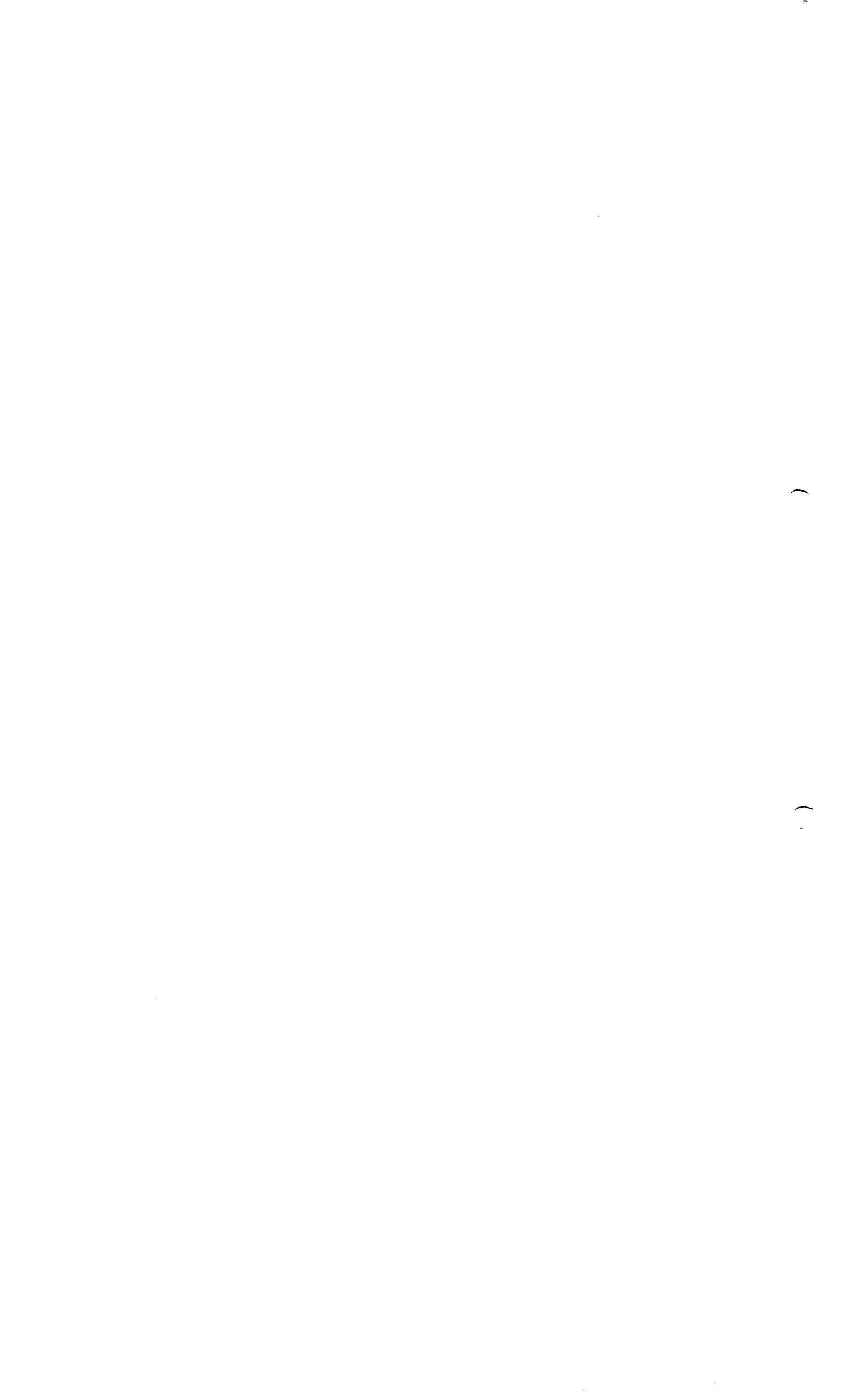


3.2.S.7.2

Protocolo de Estabilidad Posterior a la Aprobación y Compromiso de Estabilidad - IPV


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANGRE PASTEUR S.A


CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
PROCURADOR
SANGRE PASTEUR S.A





Sección 3.2.P.7.2 Protocolo de estabilidad y compromiso de estabilidad después de la aprobación

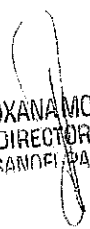
Lista de abreviaturas: vea la sección 2.3 Resumen general de calidad, Introducción.


Los resultados de los estudios de estabilidad que se describen en la sección 3.2.S.7.1 Resumen de estabilidad y conclusiones y en la sección 3.2.S.7.3 Datos de estabilidad confirman la vida útil del trivalente concentrado. Debido a que estos estudios están terminados, no se proponen estudios posteriores a la aprobación.

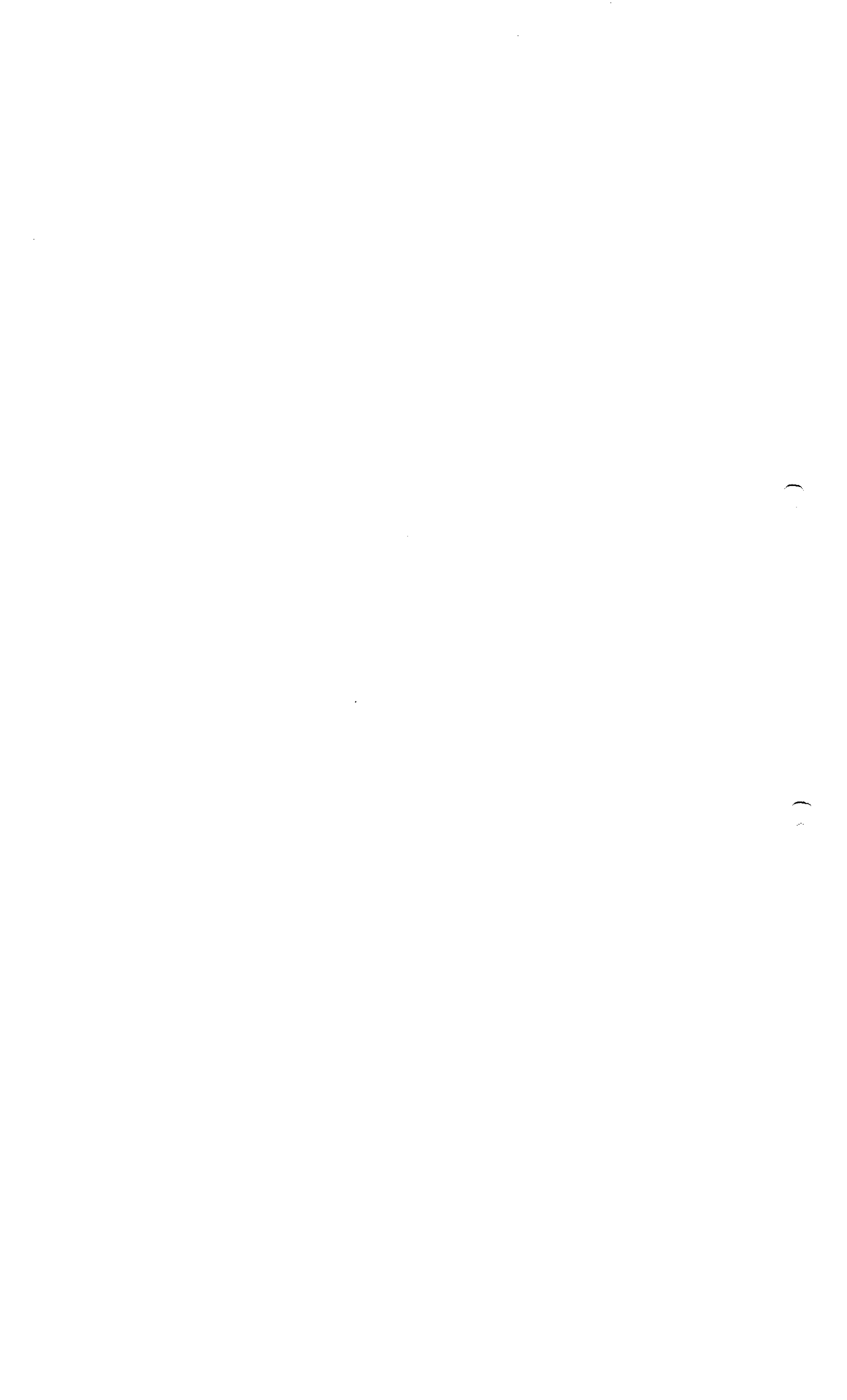


3.2.S.7.3

Datos de Estabilidad - IPV


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANGRE PASTEUR S.A


CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
GERENTE
SANGRE PASTEUR S.A



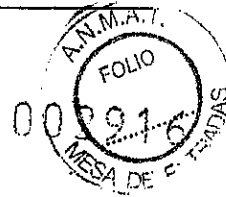


Sección 3.2.S.7.3 Datos de estabilidad

Índice

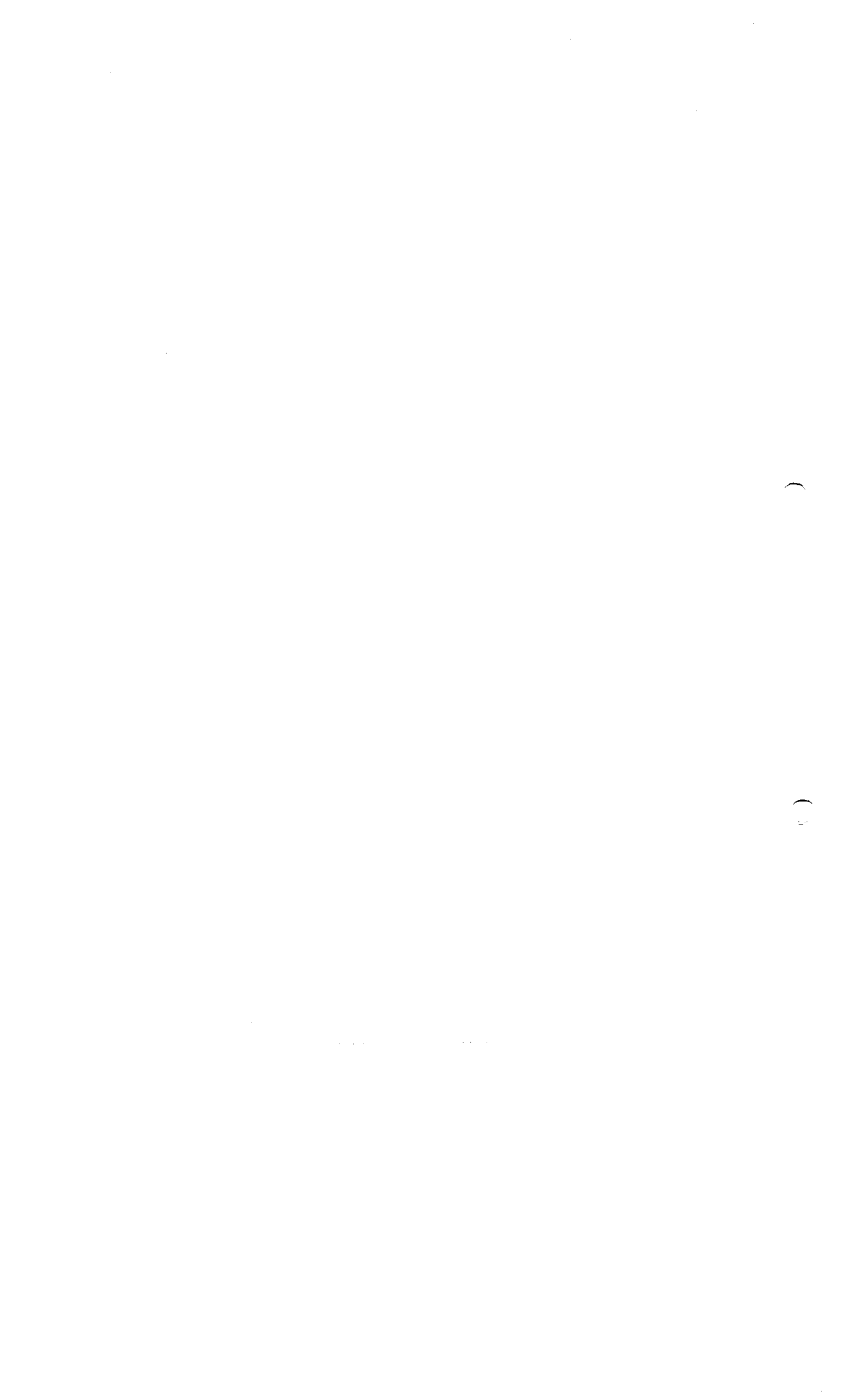
Lista de tablas	2
Lista de figuras	3
1 Procedimientos analíticos	4
1.1 Prueba de contenido de antígeno D por el método de líneas paralelas	4
2 Validación de los procedimientos analíticos	6
2.1 Validación del contenido de antígeno D (método de líneas paralelas)	7
2.2 Resultados	9
2.2.1 Especificidad	9
2.2.2 Linealidad	9
2.2.2.1 Tipo 1	10
2.2.2.2 Tipo 2	13
2.2.2.3 Tipo 3	15
2.2.3 Exactitud	17
2.2.3.1 Tipo 1	17
2.2.3.2 Tipo 2	17
2.2.3.3 Tipo 3	18
2.2.4 Precisión	18
2.2.4.1 Tipo 1	19
2.2.4.2 Tipo 2	19
2.2.4.3 Tipo 3	20
2.3 Conclusión	20
3 Resultados de estabilidad.....	21
3.1 Estudio 1: Estudio de estabilidad para respaldar el almacenamiento del trivalente antipoliomielítico concentrado en frascos de vidrio	21
3.2 Estudio 2: estudio de estabilidad para respaldar el almacenamiento del trivalente antipoliomielítico concentrado en tanques de acero inoxidable	26





Lista de tablas

Tabla 1: Resumen de validación del contenido de antígeno D (por el método de líneas paralelas) .7
Tabla 2: Título del antígeno D presente en la muestra (UD/mL).....10
Tabla 3: Exactitud: recuperación porcentual media17
Tabla 4: Exactitud: Recuperación porcentual promedio17
Tabla 5: Exactitud: Recuperación porcentual promedio18
Tabla 6: Precisión: concentraciones del contenido de antígeno D (UD/mL).....18
Tabla 7: Precisión: Características de repetibilidad y precisión intermedia: tipo 119
Tabla 8: Precisión: Características de repetibilidad y precisión intermedia: tipo 219
Tabla 9: Precisión: Características de repetibilidad y precisión intermedia: tipo 320
Tabla 10: Resultados de estabilidad del almacenamiento a +5 °C ± 3 °C en viales de vidrio para el lote 09322
Tabla 11: Resultados de estabilidad del almacenamiento a +5 °C ± 3 °C en viales de vidrio para el lote P09523
Tabla 12: Resultados de estabilidad del almacenamiento a +5 °C ± 3 °C en viales de vidrio para el lote P09524
Tabla 13: Resultados de estabilidad del almacenamiento a +5 °C ± 3 °C en viales de vidrio para el lote P11125
Tabla 14: Resultados de estabilidad del almacenamiento a +5 °C ± 3 °C en un tanque de acero inoxidable para el lote FA09184527
Tabla 15: Resultados de estabilidad del almacenamiento a +5 °C ± 3 °C en un tanque de acero inoxidable para el lote FA09308428
Tabla 16: Resultados de estabilidad del almacenamiento a +5 °C ± 3 °C en un tanque de acero inoxidable para el lote FA09829429





Lista de figuras

Figura 1: Gráfico de linealidad del tipo 112
Figura 2: Gráfico de linealidad del tipo 214
Figura 3: Gráfico de linealidad del tipo 316





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

1 Procedimientos analíticos

Las especificaciones para los estudios de estabilidad del trivalente antipoliomielítico concentrado llevados a cabo para respaldar el almacenamiento en frascos de vidrio y en tanques de acero inoxidable se presentan en la sección 3.2.S.7.1 Resumen y conclusiones de estabilidad.

Los métodos analíticos utilizados para los estudios de estabilidad se presentan en la sección 3.2.S.4.2 Procedimientos analíticos, salvo el contenido de antígeno D por el método de líneas paralelas que se presenta a continuación.

1.1 Prueba de contenido de antígeno D por el método de líneas paralelas

• Principio

El título de antígeno D de las suspensiones de poliovirus se determina mediante el método de ELISA específicamente para cada tipo de virus de polio en relación con un estándar de referencia de título conocido.

- **Equipo:** material de laboratorio de virología, microplacas de 96 pocillos para ELISA y lector de ELISA.

• Reactivos:

Tampón de recubrimiento: Na_2CO_3 , NaHCO_3 .

Solución de lavado: Tween-PBS 0,025 % + leche al 2 %.

Diluyente para el virus, el anticuerpo de revelado y los testigos de los reactivos: PBS-leche al 2 %.

Sustrato: comprimidos de ABTS.

Solución de bloqueo: solución de lauril sulfato de sodio SDS.

IgG bovina purificada.

Estándares de referencia:

- Referencia europea (EWS).
- Estándar de referencia interno: IPV trivalente, calibrado con EWS y con el estándar de referencia interno anterior.

Anticuerpos conservados a $-20\text{ }^\circ\text{C}$:

- Anticuerpos de recubrimiento de placas:

Tipo 1, vaquilla 437 517: para utilizar diluido a razón de 1:1000.

Tipo 2, vaquilla 934 952: para utilizar diluido a razón de 1:400.

Tipo 3, vaquilla 630 968: tratado con ácido caprílico. Para utilizar diluido a razón de 1:400.



- Anticuerpos reveladores:

Tipo 1, conejo sangrado el 23 de junio de 1994: tratado con IgG. Para utilizar diluido a razón de 1:20 000.

Tipo 2, conejo n.º 3495 sangrado el 20 de agosto de 1982: no tratado con IgG. Para utilizar diluido a razón de 1:10 000.

Tipo 3, conejo n.º 355-94 sangrado el 31 de enero de 1994: tratado con IgG. Para utilizar diluido a razón de 1:10 000.

- Conjugado:

Anticuerpos IgG de cabra anticonejo (H + L) conjugados con peroxidasa. La dilución se tiene que determinar para cada lote.

- **Procedimiento operativo**

- Tapizado de la placa

Diluya los anticuerpos para recubrimiento de placas en tampón de recubrimiento. Vierta 50 µL en cada pocillo de una microplaca. Incube en cámara húmeda a $+5 \pm 3$ °C.

- Saturación

Lave las placas con solución de lavado y déjelas en la solución de lavado durante 30 minutos a temperatura ambiente.

- Preparación y dispensación de las diluciones

Diluciones

Las diluciones se preparan con una solución de PBS-leche.

Lleve a cabo tres diluciones en serie independientes para el estándar de referencia y para el producto de prueba.

Realice las diluciones primarias en un tubo y vierta 160 µL en cada pocillo de placas sin recubrir según se indica a continuación:

Seleccione, de forma sucesiva, los pocillos de una fila para el estándar de referencia, el producto 1 y el producto 2 en la placa sin recubrimiento. Repita esta disposición dos veces en la misma fila. Realice 5 diluciones de orden 2: 80 µL de dilución primaria + 80 µL de PBS-leche para cada estándar de referencia en la primera vez, depositados de menor a mayor dilución en cada fila de la placa sin recubrimiento. Realice el mismo procedimiento con el producto que se analizará.

Elija la dilución de la muestra según su título estimado. La segunda dilución debe coincidir con el inicio de la parte lineal de la curva del estándar.

Transferencia

Vacíe la placa saturada después de 30 minutos de incubación, agregue 50 µL de PBS-leche en los pocillos no utilizados de otra columna (esta columna corresponde al testigo del reactivo), en seis filas y en todos los pocillos del borde de la placa.





Transfiera (fila por fila, de mayor a menor dilución) las diluciones preparadas en la placa sin recubrimiento a los pocillos correspondientes de la placa recubierta saturada. Deje reposar a +37 °C durante 2 horas.

Adición de los anticuerpos reveladores:

Diluya los anticuerpos reveladores en PBS-leche. Vierta 50 µL de anticuerpos en cada pocillo y dejar reposar durante una hora a +37 °C.

Adición del conjugado

Diluir el conjugado en PBS-leche-Tween. Vierta 50 µL de conjugado en cada pocillo y deje reposar durante una hora a +37 °C.

Adición del sustrato

Disuelva un comprimido de ABTS en 5 mL de tampón de ABTS. Vierta 50 µL de sustrato en cada pocillo, cubrir la placa con película adhesiva y deje reposar durante 10 min. para el tipo 1 y durante 15 min. para el tipo 2 y para el tipo 3, a +37 °C.

Bloqueo de la reacción

Detenga la reacción agregando 25 µL/pocillo de solución de bloqueo y tome la lectura de inmediato.

- Lectura; cálculo; resultados

Las lecturas se toman a dos longitudes de onda: 405 nm y 630 nm.

Los títulos se expresan en UD/mL o en UD/dosis (unidades de antígeno D/mL o unidades de antígeno D/dosis).

La interpretación estadística se basa en la referencia bibliográfica de "Cálculos de la potencia relativa mediante el método de bioanálisis de líneas paralelas" de C. Rastogi, publicada en junio de 1993.

- Criterios de validez

Verifique que los valores de la pendiente del estándar de referencia y de la concentración al 50 % estén entre los límites de control (± 3 desviación estándar).

2 Validación de los procedimientos analíticos

Los datos de validación de los procedimientos analíticos se presentan en la sección 3.2.S.4.3 Validación de los procedimientos analíticos para los métodos que también se aplican en la liberación.

La validación del contenido de antígeno D (método de líneas paralelas) se presenta a continuación.



2.1 Validación del contenido de antígeno D (método de líneas paralelas)

El título de antígeno D de las suspensiones de poliovirus se determina mediante el método de ELISA específicamente para cada tipo de virus de polio en relación con un estándar de título conocido.

El sistema elegido es un método cuantitativo en el que se utiliza peroxidasa de rábano picante como marcador enzimático y ABTS como sustrato.

El método se denomina "indirecto" debido a que los anticuerpos contra cada tipo de virus de polio pertenecen a dos especies animales diferentes; y el conjugado, común para los tres tipos, se une a las gammaglobulinas de una de las especies animales.

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

Linealidad y exactitud: dos operadores realizaron tres series independientes en tres días distintos. Cada corrida incluía el análisis de un rango de 5 concentraciones de antígeno D (2 vacunas diluidas, 1 vacuna pura y 2 vacunas con agregado).

Precisión: se llevaron a cabo 3 series en condiciones de precisión intermedia: los análisis se llevaron a cabo de manera independiente utilizando el mismo método, en una muestra primaria homogénea, en el mismo laboratorio y los realizaron 3 operadores en días diferentes.

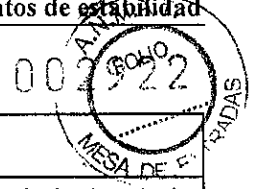
En cada serie se realizaron 6 análisis en condiciones que garantizaban la repetibilidad: los análisis se llevaron a cabo de manera independiente, utilizando el mismo método, en una muestra primaria homogénea, en el mismo laboratorio, con el mismo equipo, con el mismo operador y el mismo día.

Los resultados de la validación se resumen en la tabla siguiente.

Tabla 1: Resumen de validación del contenido de antígeno D (por el método de líneas paralelas)

Características	Criterios de aceptación	Resultados
Especificidad	La especificidad se ha estudiado en este caso evaluando la presencia de señal en análisis de serotipos cruzados.	- Verificación por densidades ópticas positivas para la mezcla viral concentrada tipo 1: señal positiva en la placa tipo 1 y ausencia de señal en las placas tipo 2 y tipo 3. - Verificación por densidades ópticas positivas para la mezcla viral concentrada tipo 2: señal positiva en la placa tipo 2 y ausencia de señal en las placas tipo 1 y tipo 3. - Verificación por densidades ópticas positivas para la mezcla viral concentrada tipo 3: señal positiva en la placa tipo 3 y ausencia de señal en las placas tipo 1 y tipo 2.





Características	Criterios de aceptación	Resultados
Linealidad	$P_{\text{linealidad}} \leq 0,01$ $P_{\text{desviación de la linealidad}} > 0,05$	<p>Después del ajuste de la linealidad en una escala logarítmica-logarítmica de Y = título medido (UD/mL) en función de X = título teórico previsto (UD/mL), se observa la siguiente relación:</p> <ul style="list-style-type: none"> Tipo 1 $P_{\text{linealidad}} < 0,0001$ $P_{\text{desviación de la linealidad}} = 0,83$ $Y = -0,074 + 1,029 \cdot X$ $R^2 = 0,9984$ rango de linealidad: [187 - 722] UD/mL Tipo 2 $P_{\text{linealidad}} < 0,0001$ $P_{\text{desviación de la linealidad}} = 0,14$ $Y = 0,090 + 0,955 \cdot X$ $R^2 = 0,9936$ rango de linealidad: [44,9 - 142,2] UD/mL Tipo 3 $P_{\text{linealidad}} < 0,0001$ $P_{\text{desviación de la linealidad}} < 0,01$ Pero la curvatura es despreciable. $Y = 0,115 + 0,957 \cdot X$ $R^2 = 0,9962$ rango de linealidad: [155 - 686] UD/mL
Exactitud	La recuperación porcentual media calculada para los títulos previstos debe hallarse entre el 80 % y el 120 %.	<p>Las recuperaciones porcentuales promedio son las siguientes:</p> <ul style="list-style-type: none"> Tipo 1: del 98 % al 102 %. Tipo 2: del 99 % al 105 %. Tipo 3: del 99 % al 108 %.
Precisión	- El intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia debe ser menor o igual que $x/\pm 1,2$.	<ul style="list-style-type: none"> Tipo 1 <ul style="list-style-type: none"> Media general: $\bar{m} = 372$ UD/mL Intervalo de confianza del 95% de la precisión intermedia para 2 corridas con 1 medición que se realizan en forma habitual: $\pm 0,032$ que equivale a $x/\pm 1,08$ en forma aritmética. Tipo 2 <ul style="list-style-type: none"> Media general: $\bar{m} = 79,2$ UD/mL Intervalo de confianza del 95% de la precisión intermedia para 2 corridas con 1 medición que se realizan en forma habitual: $\pm 0,024$ que equivale a $x/\pm 1,06$ en forma aritmética. Tipo 3 <ul style="list-style-type: none"> Media general: $\bar{m} = 315$ UD/mL Intervalo de confianza del 95% de la precisión intermedia para 2 corridas con 1 medición que se realizan en forma habitual: $\pm 0,023$ que equivale a $x/\pm 1,06$ en forma aritmética.



2.2 Resultados

El dato sometido a análisis es la concentración del antígeno D expresada en UD/mL. Se presenta en las tablas siguientes.

2.2.1 Especificidad

La especificidad del método se llevó a cabo como parte de la validación de la etapa de cosecha bruta. La especificidad se describe en la validación del contenido de antígeno D en la etapa de monovalente en el capítulo Validación del procedimiento analítico de la sección 3.2.S.2.4 Control de los pasos críticos e intermedios.

2.2.2 Linealidad

Los datos analizados para la validación de la linealidad se presentan en la Tabla 2.

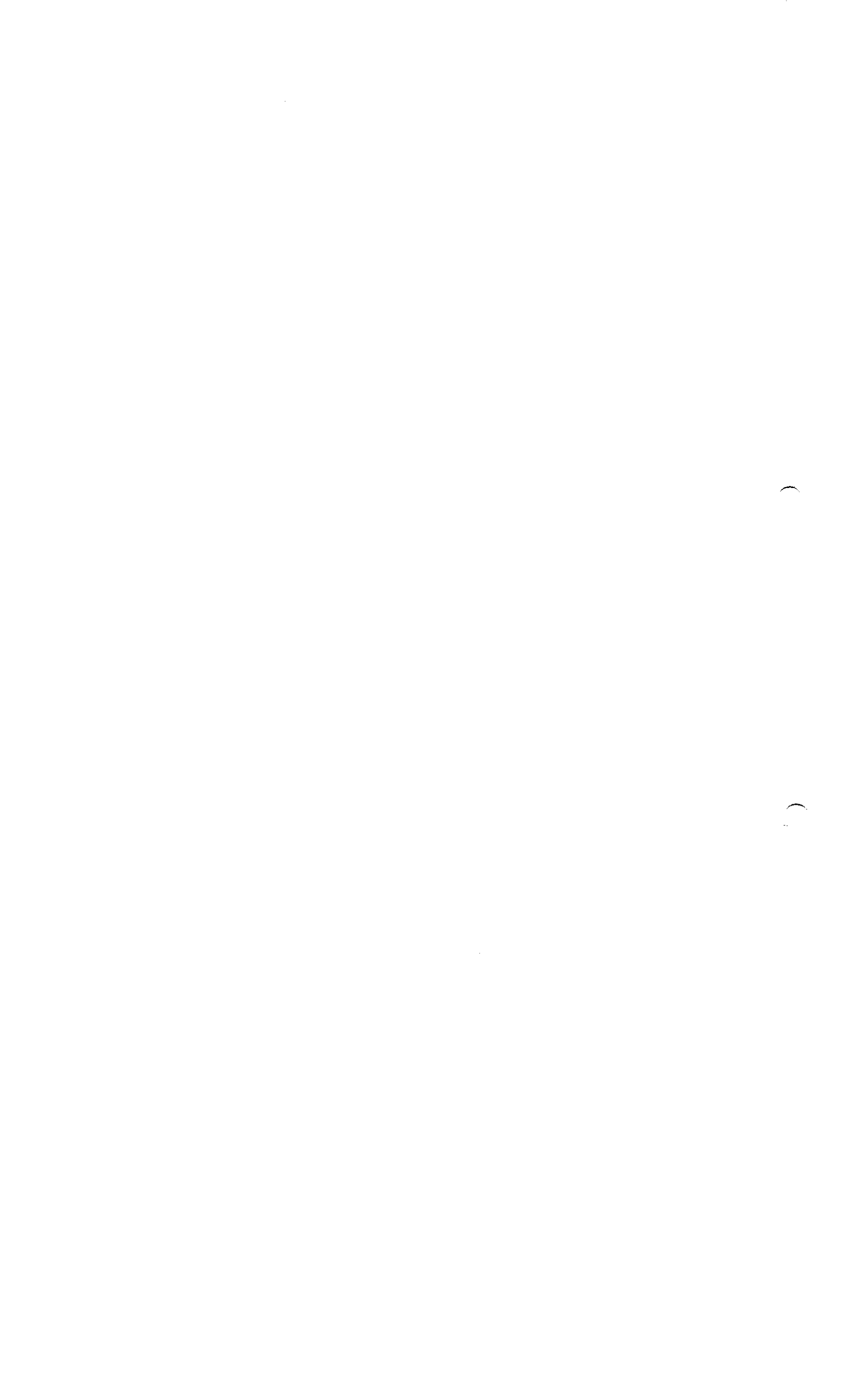
Para cada tipo, el título del trivalente concentrado al nivel 0 es la media de 3 valores obtenidos para el estudio de linealidad: vacuna al nivel de rutina 0.

Los títulos previstos de antígeno D presentes en la muestra se calcularon del siguiente modo:

$$\text{Expected titer} = \frac{(\text{Concentrated Monovalent titer} \times \text{Concentrated Monovalent volume}) + (\text{Trivalent titer} \times \text{Trivalent volume})}{\text{Middle viral propagation volume} + \text{Concentrated Monovalent volume} + \text{Trivalent volume}}$$

Todos los cálculos se realizan con logaritmos, dado que los datos presentan una distribución logarítmica normal.

Como la concentración media de antígeno D en la vacuna sin diluir (nivel 0) es la media de 3 concentraciones medidas, este nivel no se incluye en los cálculos de exactitud.



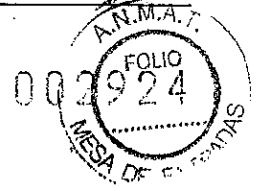


Tabla 2: Título del antígeno D presente en la muestra (UD/mL)

Tipo	Nivel	Medio de propagación viral	Monovalente concentrado		Trivalente		Título previsto*	Grupo			
			Volumen (mL)	Título (UD/mL)	Volumen (mL)	Título (UD/mL)		1	2	3	
1	-2	TRIV D 1b	1,840	1326	0,000	383,15	2,000	199,56	194,5	226,9	197,5
	-1	TRIV D 1a	1,190		0,000		3,400	283,81	286,0	290,0	279,7
	0	TRIV 1	0,000		0,000		1,000	383,15	391,0	385,5	373,2
	1	TRIV S 1b	0,000		0,790		4,685	519,19	523,6	527,8	527,5
	2	TRIV S 1a	0,000		1,500		3,435	669,73	673,1	707,9	676,5
2	-2	TRIV D 2b	1,925	915	0,000	84,56	2,500	47,78	50,9	50,8	49,3
	-1	TRIV D 2a	1,160		0,000		3,400	63,05	62,3	64,7	60,7
	0	TRIV 2	0,000		0,000		1,000	84,56	86,3	86,1	81,4
	1	TRIV S 2b	0,000		0,140		5,140	106,58	116,8	114,5	118,0
	2	TRIV S 2a	0,000		0,300		5,020	131,39	127,9	134,0	130,5
3	-2	TRIV D 3b	2,000	1003	0,000	323,70	2,000	161,85	169,5	178,0	178,0
	-1	TRIV D 3a	1,200		0,000		3,000	231,21	235,4	233,0	229,5
	0	TRIV 3	0,000		0,000		1,000	323,70	328,5	323,2	319,5
	1	TRIV S 3b	0,000		1,000		4,190	454,59	453,0	447,3	446,4
	2	TRIV S 3a	0,000		2,000		2,380	633,88	636,0	654,0	642,7

* Los títulos medidos son medias geométricas calculadas a partir de 2 títulos individuales.

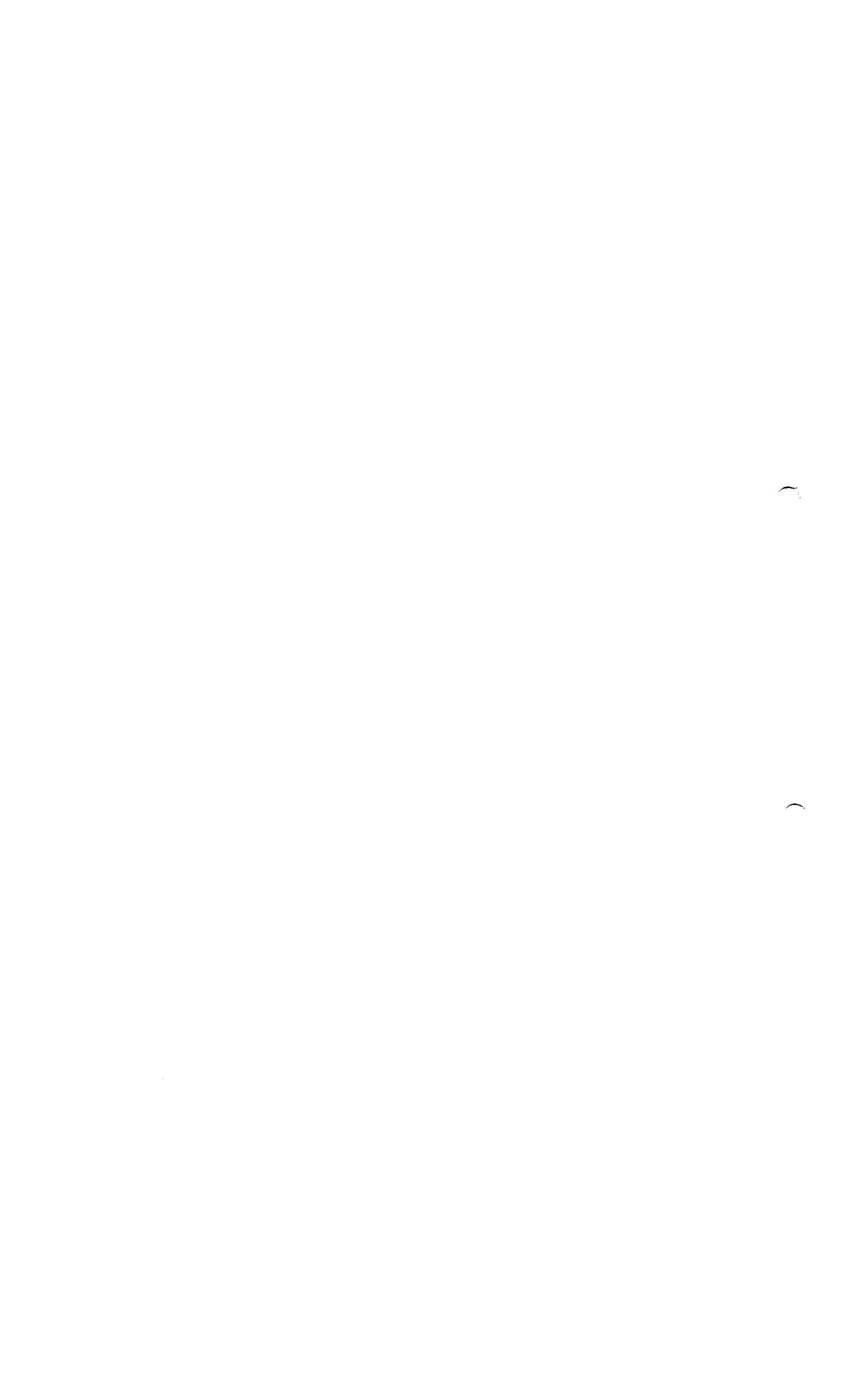
2.2.2.1 Tipo 1

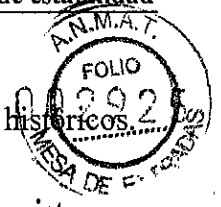
La prueba de Cochran demuestra que las varianzas de todos los niveles de titulación previstos no son homogéneas.

Esto se debe al valor 226,94 UD/mL (título esperado = 199,56 UD/mL). Este valor es la media geométrica de los 2 títulos individuales siguientes: 250 UD/mL y 206 UD/mL.

El rango entre 2 títulos individuales debe ser inferior al 20 %. En este caso, el rango es igual al 18 %, así que el rango medido es aceptable.

No obstante, según los conocimientos sobre la validación de este método, este rango elevado es raro. Por tanto, este valor (226,9 UD/mL) se elimina del análisis.





Además, se recomienda determinar un rango máximo recomendado a partir de valores históricos. El análisis se repite sin considerar este valor. Los resultados son los siguientes:

La prueba de Cochran demuestra que las varianzas de todos los niveles de titulación previstos son homogéneas.

El análisis de varianza y la prueba de falta de ajuste permiten llegar a la conclusión de que la pendiente es significativa y de que el ajuste de la regresión lineal es correcto. Existe una dependencia lineal entre los títulos previstos y los títulos medidos.

La ecuación de la recta de regresión presentada en la Figura 1 es la siguiente:

$$Y = (-0,074 \pm 0,066) + (1,029 \pm 0,026) \cdot X$$

Con

- X: Título esperado de Ag D (log (UD/mL)).
- Y: Título medido de Ag D (log (UD/mL)).

Coefficiente de correlación lineal: $R^2 = 0,9984$.

Rango de linealidad: [187 – 722] UD/mL.



Figura 1: Gráfico de linealidad del tipo 1

