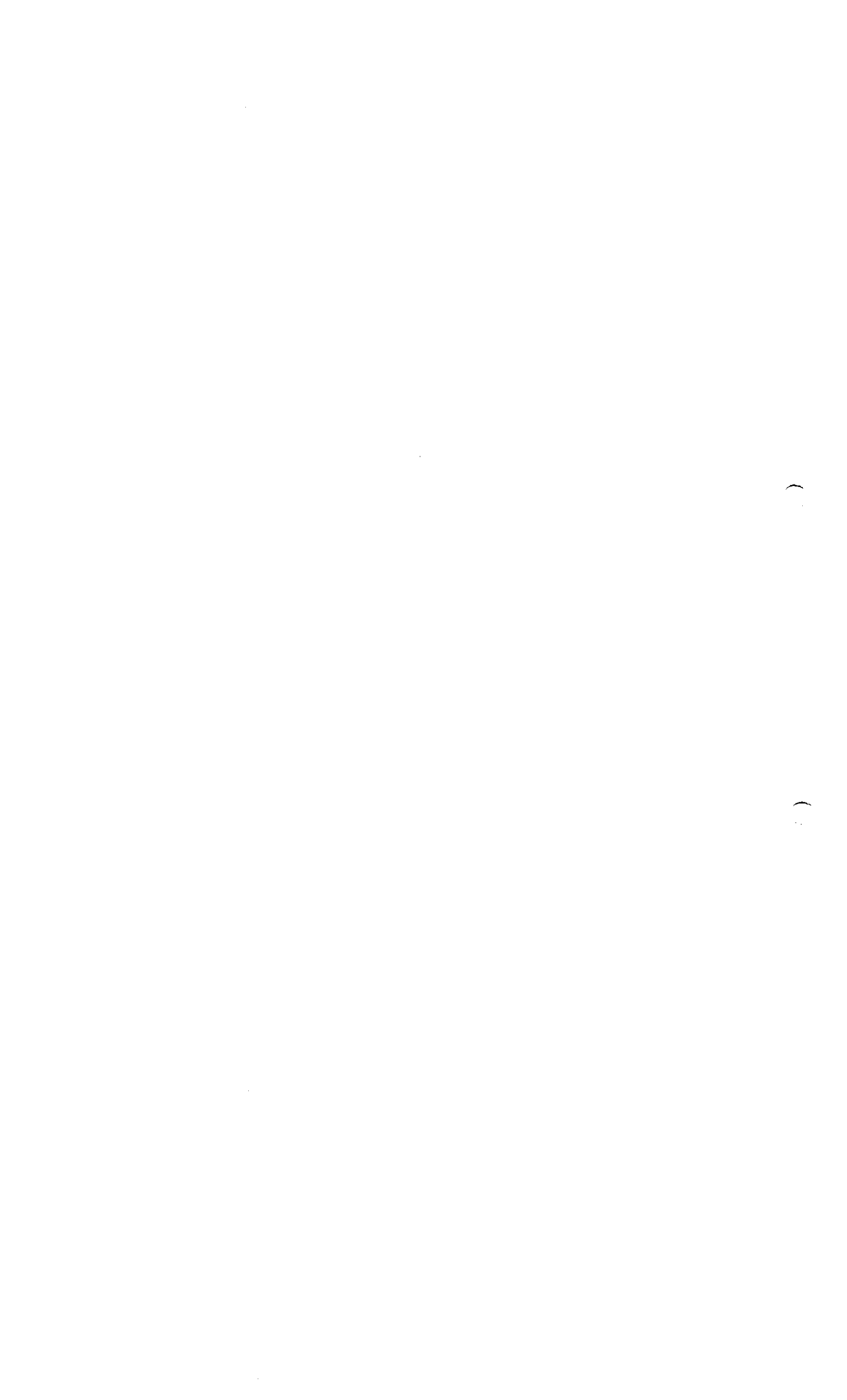
P_{Falta de ajuste} = 0,12

El método es lineal en el rango [20,9-110,9] UD/mL, que representa el [61-154]% de la especificación.

Se cumplen todos los criterios de aceptación; por lo tanto, el método es lineal para el tipo 3.

Figura 9: Gráfico de linealidad del tipo 3







3.5.2.3 Exactitud

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

Por lo tanto, la exactitud se estudia en 4 niveles de concentración.

El diseño experimental fue el siguiente: 2 operadores realizaron 3 series separadas en días diferentes. Cada serie incluía el análisis de un rango de 5 concentraciones de ensayo del antígeno D (2 vacunas diluidas, 1 vacuna sin diluir y 2 vacunas con agregado).

3.5.2.3.1 Resultados analíticos

En la Tabla 78 se resumen los resultados del estudio.

3.5.2.3.2 Análisis

La exactitud se prueba mediante los siguientes pasos, aplicados a los datos de la Tabla 75.

- 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;
- Se calcula el porcentaje de recuperación promedio por concentración.

3.5.2.3.2.1 Resultados del tipo 1

Tabla 82: Exactitud: porcentaje de recuperación promedio por concentración (tipo 1)

Cálculo de recuperación (%):	
Nivel de concentración teórica	Media
-2	96%
-1	98%
+1	97%
+2	96%

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

Puesto que el porcentaje de recuperación promedio global se encuentra entre el 80 % y el 120 %, el método es exacto para el tipo 1.





3.5.2.3.2.2 Resultados del tipo 2

Tabla 83: Exactitud: porcentaje de recuperación promedio por concentración (tipo 2)

Cálculo de recuperación (%):	
Nivel de concentración teórica	Media
-2	87%
-1	91%
+1	97%
+2	98%

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

Para cada nivel de concentración teórica, la recuperación promedio de cada nivel se halla entre el 80 % y el 120 % para el nivel 2.

3.5.2.3.2.3 Resultados del tipo 3

Tabla 84: Exactitud: porcentaje de recuperación promedio por concentración (tipo 3)

Cálculo de recuperación (%):	
Nivel de concentración teórica	Media
-2	92%
-1	97%
+1	100%
+2	100%

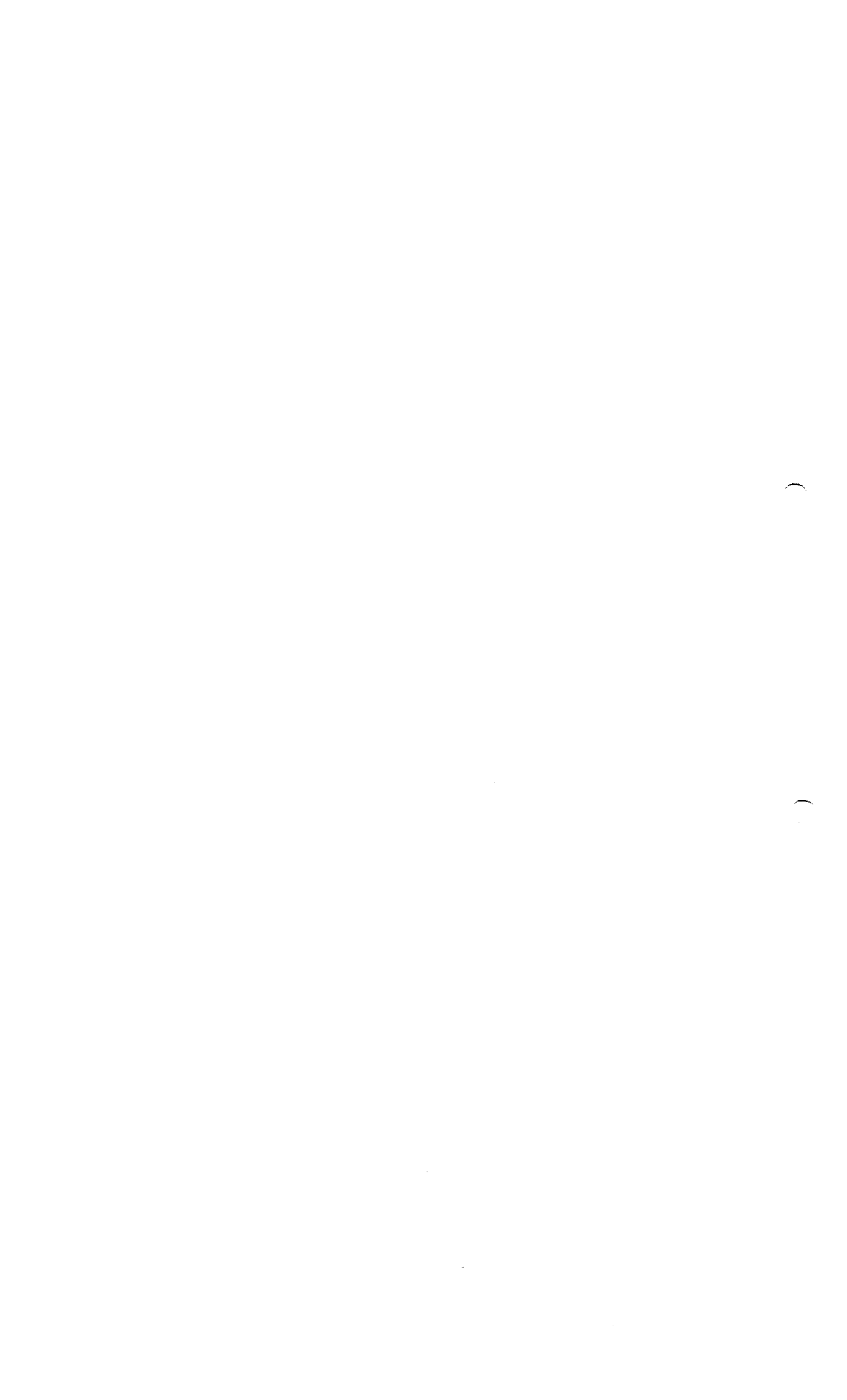
La prueba de Cochran muestra que las varianzas de los niveles de titulación teórica prevista son homogéneas.

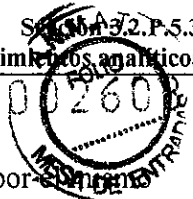
Para cada nivel de concentración teórica, la recuperación promedio de cada nivel se halla entre el 80 % y el 120 % para el tipo 3.

3.5.2.4 Precisión

El diseño experimental fue el siguiente:

- 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 2 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.

3.5.2.4.1 Resultados analíticos

El dato sometido a análisis es la concentración de antígeno D, expresada en UD/mL.

Tabla 85: Precisión: concentraciones de ensayo de antígeno D en la vacuna Hexaxim (UD/mL)

Tipo	Serie 1	Serie 2	Serie 3
Tipo 1	56,3	54,3	57,8
	56,2	53,9	59,1
	55,4	53,5	56,3
	54,0	53,7	56,2
	54,3	55,5	55,4
	54,0	53,0	53,4
Tipo 2	13,9	13,5	13,4
	13,4	13,2	13,6
	13,7	13,5	13,0
	13,7	13,8	13,5
	13,2	13,9	13,6
	13,3	13,6	13,1
Tipo 3	48,8	51,0	48,6
	49,2	50,7	47,5
	46,6	51,7	49,6
	48,4	52,7	49,7
	48,0	49,8	51,4
	47,7	49,8	51,5

3.5.2.4.2 Análisis

La precisión del método se prueba mediante los siguientes pasos, aplicados a los datos de la Tabla 85:

- 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.





3.5.2.4.2.1 Resultados del tipo 1

Media general = 1,741; que equivale en forma aritmética a 55,10 UD/mL

La prueba de Cochran muestra que las varianzas de las 3 series son homogéneas.

Tabla 86: Precisión: características de repetibilidad y precisión intermedia para tipo 1

Características	Desviación estándar relativa	Desviación estándar	Intervalo de confianza del 95 % con k=1 y n=1
Características de repetibilidad	2,5%	0,011	± 0,023; que equivale a \times/\pm 1,05 en forma aritmética
Características de precisión intermedia	3,1%	0,014	± 0,029 ; que equivale a \times/\pm 1,07 en forma aritmética

Puesto que el intervalo de confianza del 95% de la repetibilidad y el intervalo de confianza del 95% de la precisión intermedia son inferiores a $\times/$: 1,2, el método es preciso para el tipo 1.

3.5.2.4.2.2 Resultados del tipo 2

Media general = 1,130; que equivale en forma aritmética a 13,49 UD/mL

La prueba de Cochran muestra que las varianzas de las 3 series son homogéneas.

Tabla 87: Precisión: características de repetibilidad y precisión intermedia para tipo 2

Características	Desviación estándar relativa	Desviación estándar	Intervalo de confianza del 95 % con k=1 y n=1
Características de repetibilidad	1,9%	0,008	± 0,018; que equivale a \times/\pm 1,04 en forma aritmética
Características de precisión intermedia	2,0%	0,008	± 0,018; que equivale a \times/\pm 1,04 en forma aritmética

Puesto que el intervalo de confianza del 95% de la repetibilidad y el intervalos de confianza del 95% de la precisión intermedia son inferiores a $\times/$: 1,2, el método es preciso para el tipo 2.

3.5.2.4.2.3 Resultados del tipo 3

Media general = 1,695; que equivale en forma aritmética a 49,57 UD/mL

La prueba de Cochran muestra que las varianzas de las 3 series son homogéneas.

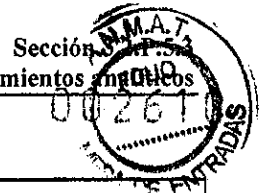
Tabla 88: Precisión: características de repetibilidad y precisión intermedia para tipo 3

Características	Desviación estándar relativa	Desviación estándar	Intervalo de confianza del 95 % con k=1 y n=1
Características de repetibilidad	2,5%	0,011	± 0,023; que equivale a \times/\pm 1,05 en forma aritmética.

Roxana Montemilone
ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

Christian Domínguez
CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
GERENTE
SANOFI PASTEUR S.A.





Características	Desviación estándar relativa	Desviación estándar	Intervalo de confianza del 95 % con k=1 y n=1
Características de precisión intermedia	3,7%	0,016	$\pm 0,033$; que equivale a $\times/\pm 1,08$ en forma aritmética.

Puesto que el intervalo de confianza del 95% de la repetibilidad y el intervalos de confianza del 95% de la precisión intermedia son inferiores a $\times/$: 1,2, el método es preciso para el tipo 3.

3.5.2.5 Conclusión

Se cumplen todos los criterios de aceptación:

El método es específico.

El método es lineal en el rango:

- Tipo 1: [23,4-119,1] UD/mL;
- Tipo 2: [5,4-28,6] UD/mL;
- Tipo 3: [20,9-110,9] UD/mL.

Se demuestra la exactitud en el mismo rango, con una recuperación promedio de:

- Tipo 1: en función del nivel de titulación, el porcentaje de recuperación promedio se sitúa entre el 96% y el 98%;
- Tipo 2: en función del nivel de titulación, el porcentaje de recuperación promedio se sitúa entre el 87% y el 98%;
- Tipo 3: en función del nivel de titulación, el porcentaje de recuperación promedio se sitúa entre 92% y 100%.

El método es preciso:

- Tipo 1:
 - El intervalo de confianza de la repetibilidad es $\times/\pm 1,05$ y el intervalo de confianza de la precisión intermedia es $\times/\pm 1,07$ para 1 serie con 1 medición;
 - La media general es de 55,1 UD/mL.
- Tipo 2:
 - El intervalo de confianza de la repetibilidad es $\times/\pm 1,04$ y el intervalo de confianza de la precisión intermedia es $\times/\pm 1,04$ para 1 serie con 1 medición;
 - La media general es de 13,5 UD/mL.
- Tipo 3:
 - El intervalo de confianza de la repetibilidad es $\times/\pm 1,05$ y el intervalo de confianza de la precisión intermedia es $\times/\pm 1,08$ para 1 serie con 1 medición;
 - La media general es de 49,6 UD/mL.





Como se demuestra arriba, el antígeno D por el método de líneas paralelas es altamente específico, lineal, exacto y preciso. El método es válido para cuantificar el antígeno D por el método de líneas paralelas en la vacuna Hexaxim en la etapa de producto final a granel.

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

4 Resúmenes de la validación de las pruebas de liberación del producto llenado

4.1 Contenido de aluminio

4.1.1 Panorama

De conformidad con la guía de la ICH y como parte de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), este informe describe la validación del contenido de aluminio en la vacuna Hexaxim en la etapa de producto llenado.

Las muestras a analizar se mineralizan en presencia de ácido sulfúrico y de ácido nítrico. El aluminio forma complejos con el EDTA en un tampón pH 4,4. El exceso de EDTA se titula con CuSO₄ en presencia de un indicador de color (PAN). El volumen necesario de EDTA para formar complejos con el aluminio en una muestra se calcula por la diferencia entre el volumen de CuSO₄ aceptado para titular el testigo y el volumen de CuSO₄ aceptado para titular la muestra. Un mililitro (1 mL) de EDTA 0,02 M corresponde a 0,5396 mg de Aluminio.

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

Los resultados de la validación se resumen en la Tabla 89 y la Tabla 90:

Tabla 89: Resultados de la validación (especificidad, linealidad y exactitud)

Características	Criterios de aceptación	Resultados
Especificidad	El porcentaje de recuperación promedio global en el nivel de agregado 2 debe estar entre el 80 % y el 120 %.	El porcentaje de recuperación para el nivel +1 es: $\bar{R} = 100\%$
Linealidad	$P_{\text{linealidad}} \leq 0,01$ $P_{\text{Falta de ajuste}} > 0,05$ (de lo contrario, la curvatura debe ser insignificante)	$P_{\text{linealidad}} < 0,0001$ $P_{\text{Falta de ajuste}} = 0,96$ $Y = 0,010 + 0,994 \cdot X$ Donde X = concentración teórica prevista (mg/mL) e Y = concentración medida (mg/mL) $R^2 = 0,9983$ Rango de linealidad: [0,54-2,28] mg/mL, que equivale a [0,27-1,14] mg/dosis
exactitud	El porcentaje de recuperación promedio global calculado para los 5 niveles de concentración teórica prevista debe hallarse entre el 80% y el 120%.	El porcentaje de recuperación promedio global y sus límites de confianza del 95 % son los siguientes: 100% [99-102]%

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINGUEZ
INGENIERO
SANOFI PASTEUR S.A.





Tabla 90: Resultados de la validación (precisión)

Características	Criterios de aceptación	Resultados
Precisión	El intervalo de confianza del 95% de la precisión intermedia debe ser $\leq \pm 0,07$ mg/dosis	Media general: 1,21 mg/mL, que equivale a 0,60 mg/dosis
		Las desviaciones estándar relativas de la repetibilidad y de la precisión intermedia son respectivamente: 1,4% y 1,7%.
		Intervalo de confianza del 95% de la precisión intermedia para 1 serie con 1 medición que se realiza de manera habitual: $\pm 0,04$ mg/mL, que equivale a $\pm 0,02$ mg/dosis

El método es específico, lineal, exacto y preciso.

El método es válido para determinar el contenido de aluminio en la vacuna Hexaxim en la etapa de producto llenado.

4.1.2 Resultados

4.1.2.1 Especificidad


El diseño experimental fue el siguiente: 3 operadores realizaron 3 series separadas en días diferentes. Cada serie incluía el ensayo de un rango de 6 concentraciones de aluminio (3 vacunas diluidas, 1 vacuna sin diluir y 2 vacunas con agregado). Solo se han tenido en cuenta las vacunas con nivel de agregado +2 y la vacuna sin diluir para el estudio de especificidad.

Para el estudio de especificidad se utilizó el lote n° FDV01420.

4.1.2.1.1 Resultados analíticos

El dato sometido a análisis es la concentración de aluminio, expresada en mg/mL.

En la Tabla 91 se resumen los resultados del estudio.


 ROXANA MONTEMILONE
 DIRECTORA TÉCNICA
 SANOFI PASTEUR S.A.



 CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
 PROCERADO
 SANOFI PASTEUR S.A.





Tabla 91: Especificidad y linealidad: concentraciones medidas frente a concentraciones teóricas (mg/mL)

Nivel	Vacuna Hexaxim		Muestra de prueba (mL)	Agregado de aluminio		Concentración teórica prevista (mg/mL)	Concentración de aluminio medida (mg/mL)		
	Concentración (mg/mL)	Volumen (mL)		Concentración (mg/mL)	Volumen (mL)		Serie		
-3	1,21	1,00	2	1	/	0,61	0,63	0,59	0,62
-2		1,36	2	1	/	0,83	0,86	0,81	0,84
-1		1,75	2	1	/	1,06	1,09	1,04	1,04
0		2,00	2	1	/	1,21	1,24	1,19	1,21
+1		2,00	2	1	0,8	1,61	1,64	1,58	1,63
+2		2,00	2	1	2	2,21	2,23	2,19	2,21

4.1.2.1.2 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:

$$\bar{R}(\%) = \left(\frac{(\text{measured conc. with spike} \times \text{test sample}) - (\text{measured conc. without spike} \times \text{volume of Hexaxim})}{\text{concentration of spike (mg/mL)} \times \text{volume of spike (mL)}} \right) \times 100$$

Donde:

- Concentración medida con o sin agregado, expresada en mg/mL;
- Muestra de prueba = 2 mL;
- Concentración de la vacuna sin agregado = media de la concentración de aluminio en la vacuna sin diluir en mg/mL;
- Concentración del agregado de aluminio = 1000 ppm, es decir 1000 µg/mL: 1 mg/mL

Tabla 92: Especificidad: porcentaje de recuperación entre el agregado medido y el agregado teórico (%)

Nivel	Porcentaje de recuperación
+2	100%

Puesto que el porcentaje de recuperación promedio se encuentra entre el 80% y el 120%, el método es específico.





4.1.2.2 Linealidad

El diseño experimental fue el siguiente: 3 operadores llevaron a cabo 3 series separadas en días diferentes. Cada serie incluía el ensayo de un rango de 6 concentraciones de aluminio (3 vacunas diluidas, 1 vacuna sin diluir y 2 vacunas con agregado).

Se utiliza el lote n° FDV01420 para el estudio de linealidad.

4.1.2.2.1 Resultados analíticos

El dato sometido a análisis es la concentración de aluminio, expresada en mg/mL.

En la Tabla 91 se resumen los resultados del estudio.

La concentración de la vacuna sin agregado es la concentración media de aluminio de la vacuna sin diluir (producto llenado) (= 1,21 mg/mL: media de las 3 series).

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

Concentración teórica prevista (mg/mL)

$$\left(\frac{(\text{conc. of sample} \times \text{test sample}) + (\text{conc. of spike of aluminium} \times \text{vol. of spike of aluminium})}{\text{Test sample at level 0}} \right)$$

Donde:

- Concentración de la muestra expresada en mg/mL = media de la concentración de aluminio en la muestra sin diluir = 1,21 mg/mL;
- Concentración del agregado de aluminio expresada en mg/mL.

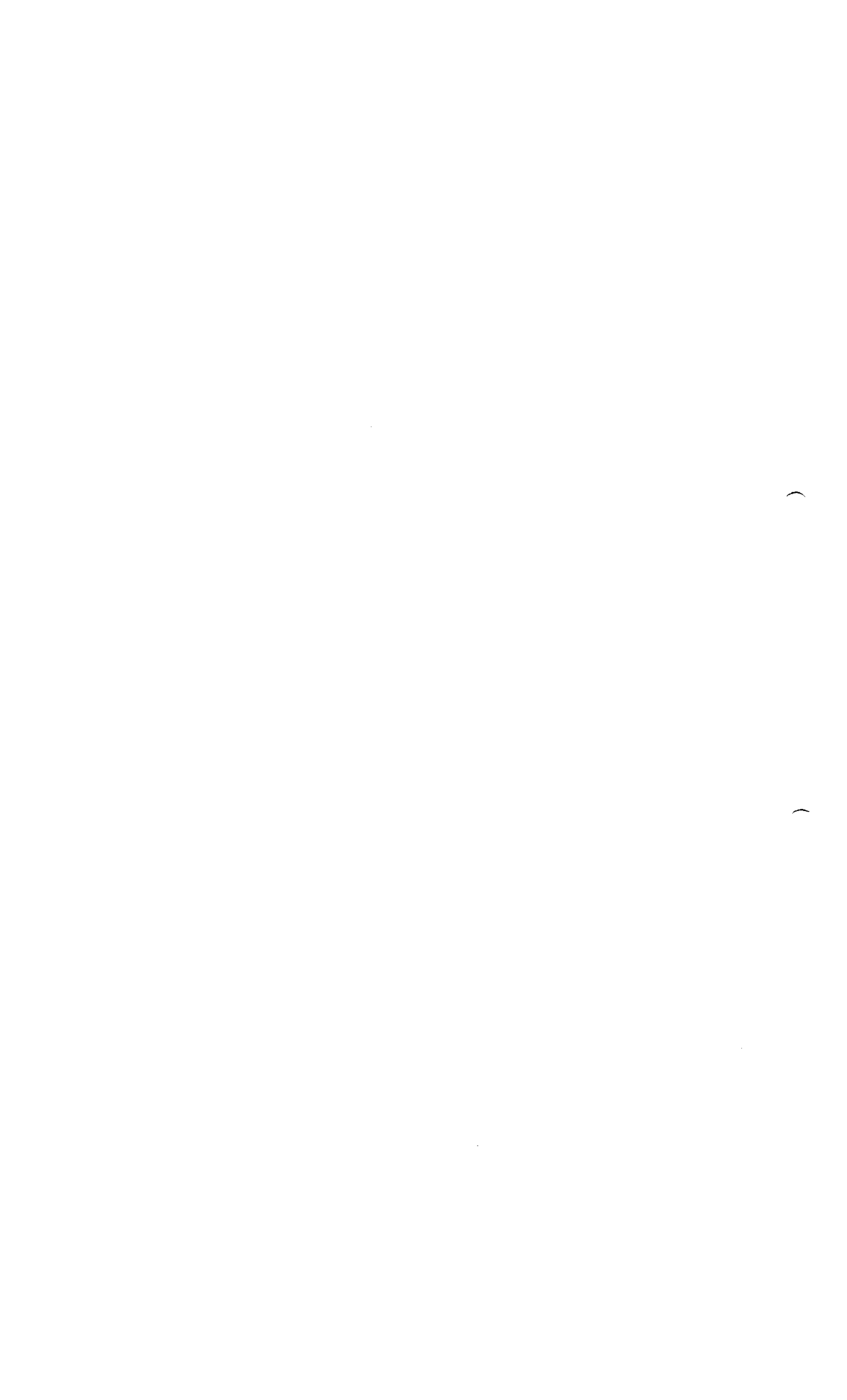
Ejemplos:

- En el nivel -1:

$$\text{Concentración teórica prevista} = \frac{(1.21 \times 1.75)}{2} = 1,061 \text{ mg/mL}$$

- En el nivel +2:

$$\text{Concentración teórica prevista} = \frac{(1.21 \times 2) + (1 \times 2)}{2} = 2,21 \text{ mg/mL}$$





4.1.2.2.2 Análisis

La linealidad en los niveles de -3 a +2 se prueba mediante los siguientes pasos, aplicados a los datos de la Tabla 91

- La homogeneidad de las varianzas vinculadas se verifica mediante la prueba de Cochran;
- La dependencia entre la concentración teórica prevista de aluminio y la concentración medida de aluminio, así como 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.

La prueba de Cochran demuestra que las varianzas son homogéneas.

Existe una dependencia lineal entre la concentración teórica prevista y la concentración medida.

Tabla 93: Ecuación de la recta de regresión

Ecuación de la recta de regresión	Coefficiente de determinación	Rango de linealidad en mg/mL
$Y = (0,010 \pm 0,029) + (0,994 \pm 0,021) \cdot X$	$R^2 = 0,9983$	[0,54-2,28]
donde: X= concentración teórica (mg/mL)		
Y = concentración medida (mg/mL)		

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

$P_{\text{Falta de ajuste}} = 0,96$

El método es lineal en el rango [0,54-2,28] mg/mL, es decir, [0,27-1,14] mg/dosis, que cubre el [68-143]% de las especificaciones.

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

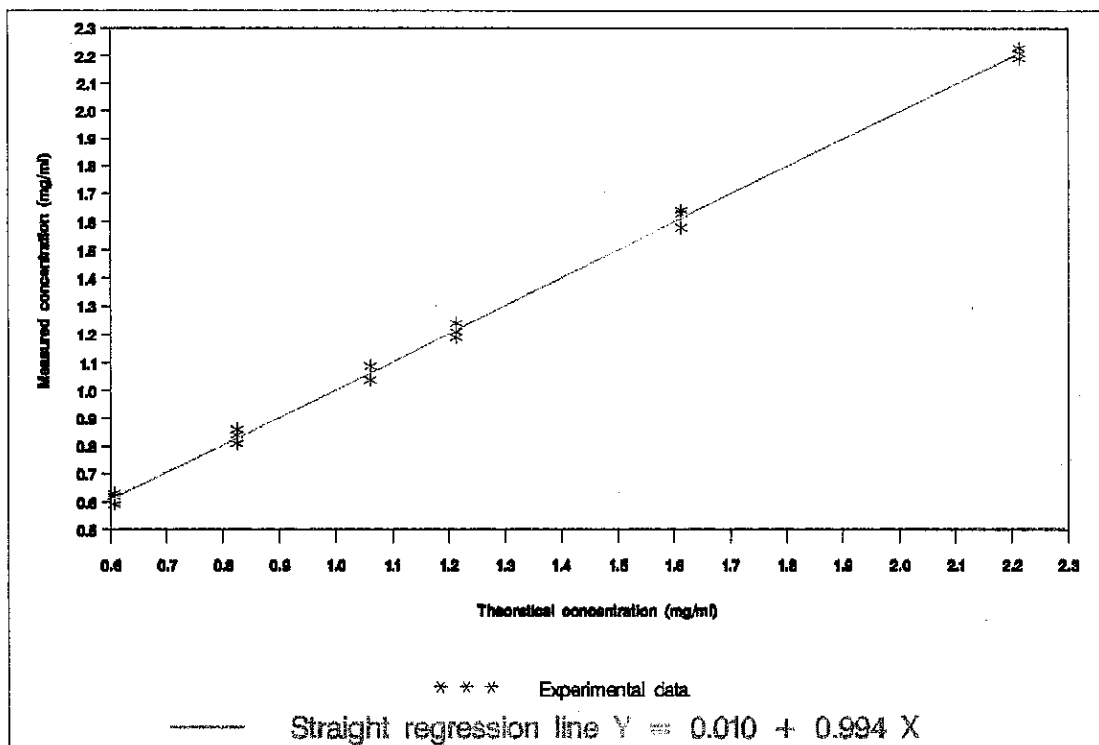
[Signature]
ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A

[Signature]
CHRISTIAN DOMINGUEZ
LICENCIADO
SANOFI PASTEUR S.A





Figura 10: Gráfico de linealidad



4.1.2.3 Exactitud

El diseño experimental fue el siguiente: 3 operadores llevaron a cabo 3 series separadas en días diferentes. Cada serie incluía el ensayo de un rango de 6 concentraciones de aluminio (3 vacunas diluidas, 1 vacuna sin diluir y 2 vacunas con agregado).

Se utiliza el lote n° FDV01420 para el estudio de exactitud.

4.1.2.3.1 Resultados analíticos

El dato sometido a análisis es la concentración de aluminio, expresada en mg/mL.

En la Tabla 91 se resumen los resultados del estudio.

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

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

