



3.2.S.7.3

Datos de Estabilidad - PRP-T


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
GERENTE GENERAL
SANOFI PASTEUR S.A.

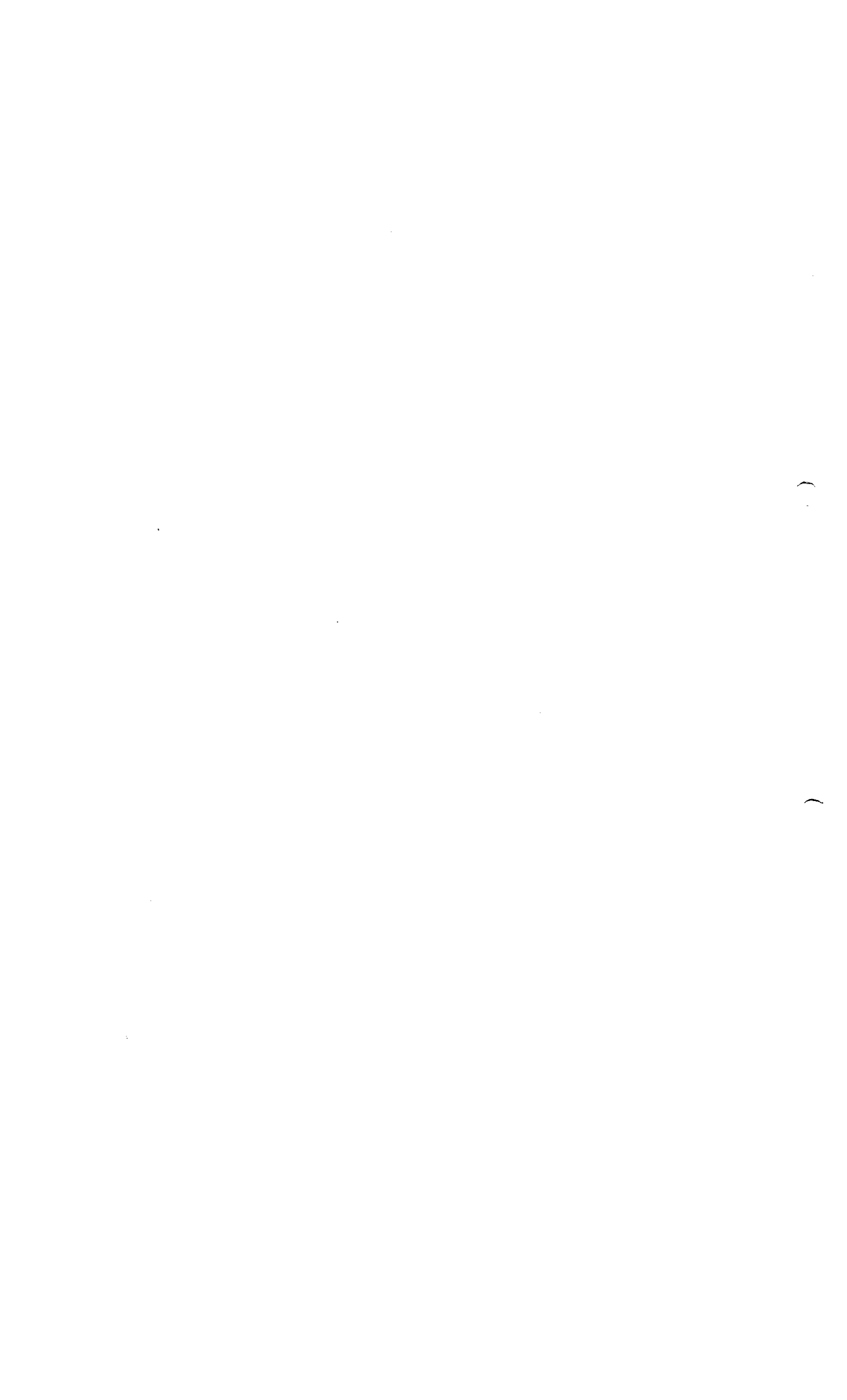




Sección 3.2.S.7.3 - Datos de estabilidad

Índice

Lista de tablas	2
Lista de figuras	4
1 Procedimientos analíticos	5
1.1 Descripción de los procedimientos analíticos.....	5
1.1.1 Pruebas utilizadas para la liberación	5
1.1.1.1 Distribución del tamaño molecular mediante LP-SEC	5
1.1.1.2 Contenido de sacarosa por colorimetría después de una reacción enzimática.....	8
1.1.2 Pruebas complementarias	10
1.1.2.1 Determinación del contenido de polisacárido conjugado de alto peso molecular y del contenido de polisacáridos por precipitación/centrifugación y análisis del fósforo	11
1.2 Validación de los procedimientos analíticos.....	14
1.2.1 Validación del procedimiento analítico para la distribución del tamaño molecular mediante LP-SEC	14
1.2.2 Validación del procedimiento analítico para determinar el contenido de sacarosa por colorimetría tras la reacción enzimática.....	16
1.2.3 Validación del procedimiento analítico para determinar el contenido del polisacárido conjugado de alto peso molecular	20
2 Resultados de estabilidad.....	22
2.1 Estudio de estabilidad 1: Lotes de PRP-T elaborados con el tamaño de lote industrial de 2400 L de PTP.....	22
2.2 Estudios anteriores: Lotes de PRP-T elaborados con el tamaño de lote industrial de 1200 L de PTP.....	26
2.2.1 Estudio de estabilidad 2: Lotes de PRP-T elaborados con el tamaño de lote industrial de 1200 L de PTP y PRP no reprocesado.....	26
2.2.2 Estudio de estabilidad 3: Lotes de PRP-T elaborados con el tamaño de lote industrial de 1200 L de PTP y PRP reprocesado.....	30
2.2.3 Estudio de estabilidad 4: Estudio complementario de estabilidad realizado en lotes de PRP-T elaborados con el tamaño de lote industrial de 1200 L de PTP y PRP no reprocesado.....	34
2.3 Estudio 5: Estudio de estabilidad realizado con PRP-T elaborado con el tamaño de lote industrial de fermentación de 1200 L de PTP en condiciones aceleradas	38





Lista de tablas

Tabla 1: Procedimiento para determinar el contenido de sacarosa	9
Tabla 2: Muestras de prueba.....	12
Tabla 3: Distribución del tamaño molecular mediante LP-SEC: validación, resumen.....	14
Tabla 4: Distribución del tamaño molecular mediante LP-SEC: validación, precisión.....	15
Tabla 5: Características de repetibilidad y precisión intermedia.....	15
Tabla 6: Contenido de sacarosa por colorimetría: Validación, resumen.....	16
Tabla 7: Contenido de sacarosa por colorimetría: Validación	17
Tabla 8: Contenido de sacarosa por colorimetría: Validación, exactitud.....	18
Tabla 9: Recuperación porcentual media	19
Tabla 10: Contenido de sacarosa por colorimetría: Validación, precisión.....	19
Tabla 11: Características de repetibilidad y precisión intermedia.....	20
Tabla 12: Polisacárido conjugado de alto peso molecular por precipitación/centrifugación; validación, resumen.....	20
Tabla 13: Polisacárido conjugado de alto peso molecular; validación, precisión.....	21
Tabla 14: Características de repetibilidad y precisión intermedia.....	21
Tabla 15: Resultados de estabilidad para el almacenamiento a ≤ -35 °C del lote FA268295 de PRP-T	23
Tabla 16: Resultados de estabilidad para el almacenamiento a ≤ -35 °C del lote FA286918 de PRP-T	24
Tabla 17: Resultados de estabilidad para el almacenamiento a ≤ -35 °C del lote FA286919 de PRP-T	25
Tabla 18: Resultados de estabilidad para el almacenamiento a ≤ -35 °C del lote FA013213 de PRP-T	27
Tabla 19: Resultados de estabilidad para el almacenamiento a ≤ -35 °C del lote FA016478 de PRP-T	28
Tabla 20: Resultados de estabilidad para el almacenamiento a ≤ -35 °C del lote FA016769 de PRP-T	29
Tabla 21: Resultados de estabilidad para el almacenamiento a ≤ -35 °C del lote FA023665 de PRP-T	31
Tabla 22: Resultados de estabilidad para el almacenamiento a ≤ -35 °C del lote FA023793 de PRP-T	32

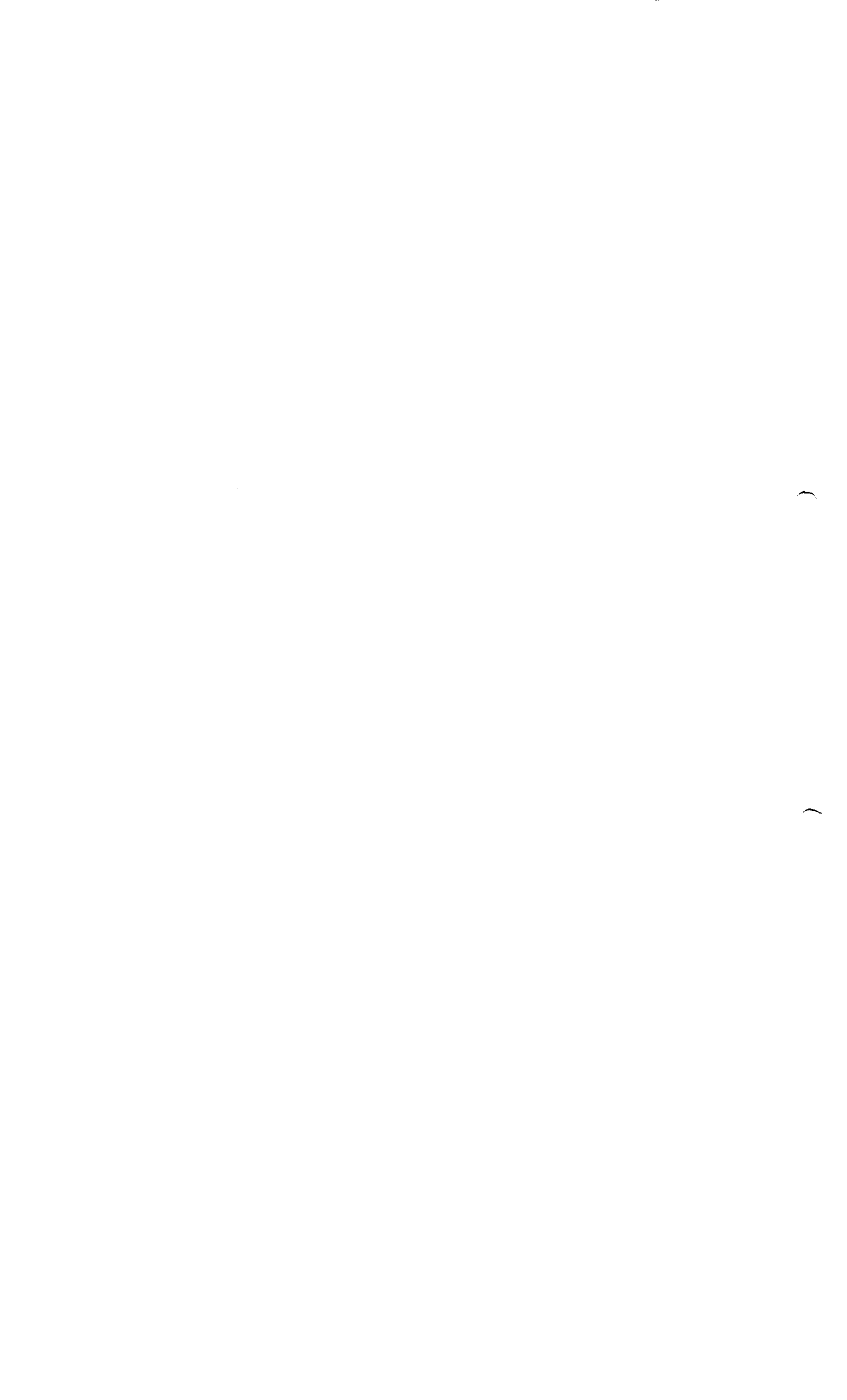




Tabla 23: Resultados de estabilidad para el almacenamiento a ≤ -35 °C del lote FA023816 de PRP-T35

Tabla 24: Resultados de estabilidad para el almacenamiento a ≤ -35 °C del lote FA184846 de PRP-T35


Tabla 25: Resultados de estabilidad para el almacenamiento a ≤ -35 °C del lote FA184847 de PRP-T36


Tabla 26: Resultados de estabilidad para el almacenamiento a ≤ -35 °C del lote FA184848 de PRP-T37

Tabla 27: Resultados de estabilidad para el almacenamiento a $+5$ °C ± 3 °C para los lotes PRP-T 002 / PRP-T 004 / PRP-T 00539

Tabla 28: Resultados de estabilidad para el almacenamiento a $+5$ °C ± 3 °C para los lotes PRP-T 006 / PRP-T 013 / PRP-T 01440

Tabla 29: Resultados de estabilidad para el almacenamiento a $+22$ °C ± 3 °C para los lotes PRP-T 002 / PRP-T 004 / PRP-T 00541

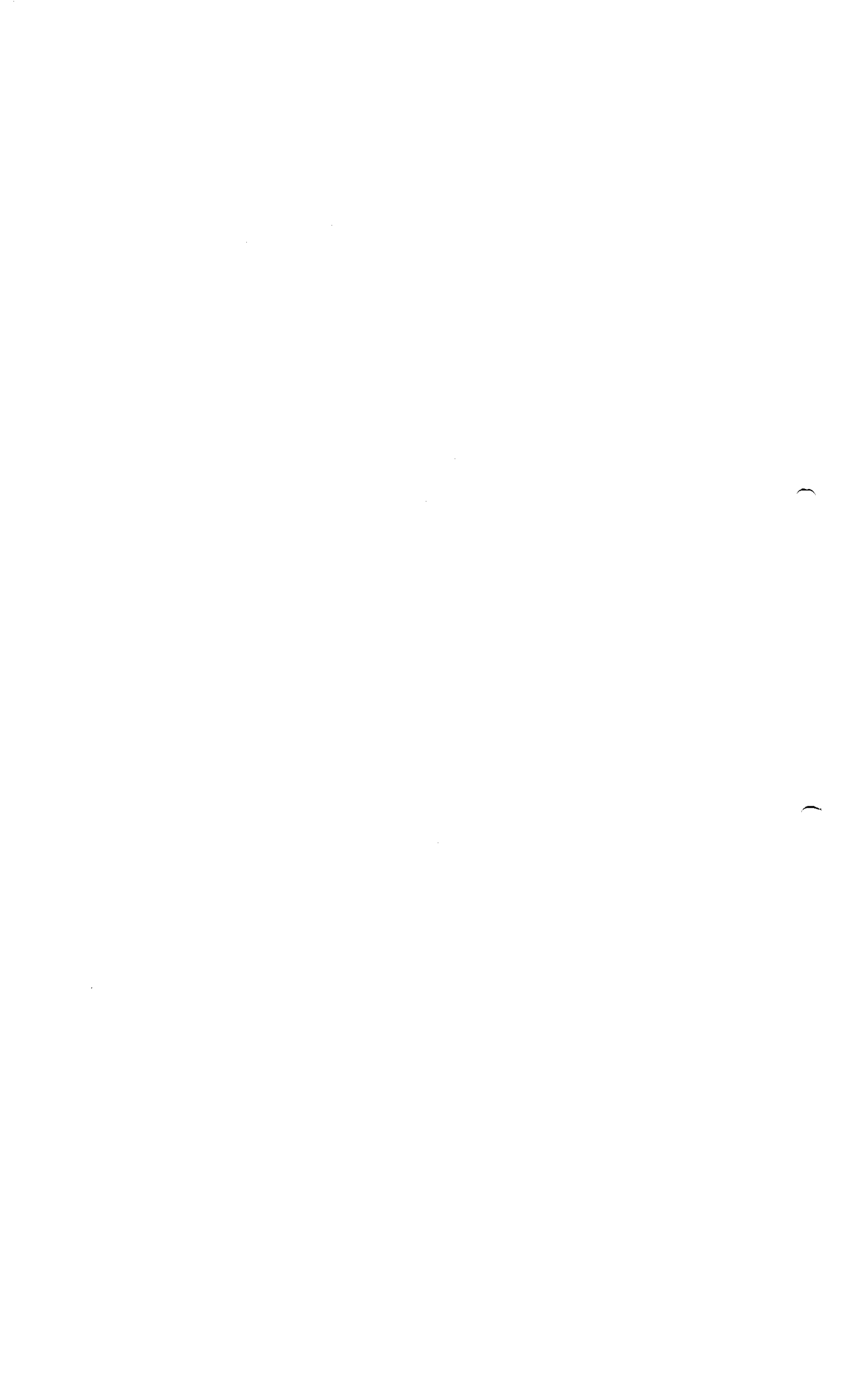

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DURÁN
SANOFI PASTEUR S.A.



Lista de figuras

Figura 1: Gráfico de linealidad.....18



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

1 Procedimientos analíticos

1.1 Descripción de los procedimientos analíticos

En esta sección se presentan los detalles de las pruebas seleccionadas para los estudios de estabilidad que se enumeran en la sección 3.2.S.7.1 Resumen y conclusiones de estabilidad.

1.1.1 Pruebas utilizadas para la liberación

Los métodos analíticos de las pruebas de liberación se presentan en 3.2.S.4.2 Procedimientos analíticos, a excepción de la distribución de tamaño molecular y el contenido de sacarosa.

Los métodos aplicados para las pruebas de distribución del tamaño molecular y de contenido de sacarosa, en el marco de los estudios de estabilidad, corresponden respectivamente a métodos iniciales por LP-SEC con análisis de fósforo y por colorimetría tras la reacción enzimática. Estos métodos se resumen a continuación.

1.1.1.1 Distribución del tamaño molecular mediante LP-SEC

Referencia

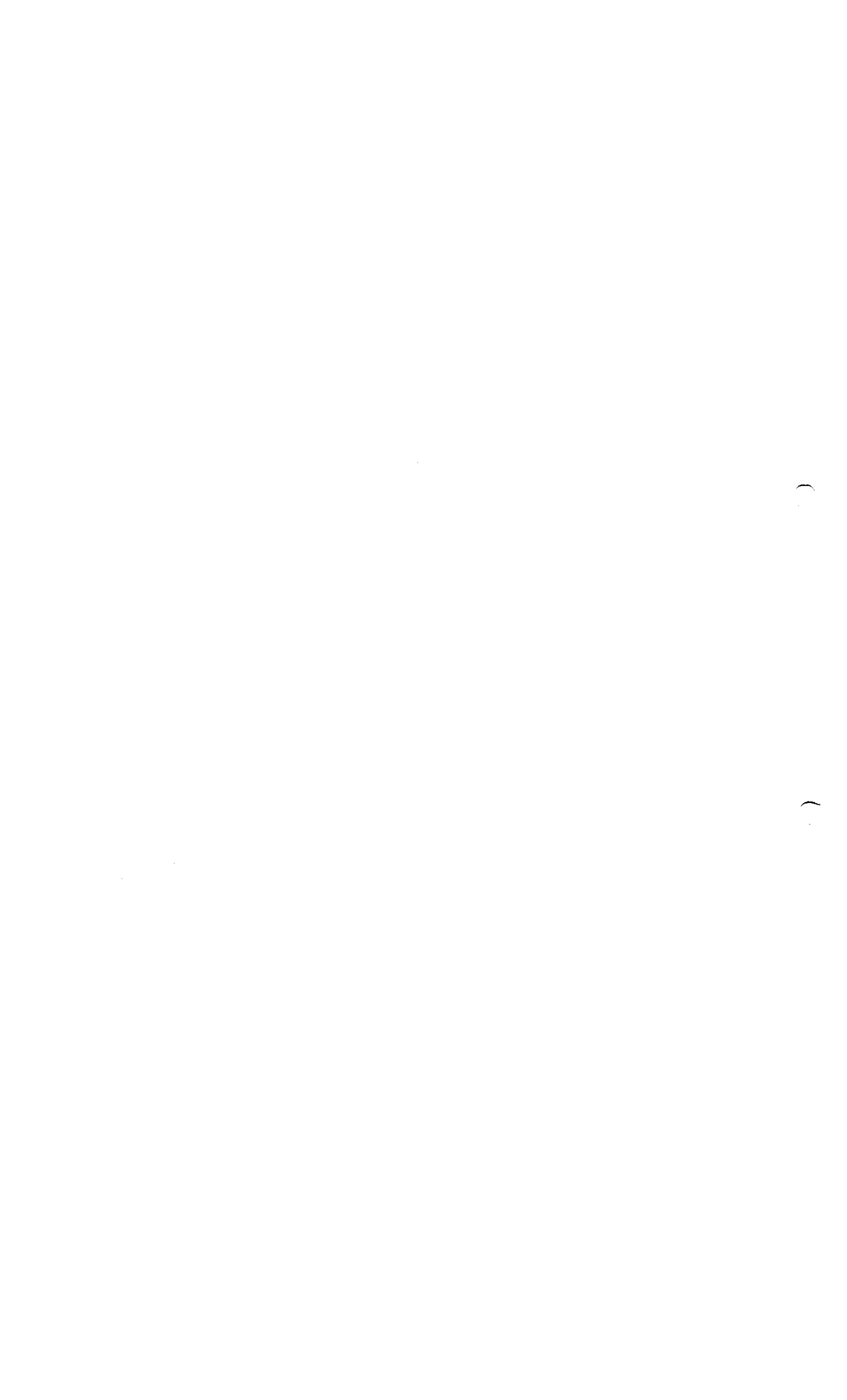
La prueba se lleva a cabo de acuerdo con la monografía 2.5.9 de la Ph. Eur. 2.2.30. "Size-Exclusion Chromatography".

Principio

La cromatografía de exclusión por tamaño es un método en el que los componentes de una mezcla se separan según su tamaño molecular, en función del flujo de la muestra a través de un relleno poroso. Las biomoléculas grandes no pueden penetrar los poros del material de relleno y son las primeras que se eluyen de la columna. Las moléculas más pequeñas que pueden ingresar parcial o completamente a las partículas del relleno, se eluyen de la columna después de los componentes de muestra excluidos.

Equipos y reactivos

- **Equipo:** columna de vidrio para cromatografía con gel de agarosa al 4 % (por ejemplo: diámetro de 1,6 cm, longitud de 100 cm; gel Sepharose CL 4B o equivalente), colector de fracciones, bomba peristáltica, espectrofotómetro, grabadora y equipo estándar de laboratorio
- **Reactivos:** NaCl 0,2 M en agua ultrapurificada, agua purificada, cloruro de sodio
- **Kit para la calibración de columnas (referencia):** Lote de referencia de PRP-AH





Soluciones

- **Tampón de la fase móvil:** NaCl 0,2 M en agua ultrapurificada.
 - **Solución de muestra:** Solución de PRP-T que contiene entre 0,5 y 1 mg/mL de polisacáridos. Con el fin de obtener la concentración adecuada para los análisis cromatográficos, la solución de PRP-T se dializa y se concentra. Esta operación se efectúa en dos pasos:
 - **Diálisis:** realícela usando la membrana adecuada (por ejemplo: poros de 24 Å de diámetro medio, membrana de 28 µm de espesor y corte de peso medio de 7000 ± 1000 Da; Union Carbide o equivalente). Este paso consiste en eliminar la sacarosa y el tampón de Tris presentes en la solución de PRP-T y que podrían interferir.
 - **Concentración:** realícela para obtener una solución dializada de PRP-T con una concentración que permita el análisis cromatográfico. El PRP-T se concentra mediante corridas sucesivas en una membrana adecuada (por ejemplo: corte de 10 000 Da, diámetro de 47 mm; Filtron Omega o equivalente). El disolvente y las moléculas pequeñas pasan a través de la membrana y se recogen en un tubo de ensayo (ultrafiltrado). Las macromoléculas (como el PRP-T) pasan por encima de la membrana y se recolectan en el matraz inicial. El paso de concentración se detiene cuando el volumen de ultrafiltrado es suficiente.
- Antes de ser utilizado en el análisis cromatográfico, se determina el contenido de fósforo (consulte la sección de condiciones operativas) de la solución inicial de PRP-T, de la solución dializada de PRP-T (volumen de muestra para análisis común: 0,4 mL), de la solución concentrada de PRP-T (volumen de muestra para análisis común: 0,4 mL tras una dilución de 1/10) y ultrafiltrado (volumen de muestra para análisis común: 1 mL). Se calcula el producto de los pasos de diálisis, concentración y diálisis-concentración. El análisis cromatográfico se puede realizar si el producto se encuentra entre el 80 % y el 110 %.
- **Solución de calibración de la columna:** se prepara una solución que contenga un equivalente de 5 mg/mL de PRP-AH usando la solución adecuada de cloruro de sodio dependiendo del contenido teórico de PRP-AH (solución de cloruro de sodio de 0,11 a 0,20 M en agua ultrapurificada). El volumen vacío y el volumen total (V_0 y V_t) corresponden al primero y último picos que se eluyeron.

Procedimiento operativo

Se realiza la cromatografía con el tampón de la fase móvil (velocidad de flujo: 25 mL/h a 35 mL/h).

Se equilibra la columna con el tampón de la fase móvil durante varias horas. El espectrofotómetro se conecta a una grabadora (longitud de onda de calibración de la columna: 206 nm y longitud de onda de la solución para muestra: 280 nm).

El volumen de inyección para calibrar la columna corresponde a 1 mL mientras que el volumen de inyección para la solución de muestra corresponde a 5 mL.

Para las soluciones de muestra inyectadas, recolectar un volumen constante y calibrado de fracciones (por ejemplo: 90 gotas de efluente).



Lectura, cálculo, resultados

Con los valores V_o y V_t , determinar el volumen de elución de K_D 0,2 (para la solución de muestra). El K_D es una medición relativa del tamaño de una molécula y se calcula según la siguiente fórmula:

$$K_D = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

- V_e = volumen de elución del pico
- V_o = volumen de elución del volumen vacío de la columna (V_o)

Prepare una agrupación de efluentes antes y después de $K_D = 0,20$.

Porcentaje de polisacárido eluido antes de K_D 0,20

El contenido de fósforo se determina en cada grupo (antes y después de un K_D de 0,20) y en una solución muestra no sometida a cromatografía usando el procedimiento analítico que se describe en 3.2.S.4.2 Procedimientos analíticos (los volúmenes de las muestras de prueba son de 0,5 mL para el grupo de efluentes antes de un K_D de 0,20; 1 mL para el grupo de efluentes antes de K_D de 0,20 y 0,1 mL para la solución de muestra no sometida a cromatografía). Para cada agrupación, el contenido de fósforo obtenido se expresa en $\mu\text{g/mL}$.

Se determina el porcentaje del polisacárido eluido antes de $K_D = 0,20$ según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de polisacárido eluido antes de } K_D \text{ de } 0,20 = \frac{C_{\text{agrupación1}} \times V_{\text{agrupación1}}}{(C_{\text{agrupación1}} \times V_{\text{agrupación1}}) + (C_{\text{agrupación2}} \times V_{\text{agrupación2}})} \times 100$$

Donde:

- C agrupación 1 = contenido de fósforo en la agrupación eluida antes de K_D 0,20 ($\mu\text{g/mL}$)
- C agrupación 2 = contenido de fósforo en la agrupación eluida después de K_D de 0,20 ($\mu\text{g/mL}$)
- V agrupación 1 = volumen de la agrupación 1 (mL)
- V agrupación 2 = volumen de la agrupación 2 (mL)

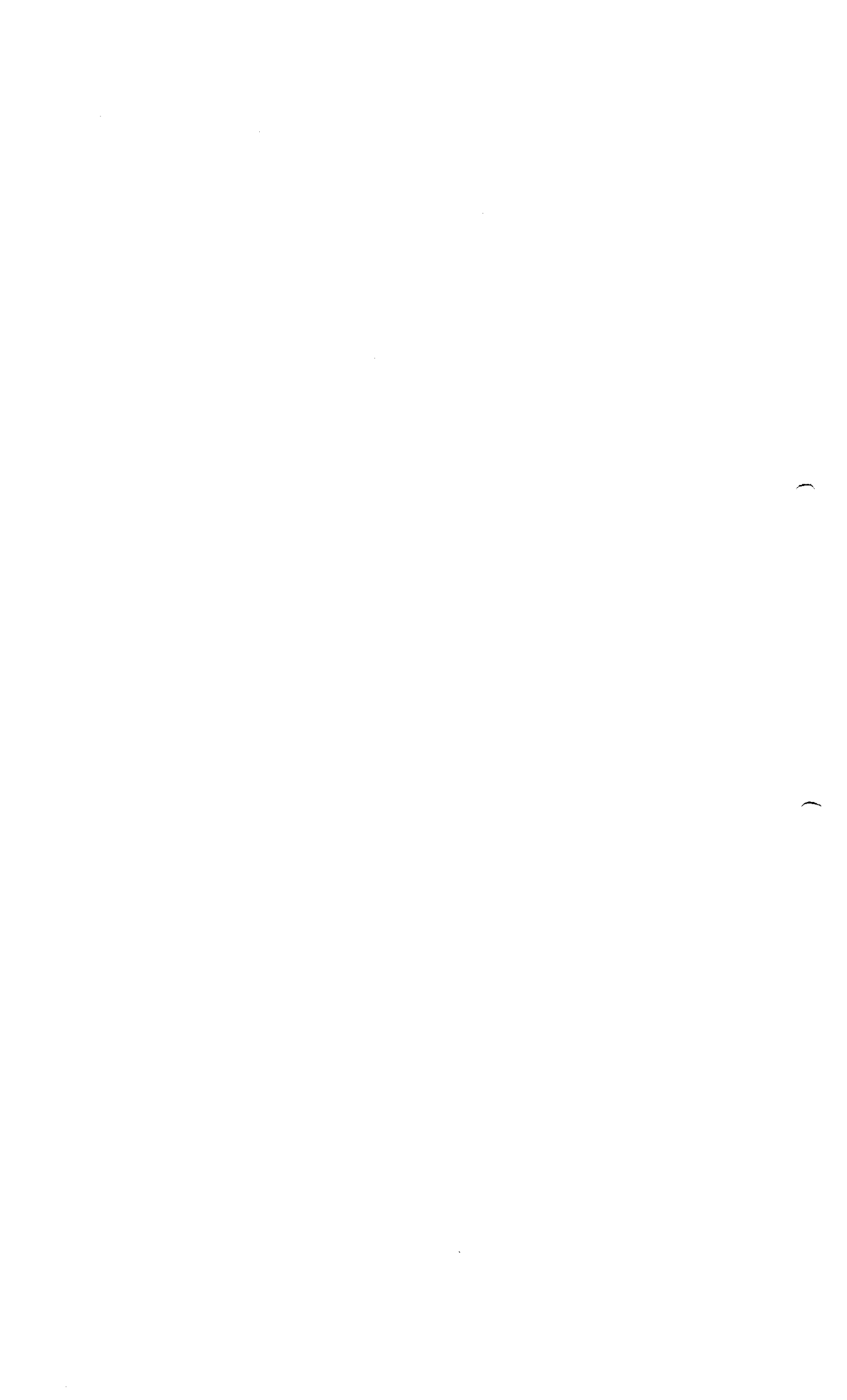
Rendimiento cromatográfico

El producto cromatográfico se calcula usando el contenido de fósforo que se determinó en la agrupación antes de K_D de 0,20; en la agrupación después de K_D 0,20 y en el contenido de fósforo para la solución de muestra no sometida a cromatografía según la siguiente fórmula:

$$\text{Producto cromatográfico } \% = \frac{C_{\text{agrupación1}} \times V_{\text{agrupación1}} + C_{\text{agrupación2}} \times V_{\text{agrupación2}}}{C \times V} \times 100$$

Donde:

- C agrupación 1 = contenido de fósforo en la agrupación eluida antes de K_D 0,20 ($\mu\text{g/mL}$)
- C agrupación 2 = contenido de fósforo en la agrupación eluida después de K_D de 0,20 ($\mu\text{g/mL}$)
- V agrupación 1 = volumen de la agrupación 1 (mL)
- V agrupación 2 = volumen de la agrupación 2 (mL)



FOLIO
002978

- C = contenido de fósforo del PRP-T dializado-concentrado no sometido a cromatografía que se está analizando ($\mu\text{g/mL}$)
- V = volumen inyectado del PRP-T concentrado dializado sometido a prueba

Criterios de validez

El rendimiento cromatográfico debe ser mayor o igual al 80%.

El K_D del PRP-AH utilizado para calibrar la columna debe estar dentro de los límites del gráfico de control.

1.1.1.2 Contenido de sacarosa por colorimetría después de una reacción enzimática

Referencia

- Bergmeyer, H.U & Bernt, E. (1974) in Methoden der enzymatischen analyse (Bergmeyer H, U., Hrsg), 3 Aufl., Bd. 2, S. 1221-1224; Verlag Chemie, Weinheim.
- Boehringer Mannheim. U.V. method for the enzymatic determination of saccharose. Kit n.º 139041.

Principio

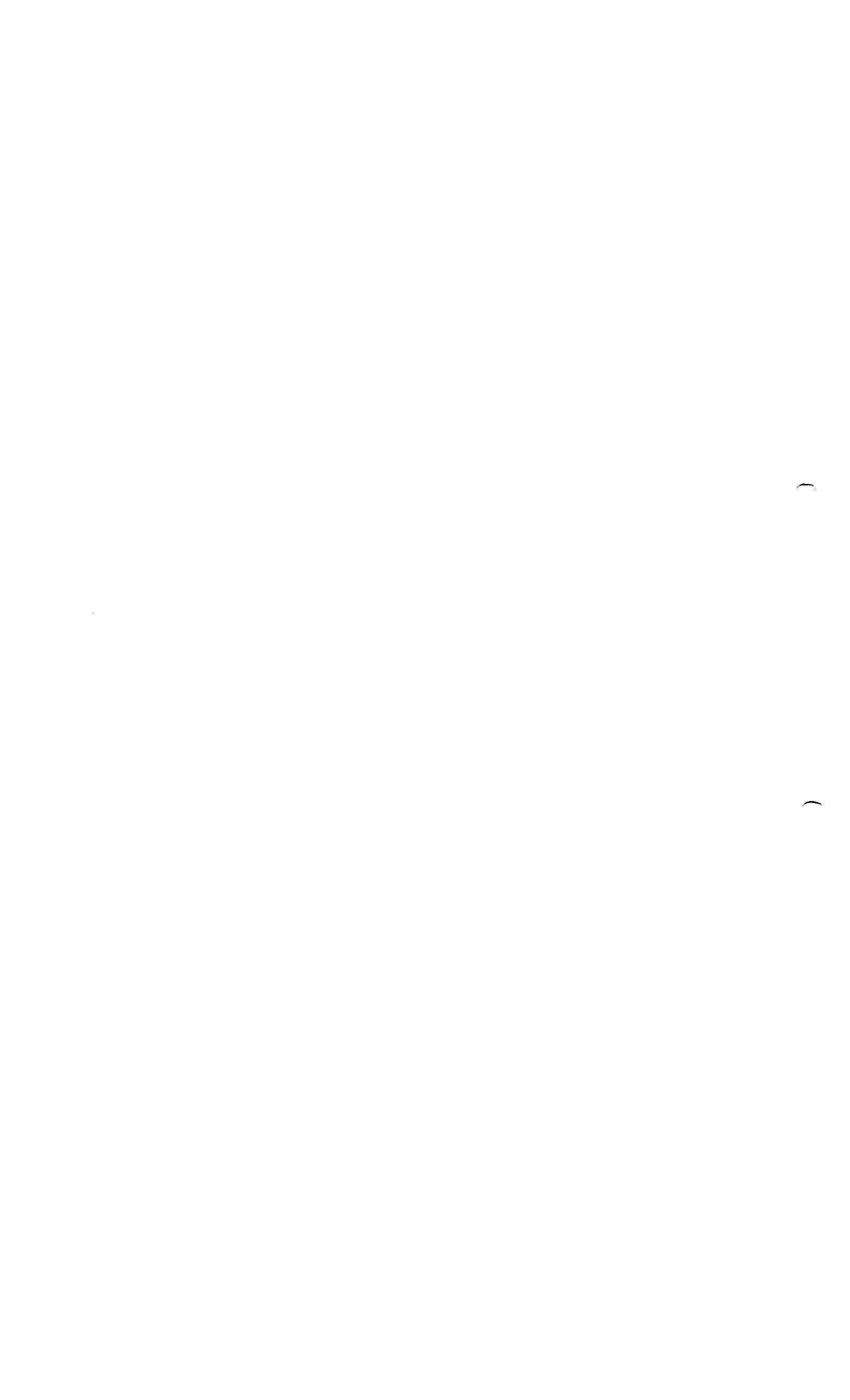
La sacarosa se hidroliza a un pH de 4,6 con β -fructosidasa (invertasa) en glucosa y fructosa según la reacción (1):

- 1) **Erreur ! Des objets ne peuvent pas être créés à partir des codes de champs de mise en forme.**

A un pH de 7,6 y en presencia de adenosina trifosfato (ATP), la hexoquinasa (HK) cataliza la fosforilación de la D-glucosa (2). La glucosa-6-fosfato (G-6-P) que se produce se oxida específicamente en presencia de fosfato de de nicotinamida y adenina (NADP) para producir gluconato-6-fosfato y fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido (NADPH). Esta reacción (3) se cataliza con glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6P-DH).

- 2) **Erreur ! Des objets ne peuvent pas être créés à partir des codes de champs de mise en forme.**
- 3) **Erreur ! Des objets ne peuvent pas être créés à partir des codes de champs de mise en forme.**

La cantidad de NADPH que se forma durante la reacción es proporcional a la cantidad de sacarosa y se mide por un aumento de 340 nm en la absorbancia después de las reacciones (2) y (3).





Equipos y reactivos

- **Equipo:** equipo estándar de laboratorio y espectrofotómetro UV.
- **Reactivos:** Kit Boehringer n.139041 o equivalente (compuesto por 3 reactivos: el reactivo 1 contiene trietanolamina con un pH de 7,6, ATP, sulfato de magnesio y estabilizantes; el reactivo 2 contiene hixoquinasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, y el reactivo 3 contiene tampón de citrato con un pH de 4,6, β-fructosidasa y estabilizantes), agua purificada.
- **Referencia:** 0,5 g/L de solución de sacarosa en agua purificada (para control interno)

Soluciones

- **Solución testigo:** vea procedimiento
- **Solución de control:** 0,5 g/L de solución de sacarosa
- **Soluciones muestra:** diluya una alícuota de solución de PRP-T para obtener una concentración de sacarosa de entre 0,05 y 0,8 g/L (generalmente se diluye 1:100). Duplicar.

Procedimiento operativo

Introducir en tanques para espectrofotometría de trayecto óptico de 1 cm:

Tabla 1: Procedimiento para determinar el contenido de sacarosa

	Solución de control	Solución de la muestra	Solución testigo
Reactivo 3 (mL)	0,2	0,2	0,2
Solución de control a razón de 0,5 g/L de sacarosa (mL)	-	-	0,1
Muestra (mL)	-	0,1	-
Reactivo 1 (mL)	1,0	1,0	1,0
Agua purificada (mL)	1,8	1,7	1,7
Mezclar. Después de 3 min. tomar la lectura de la absorbancia (A1) a 340 nm en contraste con aire. Inicie la reacción agregando:			
Reactivo 2 (mL)	0,02	0,02	0,02
Mezclar. Espere a que finalice la reacción (10 - 15 min.) y tome la lectura de la absorbancia (A2) a 340 nm en contraste con aire. Si la reacción no ha finalizado, continuar controlando la absorbancia cada 5 minutos hasta que ésta se haya estabilizado.			



Lectura, cálculo, resultados

A1 es la lectura de la absorbancia al inicio de la reacción y A2 es la lectura de la absorbancia al final de la reacción.

Determine la diferencia de la absorbancia (A2-A1) para las soluciones de control y de muestra y reste la diferencia de la absorbancia del control de la diferencia de la absorbancia de la muestra:

$$\Delta A = (A2 - A1) \text{ muestra} - (A2 - A1) \text{ control}$$

$$\Delta A = \Delta A \text{ muestra} - \Delta A \text{ control}$$

La concentración de sacarosa se obtiene de la siguiente fórmula:

$$C = \left(\frac{V \times MW}{\epsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta A \right) \text{ g/L}$$

Donde:

- V = volumen final (3,02 mL)
- MW = peso molar de la sacarosa (342,30 g/mol)
- ϵ = coeficiente de absorción molecular del NADPH a 340 nm (6,3 l.mmol⁻¹ cm⁻¹)
- v = volumen de la muestra (0,1 mL)
- d = trayecto óptico (1 cm)

El resultado final es la media de las dos pruebas que se realizan.

Si la muestra se ha diluido, el resultado debe multiplicarse por el factor de dilución.

Si $\Delta A < 0,1$, el volumen de la muestra se puede aumentar hasta 1,8 mL disminuyendo el volumen del agua purificada de manera que se mantenga el mismo volumen final. Tomar en cuenta el volumen de muestra en el cálculo.

Criterios de validez

La desviación relativa entre los 2 ensayos debe ser menor o igual que 10%.

La diferencia de absorbancia A2 – A1 debe ser igual o mayor que la unidad de absorbancia 0,1.

El valor de la sacarosa obtenido para la solución de control debe encontrarse dentro de los límites del gráfico de control.

1.1.2 Pruebas complementarias

Específicas para los estudios 2 y 3, a continuación se presenta el método para determinar el contenido de polisacáridos del conjugado de alto peso molecular (HMWC) y el contenido de polisacáridos libres usando la separación por precipitación/centrifugación y el análisis de fósforo.

La prueba de identificación de *Haemophilus* se realiza de acuerdo con los requisitos de la monografía 2.7.1 de la Ph. Eur. “Métodos inmunoquímicos”, difusión doble por el método de Ouchterlony. El procedimiento analítico es idéntico al que se aplica para los intermedios PRP y PRP-AH (vea la sección 3.2.S.2.4 Controles de los pasos críticos e intermedios).





La prueba de identificación del tétanos se realiza de acuerdo con los requisitos de la monografía 2.7.1 de la Ph. Eur. "Métodos inmunoquímicos", difusión doble por el método de Ouchterlony. El procedimiento analítico es idéntico al que se aplica para *Haemophilus* (usando la referencia y el antisuero adecuados; vea la sección 3.2.S.2.4 Controles de los pasos críticos e intermedios). La visualización de las líneas de inmunoprecipitación se evalúa mediante tinción con azul de Coomassie.

La prueba de irreversibilidad de la proteína tetánica se realiza de acuerdo con los requisitos de la Ph. Eur., monografía n.º 0452. El procedimiento analítico es idéntico al que se aplica para los intermedios de proteína tetánica concentrada (CTP) (vea la sección 3.2.S.2.4 Controles de los pasos críticos e intermedios).

1.1.2.1 Determinación del contenido de polisacárido conjugado de alto peso molecular y del contenido de polisacáridos por precipitación/centrifugación y análisis del fósforo

Principio

El polisacárido de *Haemophilus* conjugado y el polisacárido libre se precipitan con etanol absoluto, lo cual desnaturaliza los polisacáridos de alto peso molecular.

Los oligosacáridos no se precipitan en estas condiciones. La adición de una mezcla de agua y etanol (50/50 v/v) resolubiliza el polisacárido libre y los polisacáridos de bajo peso molecular de forma preferencial.

Equipos y reactivos

- **Equipo:** tubos cónicos de plástico con tapón, soportes para tubo, pipetas, perlas de vidrio, mezclador de vórtice, agitador Vibrax, pesas, matraces y congelador.
- **Reactivos:** agua purificada, etanol absoluto deshidratado, solución de etanol al 50 % v/v en agua purificada, solución de cloruro de sodio 5 M en agua purificada, solución de NaOH 1 N, Tris-(hidroximetil)aminometano, HCl concentrado y sacarosa

Soluciones

- Tampón de Tris 200 mM (pH 7,0 ± 0,5): prepare una solución 200 mM de tris-(hidroximetil)aminometano en agua purificada ajustada a un pH de 7,0 ± 0,5 con HCl concentrado.
- Tampón de control (proporciones relativas, las cantidades se pueden modificar): utilice 8,5 g de sacarosa, 5 mL de tampón Tris 200 mM y afore a 100 mL con agua purificada.

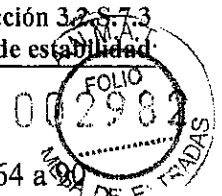
Procedimiento operativo

Para cada muestra, realizar 3 precipitaciones en paralelo:

- Primera etapa: oligosacáridos libres.

A 2 mL de solución de PRP-T agregar 0,5 mL de solución de NaCl 5 M. Mezcle con perlas de vidrio y agregue 10 mL de etanol absoluto.

A 2 mL de tampón de control agregar 0,5 mL de solución de NaCl 5 M. Mezcle con perlas de vidrio y agregue 10 mL de etanol absoluto.



Agitar de arriba a abajo cada una de las dos soluciones. Deje reposar a -20 °C durante 64 a 96 horas. Centrifugue durante 90 minutos a 4000 rpm a +4 °C. Retire el sobrenadante con cuidado y analice el contenido de fósforo.

- Segunda etapa: polisacáridos libres.

Agregar 0,5 mL de solución de etanol al 50 % al sedimento de los tubos anteriores. Agite en el mezclador de vórtice para desadherir el sedimento y agite en el Vibrax durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego agregue 1,5 mL de solución de etanol al 50 %. Agitar en el agitador Vibrax durante 2 horas a temperatura ambiente. Centrifugue durante 60 minutos a 4000 rpm a +15 °C. Retire 1,8 mL del sobrenadante y analice el contenido de fósforo.

- Tercera etapa: polisacáridos conjugados

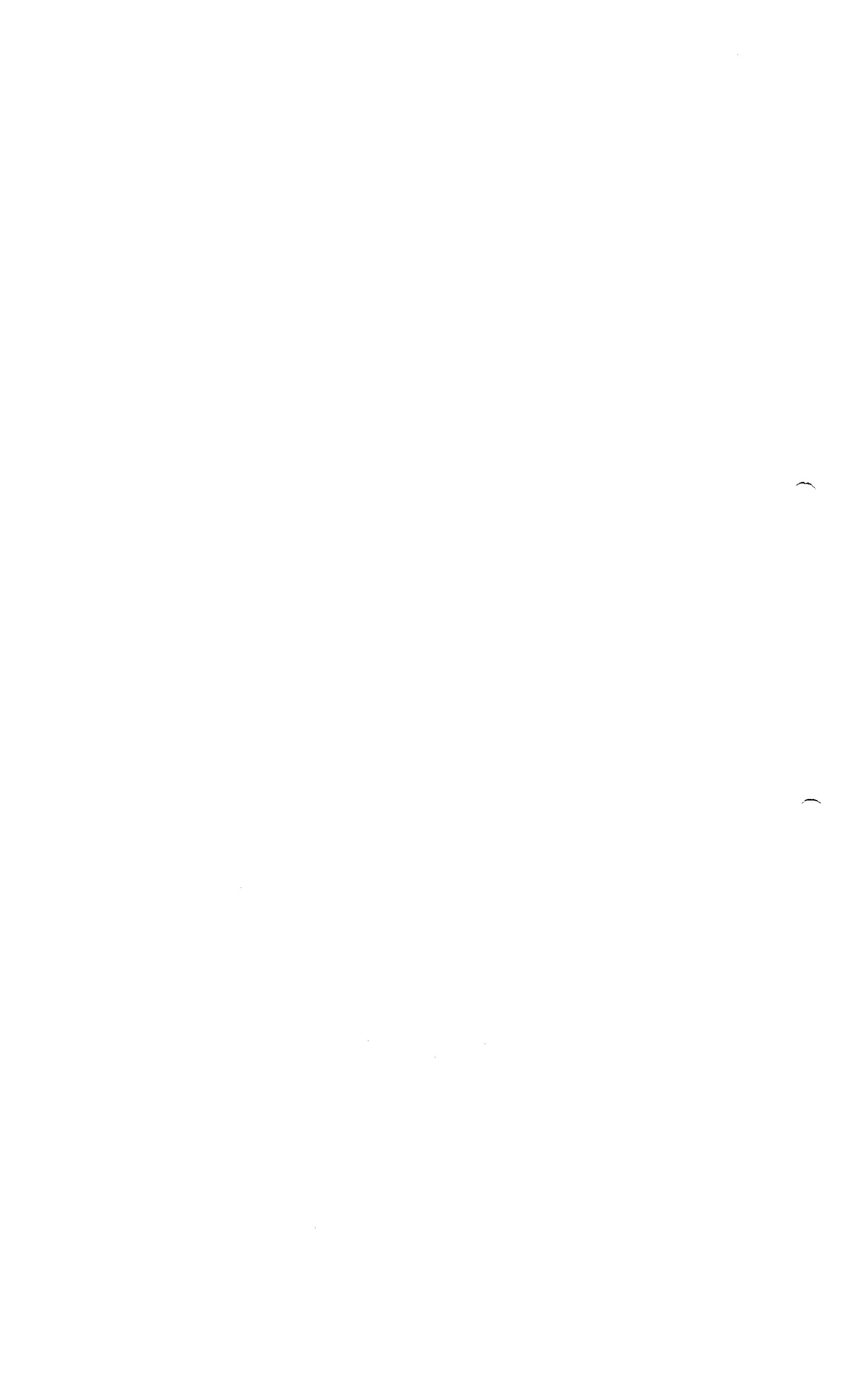
Agregue 0,5 mL de NaOH 1 N a los sedimentos de los tubos anteriores que contienen 0,2 mL de sobrenadante. Agite con el agitador Vibrax durante 60 min. a temperatura ambiente. Agregue 1,25 mL de agua purificada. Agitar con el mezclador de vórtice. El volumen final es de 2 mL. Analice el contenido de fósforo. Realice 2 ensayos para cada uno de los 3 tubos.

- Análisis del fósforo

El contenido del fósforo se determina en las diferentes etapas del procedimiento, al igual que en la solución de PRP-T antes de la primera precipitación según el procedimiento operativo que se describe en la sección 3.2.S.4.2 Procedimientos analíticos del capítulo proporción polisacáridos/proteínas. Las muestras de prueba que se deben utilizar se presentan a continuación.

Tabla 2: Muestras de prueba

Paso	Tampón de control (mL)	PRP-T (mL)	Cantidad total de ensayos por producto
Producto antes de la precipitación	-	0,1	4
Sobrenadante de la 1.ª etapa	1,5	1,5	6
Sobrenadante del 2º paso	-	0,7	3
Sedimento de la 3.ª etapa	-	0,1	6



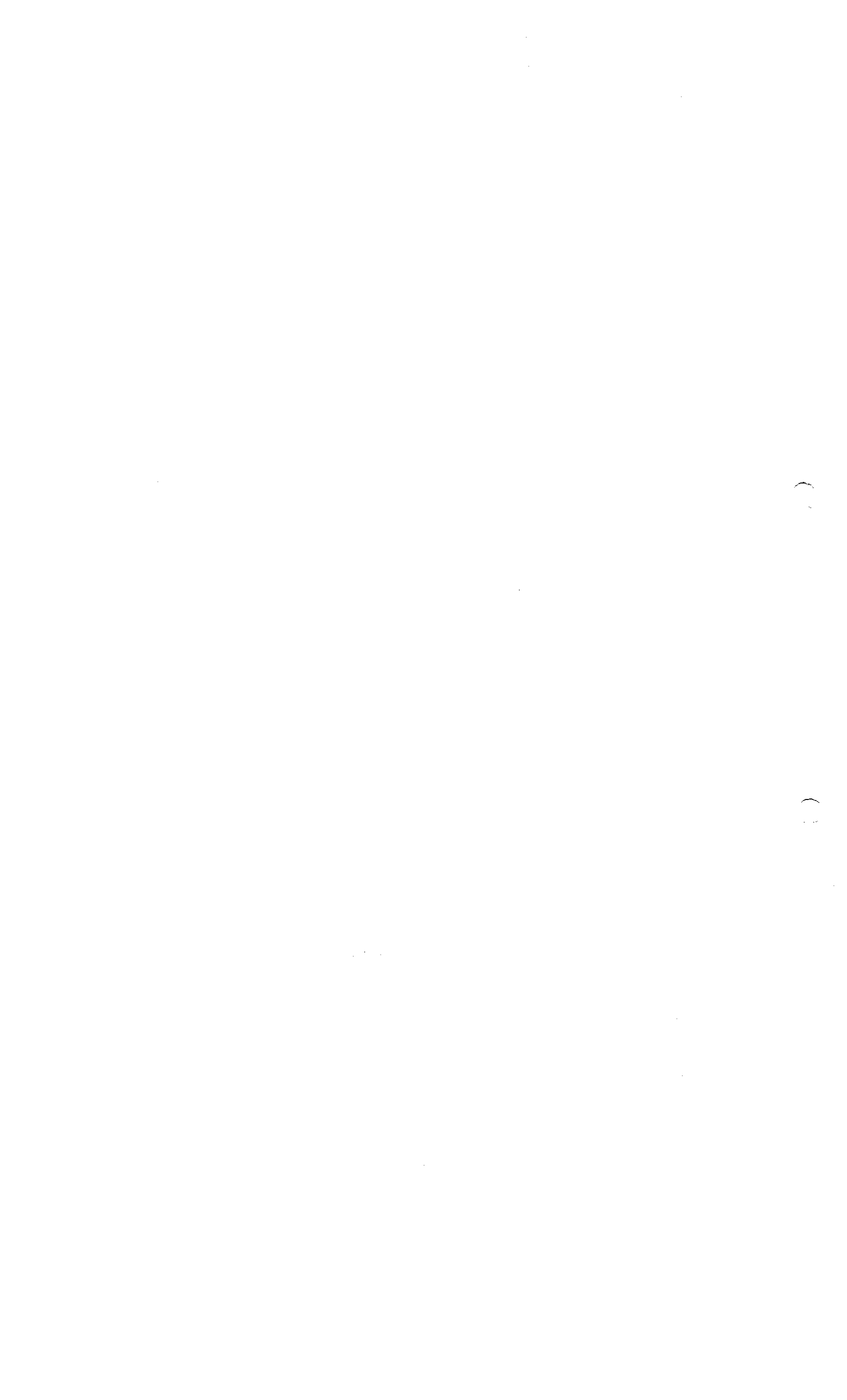
**Lectura, cálculo, resultados**

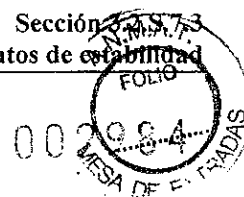
Las etapas de coloración y lectura se pueden automatizar usando un PLC. Las absorbancias se leen a 825 nm en envases de trayecto óptico de 20 mm. Establezca la regresión lineal de la línea de calibración y deduzca el coeficiente de correlación. Con el valor de DO de la prueba y la línea de calibración, deduzca la cantidad de fósforo de las 3 fracciones obtenidas (oligosacáridos libres, polisacáridos libres y polisacáridos conjugados).

- Calcule el contenido total recuperado de fósforo como la suma del contenido de fósforo de los oligosacáridos libres, los polisacáridos libres y los polisacáridos conjugados.
- Calcule el producto del análisis como el contenido de fósforo total recuperado entre el contenido de fósforo de la solución inicial de PRP-T (sometida a precipitación).
- Calcule el contenido de polisacárido conjugado de alto peso molecular como el contenido de fósforo analizado en la etapa 3 (polisacáridos conjugados) sobre el contenido total de fósforo recuperado.

Criterios de validez

El rendimiento del análisis debe ser igual o mayor al 80%.





1.2 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 para la liberación.

Los datos de validación de la distribución de tamaño molecular por LP-SEC y el contenido de sacarosa se presentan a continuación.

1.2.1 Validación del procedimiento analítico para la distribución del tamaño molecular mediante LP-SEC

Distribución del tamaño molecular (porcentaje de polisacáridos eluidos antes de un K_D de 0,20) por cromatografía de baja presión de exclusión por tamaño. Dado que la prueba corresponde a una medición física, el parámetro estudiado fue la precisión (repetibilidad y precisión intermedia).

Resumen

Se presenta un resumen de la validación en la tabla 3.

Tabla 3: Distribución del tamaño molecular mediante LP-SEC: validación, resumen

Características	Criterios de aceptación	Resultados
Precisión	El coeficiente de variación para la precisión intermedia debe ser inferior o igual al 15%	Los parámetros de repetibilidad y precisión intermedia son respectivamente iguales a: - Coeficiente de variación: 1,4 % y 2,6 % - Intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia para 1 medición que se realiza de la manera habitual: $\pm 2,7\%$

Precisión

Se analizaron cinco grupos bajo condiciones de precisión intermedia: las corridas se llevaron a cabo de manera independiente utilizando el mismo método, en una muestra primaria homogénea y las realizaron 3 operadores en diferentes días.

En tres grupos, se llevaron a cabo 3 corridas bajo 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 los mismos equipos y los realizó el mismo operador en un lapso corto de tiempo. En dos grupos, se llevaron a cabo 2 corridas en condiciones que garanticen la repetibilidad debido a un resultado cromatográfico inválido (vea los detalles de estos criterios de validez en el método analítico).

Las moléculas se separan mediante LP-SEC y se detectan mediante UV. Para cada corrida, se determina el porcentaje del polisacárido eluido antes de K_D de 0,20 mediante la prueba del fósforo. Los resultados se presentan en la tabla siguiente.

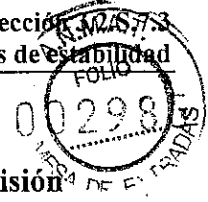


Tabla 4: Distribución del tamaño molecular mediante LP-SEC: validación, precisión

Grupo 1 (%)	Grupo 2 (%)	Grupo 3 (%)	Grupo 4 (%)	Grupo 5 (%)
75,5	74,1	76,1	74,2	75,8
73,1	76,4	76,6	75,0	77,7
/	/	75,4	75,2	76,0

Se verifica la homogeneidad de las varianzas intragrupalas mediante una prueba de Cochran a un nivel de significancia del 5 %. Se calcularon los parámetros de repetibilidad y precisión intermedia mediante el cálculo de varianza (varianza de repetibilidad en los grupos completos, varianza entre grupos y varianza de precisión intermedia). Se determinó el intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia con la prueba de la t en un nivel de significancia del 5% con varianzas de repetibilidad e intergrupales.

Las características de repetibilidad y precisión intermedia, y el intervalo de confianza del 95 % para 1 medición se describen en la siguiente tabla.

Tabla 5: Características de repetibilidad y precisión intermedia

Características	Desviación estándar	Coefficiente de variación	Intervalo de confianza del 95 %
Características de repetibilidad	1,06	1,40 %	/
Características de precisión intermedia	1,22	1,62%	± 2,66 %

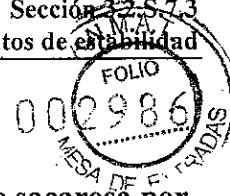
El coeficiente de variación de la precisión intermedia es inferior al 15 %.

Conclusión

Se validó la especificidad del método. Los coeficientes de variación de repetibilidad y precisión intermedia son, aproximadamente, del 1,4 % y 1,6 %, respectivamente, y el intervalo de confianza de la precisión intermedia es de ±2,7 % para 1 corrida.

El método para determinar la distribución del tamaño molecular (porcentaje del polisacárido eluido antes de K_D de 0,20) en el PRP-T mediante LP-SEC y la detección UV es válido.





1.2.2 Validación del procedimiento analítico para determinar el contenido de sacarosa por colorimetría tras la reacción enzimática

Se ha validado el método para determinar el contenido de sacarosa en el PRP-T mediante colorimetría tras la reacción enzimática. Dado que la prueba es un ensayo cuantitativo, los parámetros estudiados fueron linealidad, exactitud y precisión. La especificidad no se estudió ya que la longitud de onda de 340 nm no es específica del complejo analizado.

Resumen

A continuación se presenta un resumen de la validación.

Tabla 6: Contenido de sacarosa por colorimetría: Validación, resumen

Características	Criterios de aceptación	Resultados
Linealidad	Significancia de la pendiente: $P_{\text{linealidad}} < 0,01$ No hay desviación de la linealidad: $P_{\text{desviación de la linealidad}} > 0,05$	$P_{\text{linealidad}} < 0,0001$; $P_{\text{desviación de la linealidad}} = 0,63$ Después del ajuste lineal de Y = concentración medida en función de X = dilución teórica, se destaca la siguiente relación: $Y = -4,558 + 8382,099 X$, coeficiente de correlación = 0.9952 Rango de linealidad: [36,3 – 139,0] g/L
Exactitud	La recuperación porcentual media calculada para los 4 niveles teóricos de concentración está incluida entre el 90% y el 110%.	La recuperación porcentual promedio y sus límites de confianza del 95 % son los siguientes: 102,0% [97,9% - 106,2%]
Precisión	El coeficiente de variación de la precisión intermedia es $\leq 10 \%$.	Los parámetros de repetibilidad y precisión intermedia son respectivamente iguales a: - Coeficiente de variación: 3,8% - intervalos de confianza del 95 % de precisión intermedia para 1 corrida con una medición realizada de la manera habitual: ± 6 g/L

Linealidad

Tres operadores realizaron tres corridas independientes en tres días distintos. Cada serie incluyó un rango de 5 diluciones de solución de PRP-T, lo cual corresponde a 5 concentraciones de sacarosa.

En el uso cotidiano, la solución de PRP-T generalmente se diluye a 1:100. Las soluciones sometidas a análisis de linealidad corresponden a una dilución de la solución de PRP-T que permiten encuadrar del 60 % al 160 % de la dilución aplicada de manera rutinaria. Los resultados y la preparación de las diluciones se presentan en la siguiente tabla.



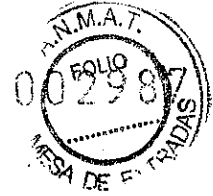


Tabla 7: Contenido de sacarosa por colorimetría: Validación

Dilución	Grupo 1 (g/L)	Grupo 2 (g/L)	Grupo 3 (g/L)
0,6:100	47,67	48,08	45,45
0,8:100	64,32	64,98	54,97
1,0:100	80,16	74,58	78,84
1,3:100	103,46	106,25	107,23
1,6:100	127,17	128,48	132,75

Se verifica la homogeneidad de los resultados de las varianzas mediante una prueba de Cochran a un nivel de significancia del 5 %. La dependencia entre las diluciones teóricas y las concentraciones medidas, y la linealidad de esta relación se someten a prueba mediante una regresión lineal no ponderada usando el método de los mínimos cuadrados.

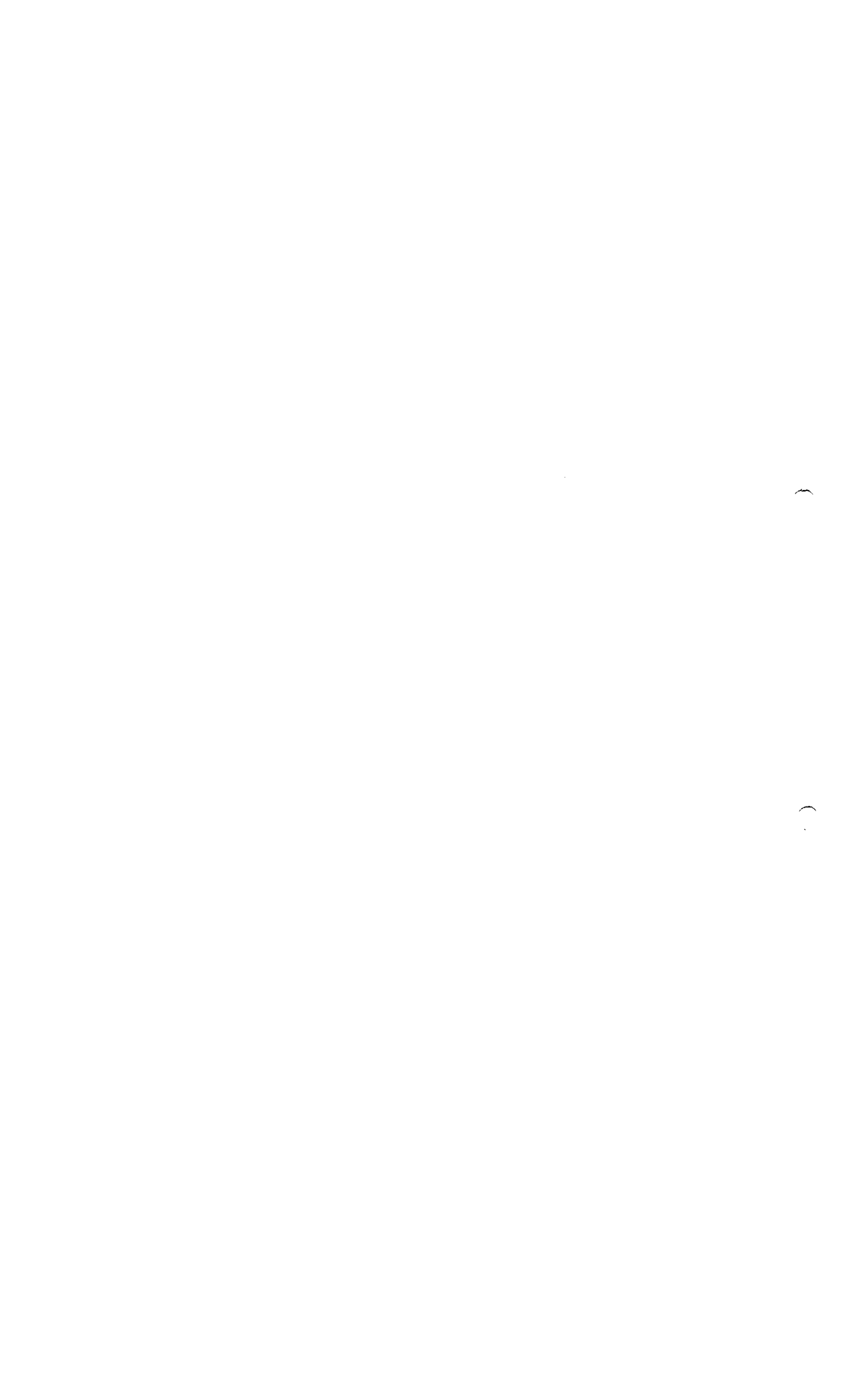
El análisis de varianzas permite concluir la significancia de la pendiente ya que el valor P de linealidad usando la tabla Snedecor a un nivel de significancia del 1 % es inferior al 1 % (valor $P < 0,0001$), y una desviación no significativa de la linealidad ya que el valor P de la falta de ajuste de la linealidad con la tabla Snedecor al 5 % es superior al 5 % (valor $P = 0,63$).

La ecuación de la recta de regresión es:

$$Y = (-4,558 \pm 5,498) + (8382,099 \pm 491,728) \cdot X$$

Donde:

- X: dilución teórica (g/L)
- Y: concentración medida (g/mL)
- Coeficiente de correlación lineal: $r = 0,9952$ con 13 grados de libertad
- Rango de linealidad: [36,3 – 139,0] g/L



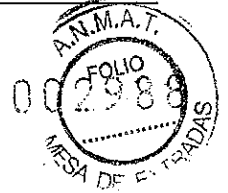
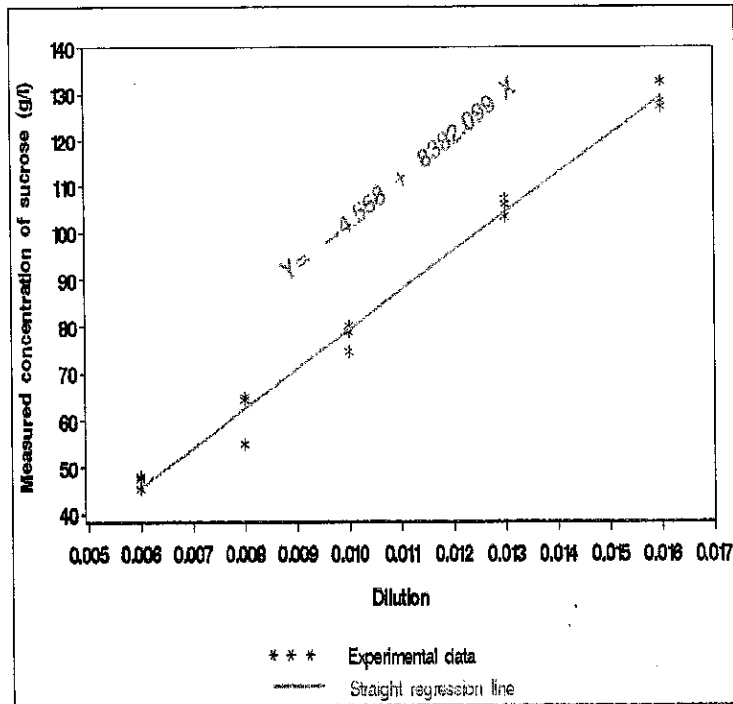


Figura 1: Gráfico de linealidad



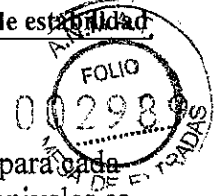
Exactitud

Los datos analizados corresponden a los factores de concentración medida con base en los resultados obtenidos en la prueba de linealidad. Los factores de concentración teórica corresponden a la proporción de la dilución de la solución de PRP-T sometida a análisis con la dilución de de PRP-T a razón de 1:100 (dilución aplicada durante el uso rutinario). Los factores de dilución medidos corresponden a la razón del contenido de sacarosa obtenido a la dilución analizada entre el contenido de sacarosa obtenido con una dilución de PRP-T de 1:100. Los resultados del factor de dilución a los cuatro niveles en cuestión se presentan en la siguiente tabla.

Tabla 8: Contenido de sacarosa por colorimetría: Validación, exactitud

Factor de dilución teórico	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
0,60	0,595	0,645	0,576
0,80	0,802	0,871	0,697
1,30	1,291	1,425	1,360
1,60	1,586	1,723	1,684





Se calculan las recuperaciones porcentuales entre la concentración teórica y la medida para cada nivel de concentración y para todos los grupos. La homogeneidad de las varianzas intraniveles se verifica mediante la prueba de Cochran con un nivel de significación del 5 %. Se demuestra la igualdad de las medias entre los niveles mediante el análisis de varianza y se calcula la recuperación porcentual media con los límites de confianza del 95%:

Tabla 9: Recuperación porcentual media

Recuperación porcentual media	Límites de confianza del 95 %
102,0%	[97,9 – 106,2] %

La recuperación porcentual media está entre el 90 % y el 110 %.

Precisión

Se analizaron tres grupos bajo condiciones de precisión intermedia: los análisis se llevaron a cabo de manera independiente en una muestra primaria homogénea, en el mismo laboratorio, y los realizaron 3 operadores en diferentes días.


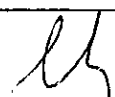
Dentro de cada grupo, se llevaron a cabo 6 análisis bajo condiciones que garantizaban la repetibilidad: los análisis se llevaron a cabo de forma independiente utilizando el mismo método, en una muestra primaria homogénea, en el mismo laboratorio, con los mismos equipos y los realizó el mismo operador en un solo día.

Los datos generados corresponden al contenido de sacarosa de la solución de PRP-T (expresado en g/L). Los resultados se presentan en la tabla 10.

Tabla 10: Contenido de sacarosa por colorimetría: Validación, precisión

Grupo 1 (g/L)	Grupo 2 (g/L)	Grupo 3 (g/L)
80,16	74,58	78,84
79,99	79,75	81,80
81,47	79,50	82,29
76,96	80,16	82,04
82,13	80,73	70,89
80,24	80,16	81,06

Se verifica la homogeneidad de las varianzas intragrupalas mediante una prueba de Cochran a un nivel de significancia del 5 %. Se calcularon los parámetros de repetibilidad y precisión intermedia mediante el cálculo de varianza (varianza de repetibilidad en los grupos completos, varianza entre grupos y varianza de precisión intermedia). Se determinó el intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia con la prueba de la t a un nivel de significancia del 5% para


 ROXANA MONTEMILONE
 DIRECTORA TÉCNICA
 SANOFI PASTEUR S.A.

 CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
 OPERARIO
 SANOFI PASTEUR S.A.



una corrida con una medición (realizada de la manera habitual) con varianzas de repetibilidad e intergrupales.

Las características de repetibilidad y precisión intermedia, así como el intervalo de confianza del 95 % para una corrida con una medición se presentan en la tabla 11.

Tabla 11: Características de repetibilidad y precisión intermedia

Características	Desviación estándar	Coefficiente de variación (%)	Intervalo de confianza del 95 %
Características de repetibilidad	3,036	3,81%	/
Características de precisión intermedia	3,036	3,81%	± 6 g/L

El coeficiente de variación de la precisión intermedia es inferior al 10%.

Conclusión

El método es lineal en el rango: [36,3 – 139,0] g/L. La exactitud se prueba en el mismo rango, con una recuperación promedio del 102,0%. El método es preciso: La repetibilidad y los coeficientes de variación de la precisión intermedia son de alrededor del 3,8 % y el intervalo de confianza de la precisión intermedia es ± 6 g/L para una corrida con una medición realizada de la manera habitual.

El método colorimétrico tras la reacción enzimática es válido para cuantificar la sacarosa en el PRP-T.

1.2.3 Validación del procedimiento analítico para determinar el contenido del polisacárido conjugado de alto peso molecular

Se ha validado el procedimiento analítico para determinar el contenido de polisacárido conjugado de alto peso molecular en el PRP-T. Dado que el procedimiento analítico es un análisis cuantitativo, el parámetro estudiado fue la precisión (repetibilidad y precisión intermedia).

Resumen

Se presenta un resumen de la validación en la tabla 12.

Tabla 12: Polisacárido conjugado de alto peso molecular por precipitación/centrifugación; validación, resumen

Características	Criterios de aceptación	Resultados
Precisión	El coeficiente de variación para la precisión intermedia debe ser inferior o igual al 20%	Los parámetros de repetibilidad y precisión intermedia son respectivamente iguales a: - Coeficiente de variación: 8,3% y 8,3% - intervalos de confianza del 95 % de precisión intermedia para 1 corrida con una medición realizada de la manera habitual: ± 24%



Precisión

Se analizaron dos grupos bajo 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 2 operadores en 2 diferentes días.

Dentro de cada grupo, se llevaron a cabo 3 análisis bajo condiciones que garantizaban la repetibilidad: los análisis se llevaron a cabo en forma independiente utilizando el mismo método, en una muestra primaria homogénea, en el mismo laboratorio, con los mismos equipos y los realizó el mismo operador en un período corto.

Los datos analizados son el porcentaje de polisacárido conjugado de alto peso molecular, los resultados se presentan en la tabla 13.

Tabla 13: Polisacárido conjugado de alto peso molecular; validación, precisión

Grupo 1 (%)	Grupo 2 (%)
95,0	94,9
94,9	81,0
94,6	93,4

Se verifica la homogeneidad de las varianzas intragrupalas mediante una prueba de Fisher-Snedecor. Se calcularon los parámetros de repetibilidad y precisión intermedia mediante el cálculo de varianza (varianza de repetibilidad en los grupos completos, varianza entre grupos y varianza de precisión intermedia). Se determinó el intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia con la prueba de la t a un nivel de significancia del 5 % con varianzas de repetibilidad e intergrupales.

Las características de repetibilidad y precisión intermedia, así como el intervalo de confianza del 95% para una corrida con una medición realizada de la manera habitual se describen en la tabla 14.

Tabla 14: Características de repetibilidad y precisión intermedia

Características	Desviación estándar	Coefficiente de variación	Intervalo de confianza del 95 %
Características de repetibilidad	7,63	8,27%	/
Características de precisión intermedia	7,63	8,27%	± 24,28%

El coeficiente de variación de la precisión intermedia es inferior al 20%.

