

**Tabla 27: Absorbancia del sobrenadante de la matriz de Hexaxim sin antígenos FHA frente a la absorbancia del sobrenadante de la matriz de Hexaxim**

Absorbancia establecida como umbral de detección (previamente determinado con 30 valores testigo independientes )	Absorbancia medida para el sobrenadante de la matriz de Hexaxim sin FHA	Absorbancia medida para el sobrenadante de Hexaxim ( lote de producción)
0,116	0,092	0,331

**2.2.1.3.2 Análisis**

El antígeno FHA se detecta en presencia de FHA en la muestra de Hexaxim.  
El antígeno FHA no se detecta en ausencia de FHA en la muestra de Hexaxim.

**2.2.1.4 Límite de detección**

Durante el diseño experimental se realizan 3 pruebas para comprobar que la absorbancia medida para una muestra con una concentración de 0,043 µg/mL de FHA en el sobrenadante de Hexaxim es detectable e inferior al control positivo de la prueba (2,5 µg/mL). El límite de detección se ha establecido basándose en experimentos anteriores y en los requisitos para esta prueba.

**2.2.1.4.1 Resultados analíticos**

Los resultados analíticos se presentan en la Tabla 28.

**Tabla 28: Absorbancia del sobrenadante de la matriz de Hexaxim sin antígeno FHA con agregado de 0,043 µg/mL de FHA frente a la absorbancia en el umbral de detección y la absorbancia del control positivo de FHA**


Absorbancia establecida como umbral de detección (previamente determinado con 30 valores testigo independientes )	Absorbancia medida para el sobrenadante de la matriz de Hexaxim con agregado de 0,043 µg/mL de FHA	Absorbancia medida para el control positivo de FHA de 2,5 µg/mL
0,116	0,136	2,233
	0,132	2,267
	0,134	2,367

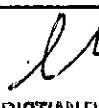
**2.2.1.4.2 Análisis**

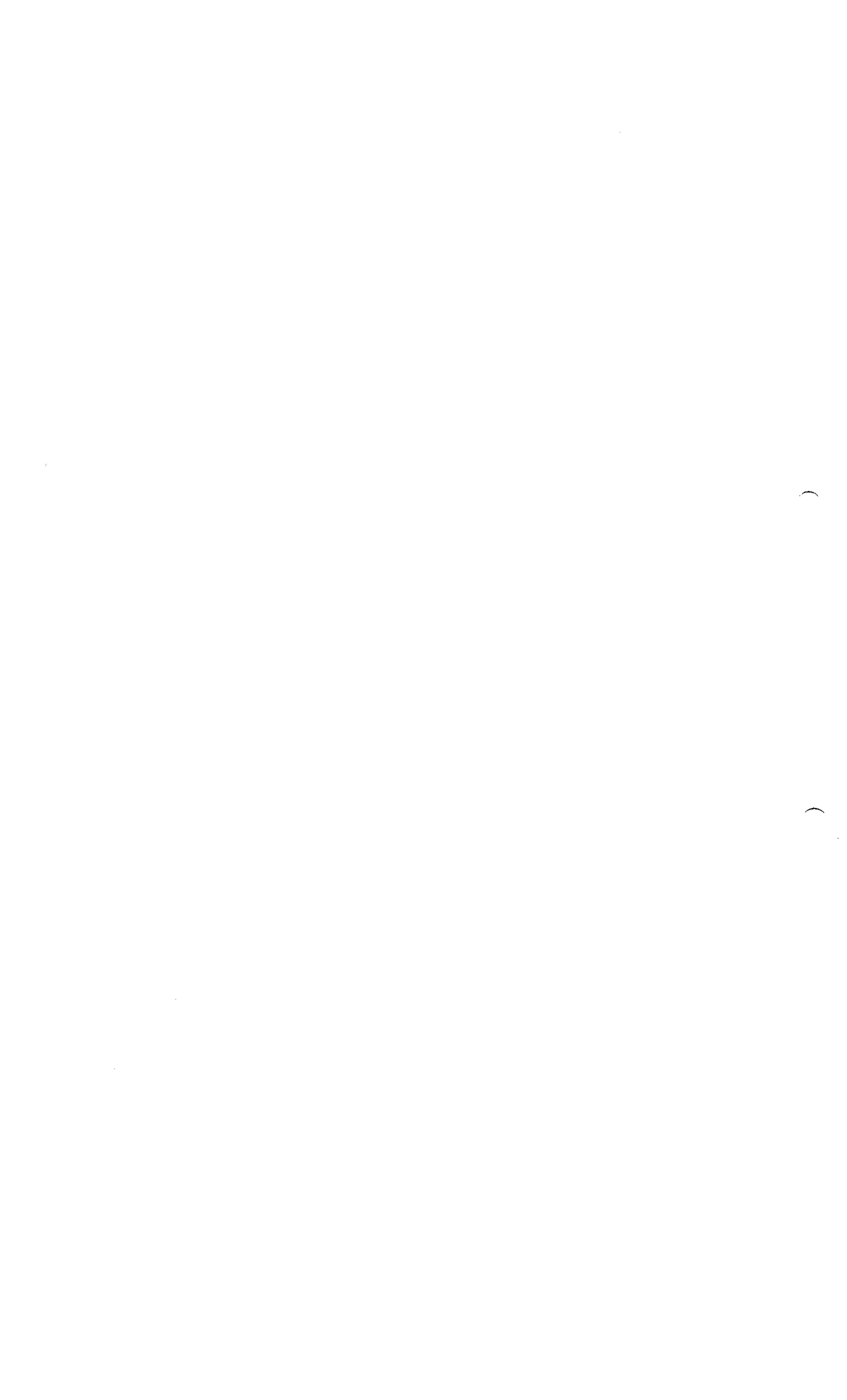
Se verifica que el límite de detección para el ensayo del límite de FHA es de 0,043 µg/mL.

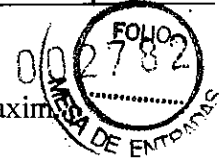
**2.2.1.5 Conclusión**

El método es específico.  
Se verifica que el límite de detección es de 0,043 µg/mL y satisface las necesidades del ensayo.

  
 ROXANA MONTEMILONE  
 DIRECTORA TÉCNICA  
 SANOFI PASTEUR S.A.

  
 CHRISTIAN DOMÍNGUEZ  
 ABUEGADO  
 SANOFI PASTEUR S.A.





Este método es válido para detectar la FHA en el sobrenadante de la vacuna Hexaxim.

### 2.2.2 Porcentaje de adsorción del toxoide tetánico (Rocket)

Esta sección describe la validación de la cuantificación del toxoide tetánico purificado no adsorbido mediante el método de inmunoelectroforesis en la vacuna Hexaxim, de conformidad con la guía de la ICH.

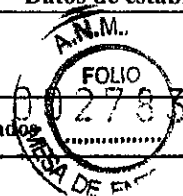
Dado que el método es un ensayo cuantitativo, las características estudiadas son la especificidad, la linealidad, la exactitud y la precisión.

Los resultados de la validación se resumen en la Tabla 29 a continuación:

**Tabla 29: Porcentaje de adsorción del toxoide tetánico (Rocket), resumen de la validación**

Características	Criterios de aceptación	Resultados
<b>Especificidad</b>	Formulación sin toxoide tetánico purificado: ausencia de respuesta significativa. Vacuna Hexaxim ajustada con 5% de sobrenadante: la recuperación promedio entre la cantidad medida y la media de los resultados de precisión debe estar entre el 80% y el 120%.	Formulación sin toxoide tetánico purificado: ausencia de respuesta significativa. Vacuna Hexaxim ajustada con 5% de matriz de sobrenadantes: la recuperación promedio entre la cantidad medida y la media de los resultados de precisión es igual a 93%.
<b>Linealidad</b>	$P_{\text{linealidad}} \leq 0,01$ $P_{\text{Falta de ajuste}} > 0,05$	$P_{\text{linealidad}} < 0,0001$ $P_{\text{Falta de ajuste}} = 0,08$ $Y = 0,061 + 0,951.X$ Donde X = concentración teórica de toxoide diftérico purificado (log Lf/mL) e Y = concentración medida de toxoide diftérico purificado (log Lf/mL). $R^2 = 0,9941$ Rango de linealidad: [2,3 - 23,8] Lf/mL que equivale a [89 - 0] % de adsorción
<b>Exactitud</b>	El porcentaje de recuperación promedio calculado para los 5 niveles de concentración teórica debe estar entre el 80% y el 120%.	Según el nivel de concentración, el porcentaje de recuperación promedio está entre el 99% y el 115%
<b>Precisión (Lf/ml)</b>	El intervalo de confianza del 95 % de la repetibilidad debe ser menor o igual que $x/\pm 1,4$ El intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia debe ser menor o igual que $x/\pm 1,4$	Media general: — $M = 1,11$ que equivale a 12,9 Lf/mL en forma aritmética. La desviación estándar relativa de la repetibilidad y de la precisión intermedia es respectivamente: 3,6% y 4,5%. Intervalo de confianza del 95% de la repetibilidad para 1 medición: $\pm 0,033$ que equivale a $x/\pm 1,08$ en forma aritmética Intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia para 1 corrida con 1 medición: $\pm 0,041$ que equivale a $x/\pm 1,10$ en forma aritmética





Características	Criterios de aceptación	Resultados
Precisión (% de adsorción)	Para información	Media general: $\bar{m} = 35 \%$ La desviación estándar relativa de la repetibilidad y de la precisión intermedia es respectivamente: 6,7% y 8,3% Intervalo de confianza del 95% de la repetibilidad para 1 medición: $\pm 5\%$ Intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia para 1 corrida con 1 medición: $\pm 6 \%$

El método es específico, lineal y exacto en el rango [2,3 - 23,8] Lf/mL, y preciso.

### 2.2.2.1 Resultados

#### 2.2.2.1.1 Especificidad

La especificidad consiste en los pasos siguientes:

- Para la formulación sin toxoide tetánico purificado: debe demostrarse la ausencia de respuesta significativa;
- En la vacuna ajustada con 5% de matriz de sobrenadantes sin toxoide tetánico purificado: la recuperación promedio entre la cantidad medida y la media de los resultados de precisión debe encontrarse entre el 80% y el 120%.

El diseño experimental fue el siguiente: se realizó 1 ensayo (lote n° IND09014 de producto final a granel de Hexaxim, lote n° FA293607 de sobrenadante de Hexaxim y lote n° BBO09-080 de matriz sin toxoide tetánico purificado).

Los lotes utilizados para el estudio son representativos de la producción.

**Tabla 30: Especificidad: Resultados**

Matriz sin toxoide tetánico purificado (altura del cohete)	Lote de Hexaxim +5% de sobrenadante (Lf/mL)
0	10,68





**2.2.2.1.1 Análisis**

- Para la formulación sin toxoide tetánico purificado: ausencia de respuesta significativa;
- En la vacuna ajustada con 5% de sobrenadante de la matriz: la recuperación promedio entre la cantidad medida (10,68 Lf/mL) y la media de los resultados es igual a 93%.

No hay interferencia de la matriz. Por lo tanto, el método es específico.

**2.2.2.1.2 Linealidad**

El diseño experimental fue el siguiente: 2 operadores realizaron 3 series separadas, en días diferentes. Cada corrida incluía el ensayo de un rango de 5 concentraciones de toxoide tetánico purificado en la vacuna Hexaxim (5 agregados de toxoide tetánico purificado, lote N° FA269112 en sobrenadantes de la matriz de Hexaxim sin toxoide tetánico purificado, lote n° BBO09-078).

Los lotes utilizados para el estudio son representativos de la producción.


**2.2.2.1.2.1 Resultados analíticos**


El dato sometido a análisis es la concentración de toxoide tetánico purificado en la vacuna Hexaxim, expresada en Lf/mL.

En la Tabla 31 se resumen los resultados del estudio.

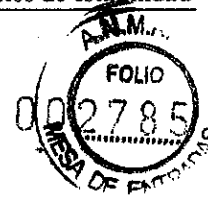
**Tabla 31: Linealidad: concentraciones medidas frente a concentraciones teóricas (Lf/mL)**

Nivel	Concentración teórica (Lf/mL)	Concentración medida (Lf/mL)		
		Serie 1	Serie 2	Serie 3
+5	20,00	21,20	19,21	20,78
+4	15,00	15,60	15,41	15,37
+3	10,00	9,78	10,15	9,71
+2	5,00	5,07	4,93	5,18
+1	2,50	3,18	2,67	2,80

  
 ROXANA MONTEMILONE  
 DIRECTORA TÉCNICA  
 SANOFI PASTEUR S.A.

  
 CHRISTIAN DOMINIGUEZ  
 SUPERADO  
 SANOFI PASTEUR S.A.





**2.2.2.1.2.2 Análisis**

La linealidad en el rango seleccionado se prueba mediante los siguientes pasos, aplicados a los datos de la Tabla 31:

- La homogeneidad de las varianzas vinculadas se verifica mediante la prueba de Cochran;
  - La dependencia entre la concentración teórica del toxoide tetánico purificado y la concentración medida del toxoide tetánico purificado, 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.
- La prueba de Cochran muestra que las varianzas de las 3 series son homogéneas.  
→ Existe una dependencia lineal entre la concentración teórica y la concentración medida.

**Tabla 32: Linealidad - Ecuación de la recta de regresión**

Ecuación de la recta de regresión	Coefficiente de determinación	Rango de linealidad en Lf/mL
$Y = (0,061 \pm 0,043) + (0,951 \pm 0,044).X$	$r^2 = 0,9941$	2,30 - 23,76 ]
donde: X = concentración teórica de toxoide tetánico purificado no adsorbido (log(Lf/mL)) Y = concentración medida de toxoide tetánico purificado no adsorbido (log(Lf/mL))		
P <sub>linealidad</sub> < 0,0001 P <sub>Falta de ajuste</sub> = 0,08		

El método es lineal en el rango [2,30 - 23,76 ] Lf/mL. Se cumplen todos los criterios de aceptación y, por lo tanto, el método es lineal.

  
 ROXANA MONTEMILONE  
 DIRECTORA TÉCNICA  
 SANOFI PASTEUR S.A.


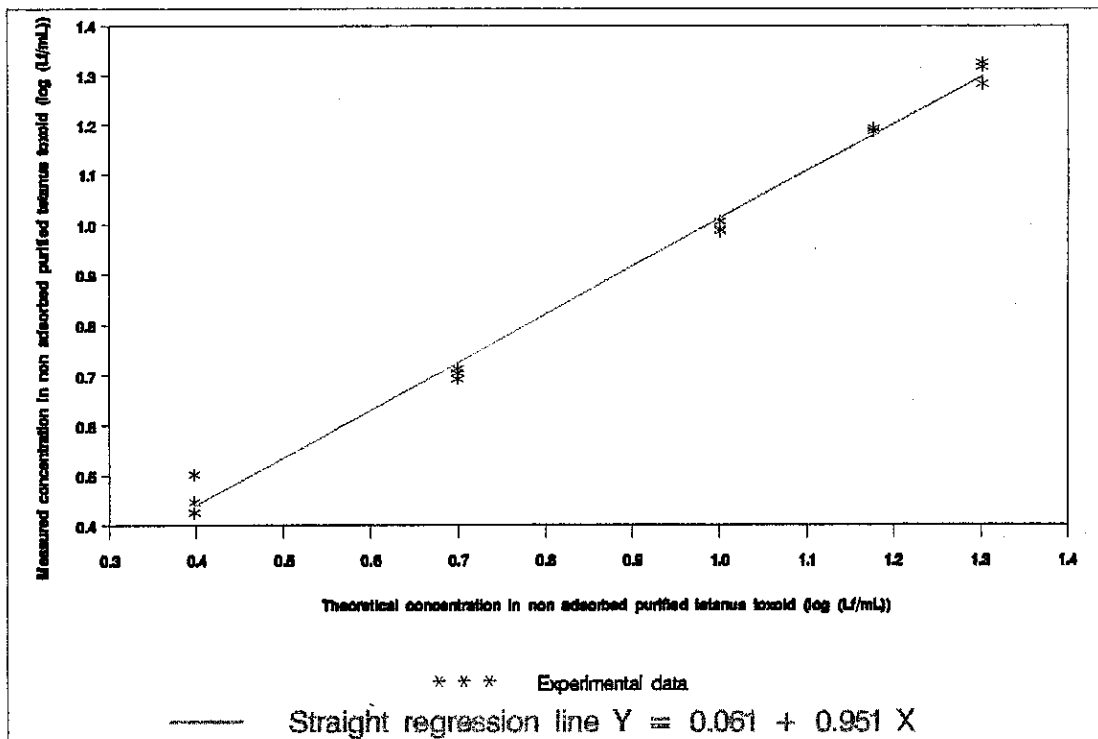
  
 CHRISTIAN DOMINGUEZ  
 APODERADO  
 SANOFI PASTEUR S.A.





Figura 1: Gráfico de linealidad, concentración medida frente a la concentración de toxoide purificado no adsorbido (log(Lf/mL))



### 2.2.2.1.3 Exactitud

El diseño experimental fue el siguiente: 2 operadores realizaron 3 series separadas, en días diferentes.

Cada corrida incluía el ensayo de un rango de 5 concentraciones de toxoide tetánico purificado en la vacuna Hexaxim (5 agregados de toxoide tetánico purificado, lote N° FA269112 en sobrenadantes de la matriz sin toxoide tetánico purificado. lote n°BBO09-078).

Los lotes utilizados para el estudio son representativos de la producción.

#### 2.2.2.1.3.1 Resultados analíticos

El dato sometido a análisis es la concentración de toxoide tetánico purificado en la vacuna Hexaxim, expresada en Lf/mL.

En la Tabla 31 se resumen los resultados del estudio.

