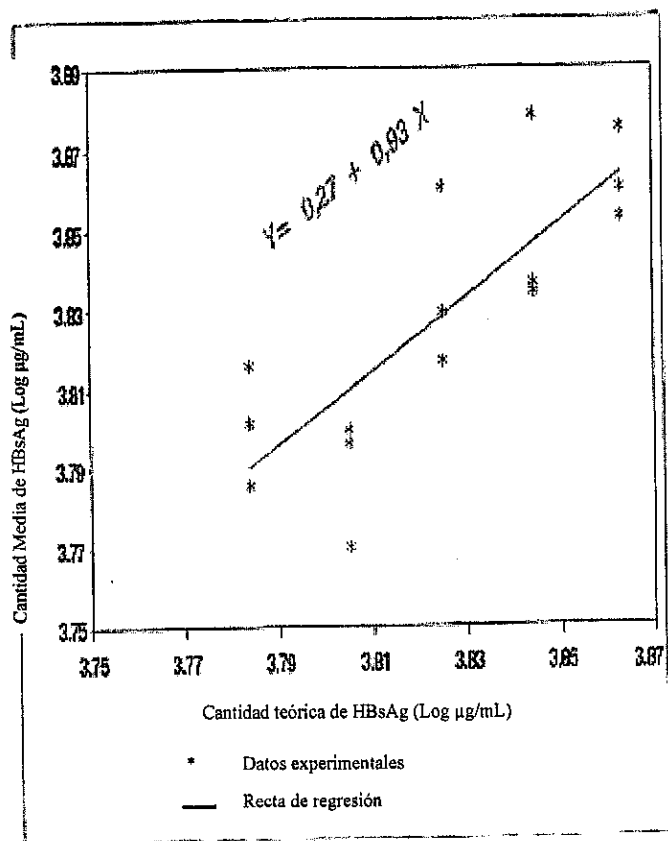


Figura 1: Linealidad, contenido de HBsAg



Los datos obtenidos del estudio de linealidad son homogéneos. Cumplen con la prueba de Cochran de homogeneidad de varianzas límite. El análisis de la varianza permite llegar a la conclusión de que la pendiente obtenida es significativa.

El método es lineal en un rango de 5360 µg/mL a 8410 µg/mL correspondiente a [4806 - 7147] µg/mg de proteínas totales.

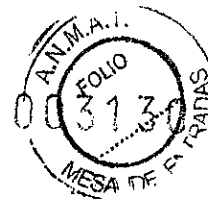
### 2.1.2.3 Exactitud

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

Cada corrida incluía un rango de 4 concentraciones de HBsAg. A una cantidad fija de muestra de HBsAg se le agregaron 4 niveles incrementales de estándar de HBsAg.

Los datos analizados son los obtenidos para la especificidad y se presentan en la Tabla 9.





### 2.1.2.3.1 Análisis

La exactitud se prueba mediante los siguientes pasos:

- El porcentaje de recuperación entre las cantidades medidas y teóricas de HBsAg se calcula para cada serie.
- Se verifica la homogeneidad de varianzas dentro de los niveles mediante la prueba de Cochran.
- Cuando se demuestra la homogeneidad, se prueba la equivalencia entre los niveles de concentración teórica y la concentración medida, mediante un análisis de varianza.
- Cuando se comprueba la igualdad de las medias interniveles, el porcentaje de recuperación promedio global se calcula con los límites de confianza del 95 %.

La recuperación porcentual y sus límites de confianza del 95 % se presentan en la tabla 11.

**Tabla 11: Exactitud: Porcentaje de recuperación promedio por nivel de concentración**

Recuperación porcentual	Límites de confianza del 95 %
100,84 %	[98,30 - 103,39] %

La recuperación porcentual promedio queda incluida entre el 80 % y el 120 %.

### 2.1.2.4 Precisión

La precisión se estudia al nivel de precisión intermedia y repetibilidad.

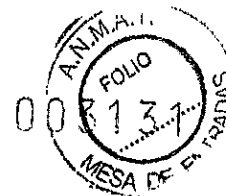
El diseño experimental fue el siguiente:

- Se realizaron 3 series bajo condiciones de precisión intermedia: Dos operadores llevaron a cabo los análisis en forma independiente, con el mismo método, sobre una muestra homogénea, en el mismo laboratorio, en días diferentes.
- Dentro de cada serie, se llevaron a cabo 6 análisis bajo condiciones que garantizaban la repetibilidad: el mismo operador llevó a cabo los análisis en forma independiente, siguiendo el mismo método, sobre una muestra homogénea, en el mismo laboratorio, con los mismos equipos, en 3 días.

#### 2.1.2.4.1 Resultados analíticos

Los datos sometidos a análisis son el contenido de HBsAg presente en la muestra, expresado en  $\mu\text{g/mL}$ , y se presentan en la tabla 12.





**Tabla 12: Precisión: Concentración de HBsAg (µg/mL)**

Prueba	Serie 1 µg/mL	Serie 2 µg/mL	Serie 3 µg/mL
1	6414	5741	6093
2	6397	6220	6765
3	6165	6390	6039
4	6127	6148	6493
5	6264	6188	6479
6	6449	6209	6336

**2.1.2.4.2 Análisis**

La precisión del método se prueba mediante los siguientes pasos, aplicados a los datos de la tabla 12.

- La homogeneidad de las varianzas dentro de los grupos se verifica mediante la prueba de Cochran.
- Una vez adquirida la homogeneidad, se calculan los parámetros de repetibilidad y precisión intermedia.

Las características de repetibilidad y precisión intermedia, así como el intervalo de confianza del 95 % correspondiente a 1 corrida con 1 medición realizada de la manera habitual, se presentan en la Tabla 13.

**Tabla 13: Precisión: Características de repetibilidad y precisión intermedia**

Características	Varianza	Desviación estándar	Intervalo de confianza del 95 % para el análisis de rutina
Características de repetibilidad	0,000226	0,015	/
Características de precisión intermedia	0,000248	0,016	± 0,033 es decir, x/+ 1,08 en expresión aritmética

**2.1.2.5 Conclusión**

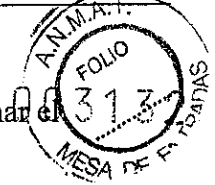
De acuerdo con los resultados obtenidos y evaluando los criterios de aceptación establecidos, el contenido de HBsAg analizado con el kit Monolisa Plus es específico.

El método es lineal en el rango [5360 - 8410] µg/mL de HBsAg equivalente a [4806 - 7147] µg/mg de proteínas totales.

La exactitud se demuestra en el mismo rango, con una recuperación porcentual promedio del 101 %.

La repetibilidad y la precisión intermedia son aceptables: El intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia para 1 corrida con 1 medición es x/+ 1,08. La precisión del método se considera satisfactoria.





De acuerdo con los resultados obtenidos, el método se considera válido para determinar el contenido de HBsAg en el principio activo HBsAg.

## 2.2 Identificación del HBsAg: Western blot

### 2.2.1 Resumen de los procedimientos analíticos

Esta prueba se utilizó con los lotes de la segunda y la tercera serie de producción como prueba de identificación. En la especificación de liberación declarada, se reemplazó por una combinación de ELISA y prueba de pureza con SDS-PAGE para verificar los pesos moleculares del HBsAg.

#### 2.2.1.1 Principio

La identificación del HBsAg se realizó mediante un análisis Western Blot utilizando el gel de la prueba de pureza (SDS-PAGE en condiciones reductoras).

Después del análisis SDS-PAGE en condiciones reductoras, las proteínas se transfieren a una membrana de nitrocelulosa. Se realiza la inmunodetección de los polipéptidos de HBsAg con un anticuerpo anti-HBsAg. El revelado se obtiene por medio de un anticuerpo anti-IgG, unido a fosfatasa alcalina. Al agregar un sustrato cromogénico adecuado, se revelan las bandas.

#### 2.2.1.2 Equipo

- Equipo estándar de laboratorio
- Unidad de electroforesis horizontal
- Agitador orbital
- Baño de calor seco a 100°C
- Unidad de transferencia semiseca
- Horno de hibridización con agitador
- Equipo para retirar películas
- Hojas de papel secante
- Membrana de nitrocelulosa de 0,45 µm





### 2.2.1.3 Reactivos

- Kit de inmunodetección Western Breeze Chromogenic Western Blot o equivalente
- Tris (hidroximetil) aminometano
- Glicina
- Marcadores de bajo peso molecular (LMW) de rango completo
- Anticuerpo contra el HBsAg de conejo, con superficie de subtipo ad y ay (fracción IgG, monoespecífico)
- Metanol
- Ácido acético
- Agua purificada

### 2.2.1.4 Procedimientos operativos

#### 2.2.1.4.1 Preparación de soluciones y tampones

Las cantidades se proporcionan a modo de ejemplo y, si es necesario, se pueden multiplicar o por un factor determinado o dividirse entre dicho factor.

- Solución Tris-glicina:
  - Tris..... 24 g
  - Glicina ..... 112 g
  - Agua purificada ..... hasta 100 mL
- Solución de transferencia:
  - Tampón Tris-glicina ..... 100 mL
  - Metanol..... 200 mL
  - Agua purificada ..... hasta 100 mL
- Solución de bloqueo: preparada según las instrucciones del fabricante a partir de las soluciones suministradas en el kit cromogénico Western Breeze
- Solución de anticuerpo primario:
  - Anticuerpo anti-HBsAg de conejo, fracción IgG ..... 20 µL
  - Solución de bloqueo ..... 10 mL

#### 2.2.1.4.2 Preparación de las muestras

La muestra de prueba y el control interno se diluyen a fin de obtener una concentración de proteínas totales cercana al 0,01 % (p/v).





#### 2.2.1.4.3 Electroforesis

Realicer la electroforesis SDS-PAGE en condiciones reductoras con las soluciones de testigo, control interno, muestra y marcadores de LMW de rango completo como se describe en la prueba “Pureza mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras”, que se presenta en la sección 3.2.S.4.2 Procedimientos analíticos.

#### 2.2.1.4.4 Análisis Western Blot

##### *Transferencia del gel a la membrana*

Moje el gel, las hojas de filtro de papel secante y la membrana de nitrocelulosa con el tampón de transferencia.

En la unidad de transferencia semiseca, coloque la pila de transferencia.

Moje la pila de transferencia con tampón de transferencia.

Realice la transferencia, aplicando una cantidad suficiente de corriente eléctrica considerando la superficie de la membrana. Realice la transferencia durante 1 hora.

##### *Inmunodetección*

Los pasos siguientes se llevan a cabo en un horno de hibridación a  $+37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  bajo agitación.

Bloquear la membrana de nitrocelulosa con la solución de bloqueo durante 30 minutos.

Lave con agua purificada.

Incube la membrana con la solución de anticuerpo primario durante 1 hora a  $+37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

Lave la membrana con solución de lavado.

Incube la membrana con el anticuerpo secundario, provisto con el kit, durante 30 minutos.

Lave la membrana con solución de lavado.

Enjuague la membrana con agua purificada.

Realice la incubación con la solución del sustrato cromogénico provisto con el kit hasta que aparezca la banda color púrpura (el tiempo de reacción aproximado es 10 – 15 minutos).

Detenga la reacción enjuagando la membrana con agua purificada.

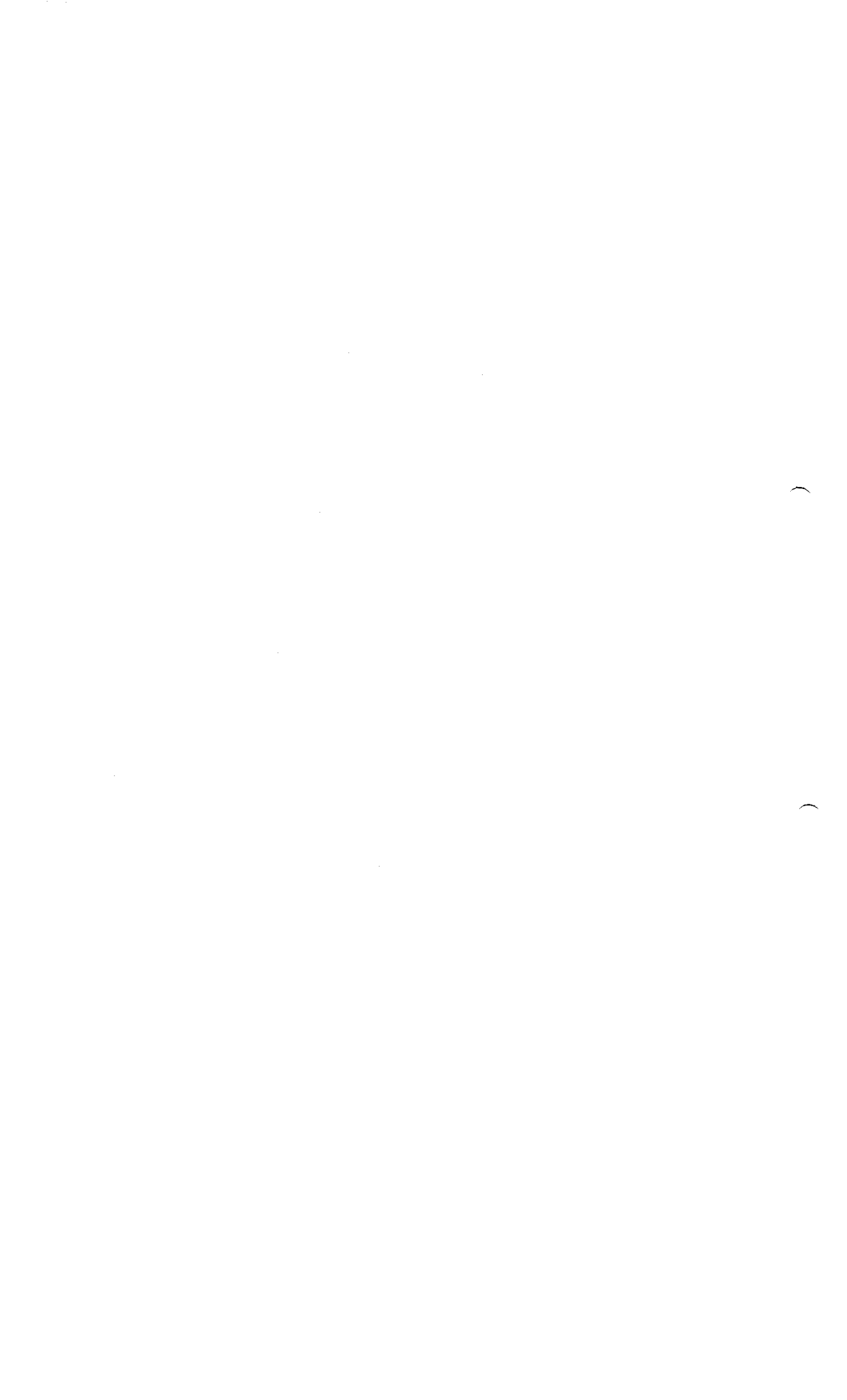
Luego seque y guarde la membrana.

#### 2.2.1.5 Lectura, cálculos y resultados

La lectura de la membrana es visual.

Las bandas características del HBsAg se identifican tal como se detalla a continuación:

- Presencia de monómero alrededor de 23 kDa;
- Presencia de bandas que corresponden al dímero alrededor de 46 kDa (banda simple o bandas dobles);





- Posible presencia de trímero alrededor de 65 kDa.

### 2.2.1.6 Criterios de validez

- Los marcadores de LMW de rango completo están presentes y distribuidos en un 80 % del gel;
- La solución de control interno debe mostrar las bandas características del HBsAg.

### 2.2.2 Validación del análisis Western Blot

Este capítulo describe la validación de la prueba de identificación realizada mediante el análisis Western Blot. De acuerdo con la guía de la ICH, la característica estudiada para una prueba de identificación es la especificidad (vea la Tabla 14).

El procedimiento analítico se describe en el capítulo 2.2.1.

**Tabla 14: Identificación mediante Western Blot, resumen de validación**

Características	Criterios de aceptación	Resultados
Especificidad	La incubación con anti-HBsAg revela la presencia de bandas específicas de HBsAg en la muestra de HBsAg:	
	Banda de monómero de aproximadamente 23 kDa,	Cumple
	Bandas de dímero, juntas o separadas, de aproximadamente 46 kDa	Cumple
	Posible banda de un trímero de aproximadamente 65 kDa	Cumple
	La incubación con anti-HBsAg no revela la presencia de bandas en el preparado de <i>Hansenula polymorpha</i> (simulación).	Cumple

#### 2.2.2.1 Especificidad

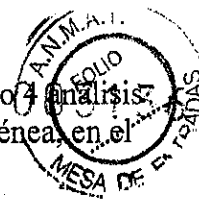
A fin de evaluar la especificidad del método, se llevó a cabo un análisis SDS-PAGE en condiciones reductoras con las 2 muestras siguientes:

- Una muestra de HBsAg;
- El preparado de simulación se obtiene a partir de una producción de células de *Hansenula polymorpha* sin el gen que codifica el HBsAg que se sometió a los distintos pasos de purificación hasta la etapa de la cromatografía de intercambio iónico (preparado de simulación). La fracción utilizada como muestra de control era la fracción de la cromatografía de intercambio iónico; tomando en cuenta el contenido proteico total, se realizaron las diluciones como con la muestra.

Luego de la transferencia para la electroforesis en una membrana de nitrocelulosa, la membrana se incubó con anti-HBsAg.

El objetivo era demostrar que el Ac anti-hepatitis B es específico y por consiguiente sólo revela bandas en la muestra de HBsAg y no en la muestra del preparado de simulación, es decir, la muestra de proteínas de *Hansenula polymorpha*.





El diseño experimental fue el siguiente: Cuatro operadores distintos llevaron a cabo 4 análisis independientes, con el mismo método, en días diferentes, sobre una muestra homogénea, en el mismo laboratorio.

**Tabla 15: Especificidad**

Muestra	Revelado			
	Serie 1	Serie 2	Serie 3	Serie 4
Muestra de HBsAg	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia
Muestra de <i>Hansenula polymorpha</i> (preparado de simulación)	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia

La ausencia de reacción cruzada entre el anticuerpo anti-hepatitis B y las proteínas de *Hansenula polymorpha* demuestra que este anticuerpo es específico y se puede utilizar para realizar la prueba de identificación con Western Blot.

### 2.2.2.2 Conclusión

Conforme a los resultados obtenidos y los criterios de aceptación establecidos, se demuestra que el método de identificación del HBsAg mediante Western Blot es específico.

## 2.3 Análisis de polipéptidos

### 2.3.1 Resumen de los procedimientos analíticos

Esta prueba se realizó con los lotes de la segunda serie de producción. No está incluida en la especificación de liberación declarada.

#### 2.3.1.1 Principio

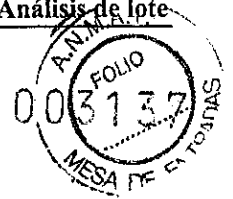
El análisis de los polipéptidos de HBsAg se realiza utilizando la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) en condiciones no reductoras.

Primero, los polipéptidos que constituyen las partículas de HBsAg se desnaturalizan calentando la muestra en el tampón de SDS (agente desnaturalizante).

Luego, se disgregan los enlaces disulfuro de la proteína en presencia del agente reductor DTT (ditiotreitól).

Por último, el tampón de SDS invierte la carga de las proteínas (carga negativa), lo cual permite que migren hacia el ánodo. Los polipéptidos migran a través del gel de SDS-PAGE según su peso molecular. Luego de la migración, se procede al revelado mediante tinción de plata.





### 2.3.1.2 Equipos

- Equipo estándar de laboratorio
- Unidad de electroforesis horizontal
- Baño de calor seco
- Agitador rotatorio
- Equipo para retirar películas
- Secador de gel
- Densitómetro

### 2.3.1.3 Reactivos

- Gel homogéneo de poliacrilamida al 12,5 % para SDS-PAGE horizontal
- Tiras de tampón para SDS-PAGE horizontal
- Tris (hidroximetil) aminometano
- Ditioneitol (DTT)
- Dodecil sulfato de sodio (SDS)
- Marcadores de bajo peso molecular (LMW) de rango completo: rango de [14,4 – 97,0] kDa
- Azul de bromofenol
- Acetato de sodio 3 H<sub>2</sub>O
- Glutaraldehído al 25 % p/p
- Tiosulfato de sodio 5 H<sub>2</sub>O
- Nitrato de plata
- Formaldehído al 37 % p/p
- Carbonato de sodio anhidro
- Ácido acético
- Sal disódica de ácido tetraacético. 2 H<sub>2</sub>O (EDTA-Na<sub>2</sub> 2 H<sub>2</sub>O)
- Etanol
- Agua purificada





### 2.3.1.4 Procedimiento operativo

#### 2.3.1.4.1 Preparación de soluciones y tampones

Las cantidades se proporcionan a modo de ejemplo y, si es necesario, se pueden multiplicar por un factor determinado o se pueden dividir entre dicho factor.

- Solución madre de tampón tris-acético: Se disuelve tris en agua purificada (6,6 % p/v).
- Solución de SDS: Se disuelve SDS en agua purificada (10 % p/v).
- Solución de azul de bromofenol: Se disuelve azul de bromofenol en agua purificada (1 % p/v).
- Solución no reductora:
  - Solución madre de tampón tris-acético ..... 5 mL
  - Solución de SDS ..... 5 mL
  - Solución de azul de bromofenol ..... 500 µL
  - Agua purificada ..... hasta 50 mL
- Solución reductora para electroforesis: Se disuelve DTT en tampón de solución no reductora (30,8 g/l) preparado extemporáneamente.
- Solución fijadora:
  - Etanol ..... 400 mL
  - Ácido acético ..... 100 mL
  - Agua purificada ..... hasta 100 mL
- Solución de incubación para tinción de plata:
  - Acetato de sodio 3 H<sub>2</sub>O ..... 17 g
  - Tiosulfato de sodio 5 H<sub>2</sub>O ..... 0,5 g
  - Etanol al 96 % ..... 75 mL
  - Agua purificada ..... hasta 250 mL

Antes de usar la solución, añadir glutaraldehído al 25 % p/p (1,3 mL).

- Solución para tinción de plata:
  - Nitrato de plata ..... 0,25 g
  - Agua purificada ..... hasta 250 mL

Antes de usar la solución, añadir formaldehído al 37 % p/p (50 µL).

- Solución de revelado:
  - Carbonato de sodio ..... 6,25 g
  - Agua purificada ..... hasta 250 mL





Antes de usar la solución, añadir formaldehído al 37 % p/p (25 µL).

• Solución de detención:

- Sal disódica de ácido tetraacético. 2 H<sub>2</sub>O.....3,65 g
- Agua purificada .....hasta 250 mL

### 2.3.1.4.2 Preparación de las muestras

Diluya la muestra y el control interno para obtener una concentración final de 0,007 % de proteínas totales.

Caliente las distintas soluciones (solución de muestra, solución de control interno, solución de estándar de referencia y solución testigo) por 5 minutos a +95°C.

Deje enfriar el contenido de cada tubo a temperatura ambiente.

### 2.3.1.4.3 Electroforesis

Prepare el gel para electroforesis.

Deposite una alícuota de cada solución en los pocillos del gel.

Realice la electroforesis hasta que la solución de azul de bromofenol llegue a la tira anódica.

El gel se fija con la solución fijadora aproximadamente por 30 minutos y se incuba en la solución de incubación para tinción de plata aproximadamente por 30 minutos.

Lavar el gel con agua purificada.

Dejar el gel en la solución para tinción de plata aproximadamente por 40 minutos.

Añadir solución de revelado durante 10 minutos como máximo.

Retirar la solución de revelado y añadir la solución de detención aproximadamente de 10 a 20 minutos.

Lavar el gel con agua purificada.

### 2.3.1.5 Lecturas, cálculos y resultados

La lectura e integración del gel se realiza con un densitómetro asociado con un sistema de software.

Los marcadores de LMW se emplean como referencia para calcular el peso molecular de las bandas.

Las bandas características del HBsAg se identifican por su peso molecular de la siguiente manera:

- Un monómero, banda en aproximadamente 23 kDa;
- Un dímero, bandas visualizadas como bandas simples o dobles, en aproximadamente 46 kDa;
- Una posible banda de trímero, en aproximadamente 65 kDa;
- Posiblemente otras bandas, cuyo peso molecular se registra.





### 2.3.1.6 Criterios de validez

- El marcador de peso molecular tiene tantas bandas como lo indica la especificación del fabricante y se distribuye en un 80 % del gel.
- El control interno de HBsAg presenta las bandas características del antígeno de la hepatitis B: un monómero (alrededor de 23 kDa), dímero (alrededor de 46 kDa) y un posible trímero (alrededor de 65 kD).

### 2.3.2 Validación del análisis de polipéptidos

Este capítulo describe la validación del ensayo de análisis de los polipéptidos mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras. Conforme a la guía de la ICH, dado que el método es cualitativo, sólo se estudia la especificidad.

El procedimiento analítico se describe en el capítulo 2.3.1.

#### 2.3.2.1 Especificidad

A fin de demostrar la especificidad, se analizaron las siguientes muestras:

- Solución testigo: solución reductora;
- Solución estándar de referencia: marcadores de LMW;
- Control interno: lote de producción de HBsAg;
- Muestra del proceso obtenida en distintos pasos de purificación (vea la sección 3.2.S.2.2 Reacción de purificación y modificación)
  - Muestra de desorbato crudo;
  - Fracción de cromatografía de intercambio iónico (IEC);
  - Fracción de KBr;
  - Fracción de cromatografía de filtración por gel (GFC);
- Muestra del principio activo HBsAg.

Los resultados correspondientes a cada solución analizada se presentan en la tabla 16.





**Tabla 16: Demostración de especificidad del análisis de polipéptidos**

Bandas	Desorbato crudo Etapa 1.8	Fracción de IEC Etapa 2.1	Fracción de KBr Etapa 2.4	Fracción de GFC Etapa 2.6	Principio activo HBsAg
Monómero (23 ± 2 kDa)	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia
Dímero (47 ± 3 kDa)	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia
Trímero (65 ± 4 kDa)	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia
Presencia de bandas no específicas	16 kDa, 34 kDa, 56 kDa, 59 kDa	16 kDa, 34 kDa, 56 kDa	19 kDa, 34 kDa	34 kDa	34 kDa

Las bandas específicas del HBsAg tienen pesos moleculares distintos de las bandas presentes en el proceso de monitoreo y las muestras de antígeno purificado final del mismo lote. En cada paso del proceso, se observa asimismo la mejora de la pureza dado que se detectan 4 “bandas diversas” en el desorbato clarificado ajustado, 3 en la fracción de IEC, 2 en la fracción de KBr y 1 en la fracción de GFC.

### 2.3.2.2 Conclusión

Considerando el peso molecular de las bandas, el método puede diferenciar bandas específicas de HBsAg respecto de otras bandas posibles presentes en la muestra.

El método es válido para realizar el análisis de polipéptidos del principio activo.

## 2.4 Contenido de bromuros

Esta prueba se realizó con los lotes de la segunda y la tercera serie de producción como prueba de liberación. Dado que está demostrada la uniformidad de la producción y de acuerdo con los requisitos regulatorios, esta prueba se elimina de la especificación de liberación declarada.

El método fue desarrollado y validado por un laboratorio externo que controló los lotes de desarrollo. Luego, el análisis se transfirió a sanofi pasteur y se validó para controlar los lotes comercializados. Ambos métodos se consideran equivalentes, si bien sanofi pasteur optimizó el análisis a fin de bajar el límite de cuantificación. Esta sección presenta el método y la validación realizada por sanofi pasteur y un resumen de la comparación de ambos métodos (vea la tabla 17).

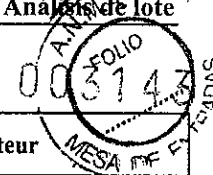


A.N.M. ...  
 FOLIO 3142  
 MESA DE ...

Tabla 17: Comparación de ambos métodos para contenido de bromuros y validaciones

		Laboratorio externo	sanofi pasteur
<b>Método</b>	<b>Metodología</b>	Cromatografía iónica	Sin cambio
	<b>Equipos</b>	HPLC iónica con los siguientes componentes: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Bomba</li> <li>- Inyector automático</li> <li>- Detector conductimétrico</li> <li>- Supresor</li> <li>- Columna iónica</li> <li>- Precolumna iónica</li> </ul>	Sin cambio
	<b>Reactivos y estándar</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Agua desmineralizada</li> <li>- Estándares de bromuros 1000 mg/l</li> <li>- Carbonato y bicarbonato de sodio</li> <li>- Solución madre de cloruro 1000 mg/l</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Agua para inyectables</li> <li>- Estándares de bromuros 1000 mg/l</li> <li>- Carbonato y bicarbonato de sodio</li> </ul>
	<b>Tampón de elución</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Carbonato de sodio 7 mM</li> <li>- Bicarbonato de sodio 2 mM</li> <li>- Fase móvil: carbonato de sodio 7 mM 60 % + bicarbonato de sodio 2 mM 40 %</li> </ul>	Sin cambio
	<b>Condiciones operativas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Elución: isocrática</li> <li>- Flujo: 1,00 mL/min</li> <li>- Volumen de inyección: 100 µL</li> <li>- Concentraciones de la curva: 0,10; 0,25; 0,50; 1,0 y 2,0 mg/l de estándar de bromuro + 40 mg/l en cada nivel de concentración de cloruro de solución madre de cloruro (1000 mg/l)</li> <li>- Dilución de la muestra: 1:100</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Elución: isocrática</li> <li>- Flujo: 1,00 mL/min</li> <li>- Volumen de inyección: 80 µL</li> <li>- Concentraciones de la curva: 0,025; 0,05; 0,1; 0,2 y 0,4 mg/l de estándar de bromuro</li> <li>- Dilución de la muestra: 1:100</li> </ul>





		Laboratorio externo	sanofi pasteur
Validación	Especificidad	Método específico	Método específico
	Linealidad	Coefficiente de regresión lineal: 0,999 e $Y = 3372 + 1,76 \times 10^5 \times X$	Coefficiente de regresión lineal: 0,9983 e $Y = 0,0111 + 0,9031 \times X$
		Rango de linealidad: [0,1 – 2,0] mg/L	Rango de linealidad: [2,0 – 38,5] mg/L
	Exactitud	El promedio de recuperación es 99,8 %.	La recuperación porcentual promedio y sus límites de confianza del 95 % son los siguientes: 92 % [88 - 96] %
	Precisión	La RSD obtenida para cada nivel de concentración es menor que la RSD calculada con la fórmula de Horwitz. El valor f obtenido (6,09) es menor que el valor f tabulado para una confianza del 95 % (F 4,4 = 6,39)	Los parámetros de repetibilidad y de precisión intermedia son respectivamente iguales a: - coeficiente de repetibilidad: 1.6 % - coeficiente de variación de la precisión intermedia: 10.3 % - El intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia para 1 corrida con 1 medición realizada de la manera habitual es $\pm 2,2$ mg/L.
	Límite de detección	3,4 mg/L	0,6 mg/L
Límite de cuantificación	10 mg/L	2 mg/L	

Todos los resultados de lote generados por ambos laboratorios se encontraron por debajo de su límite de cuantificación respectivo.

## 2.4.1 Resumen del procedimiento analítico de Sanofi Pasteur

### 2.4.1.1 Principio

El método está basado en una cromatografía de intercambio iónico con detección conductimétrica. Esta técnica permite separar los iones tomando en cuenta su peso molecular y carga. Utilizando un supresor de cationes ubicado después de la columna, sólo se detecta la conductividad de los aniones. La cuantificación del contenido de bromuros se realiza mediante una interpolación del área pico de bromuro en la muestra respecto del pico de bromuro en la curva de calibración.

### 2.4.1.2 Equipo

- Equipo estándar de laboratorio
- Cromatógrafo iónico con detección conductimétrica y supresor
- Columna y precolumna cromatográficas.





### 2.4.1.3 Reactivos

- Solución de carbonato de sodio 7 mM
- Solución de bicarbonato de sodio 2 mM
- Estándar de referencia: solución de KBr 1000 mg/L
- Control interno: lote de producción de HBsAg
- Testigo: agua para inyectables
- Solución tampón (fase móvil):
  - Carbonato de sodio 7 mM (60 % v/v)
  - Bicarbonato de sodio 2 mM (40 % v/v)

### 2.4.1.4 Procedimiento operativo

#### 2.4.1.4.1 Preparación de las soluciones

- Solución estándar de referencia: Dilución 1:10 de la solución estándar de bromuro (1000 mg/L) en agua para inyectables.
- La muestra de control interno se prepara en una concentración de 0,10 mg/l.
- Solución de muestra: Dilución 1:100 del lote de producción de HBsAg en agua para inyectables.
- Solución de agregado (muestra + estándar de referencia): 0,5 mL del lote de producción de HBsAg agregado a 50 µL de solución estándar de referencia diluida en 50 mL de agua para inyectables.
- La curva de calibración se prepara partiendo de la solución estándar de referencia de la siguiente manera: serie de 5 niveles de concentración: 0,025 mg/mL; 0,05 mg/mL; 0,10 mg/mL; 0,20 mg/mL y 0,40 mg/mL.

#### 2.4.1.4.2 Inyección

Los parámetros de cromatografía se describen en la tabla 17.

Se inyectan 80 µL de cada solución (solución estándar de referencia, control interno, solución de muestra, solución con agregado y soluciones de la curva de calibración) con el inyector automático en el equipo de HPLC iónica.

#### 2.4.1.5 Lecturas, cálculos y resultados

- Establecer la regresión lineal de la curva de calibración.
- Calcular la concentración de bromuros en la solución de agregado utilizando la curva de calibración y la concentración teórica del estándar de referencia (0,10 mg/L).





- Calcular la concentración de bromuros de la muestra de control interno y la solución de muestra conforme a la curva de calibración y tomando en cuenta el factor de dilución.

#### 2.4.1.6 Criterios de validez

- El coeficiente de regresión lineal de la curva de calibración debe ser  $\geq 0,99$ .
- La concentración de bromuros en la solución con agregado debe encontrarse entre el 80 y el 120 % de la concentración teórica de la solución estándar de referencia (0,10 mg/l).

#### 2.4.2 Validación del contenido de bromuros

Este capítulo describe la validación de la prueba de contenido de bromuros en el principio activo HBsAg, según la guía de la ICH.

El procedimiento analítico se describe en el capítulo 2.4.1.

Dado que el método es una prueba de límite, se evaluó la especificidad, linealidad, exactitud, precisión, cuantificación y los límites de detección. En la tabla 18 se presenta un resumen de la validación.



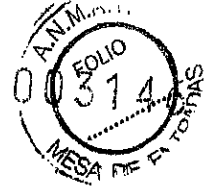


Tabla 18: Contenido de bromuros, resumen de validación

Características	Criterios de aceptación	Resultados
<b>Especificidad</b>	No existe interferencia entre el anión de bromuro y los otros aniones.	Ausencia de interferencia entre el anión de bromuro y los otros aniones (cloruro, nitrito, nitrato, fosfato y sulfato)
<b>Linealidad</b>	$P_{\text{linealidad}} \leq 0,01$ $P_{\text{desviación de la linealidad}} > 0,05$ El rango de linealidad se considera satisfactorio si el rango [80 - 120] % del límite de la especificación de bromuro (< 10 mg/L) se encuentra dentro del rango de linealidad y del rango exacto del método.	$P_{\text{linealidad}} = 2,29 \cdot 10^{-17}$ y $P_{\text{desviación de la linealidad}} = 0,531$ Después de un ajuste lineal de Y = concentración de bromuro (mg/L) medida en función de X = concentración teórica de bromuro, se observa la siguiente relación: $Y = 0,0111 + 0,9031 \cdot X$ Coeficiente de correlación lineal: $R^2 = 0,9983$ Rango de linealidad: [2,0 - 38,5] mg/L
<b>Exactitud</b>	La recuperación porcentual promedio calculada para los 5 niveles de concentración teóricos se encuentra entre el 80 % y el 120 %.	La recuperación porcentual promedio y sus límites de confianza del 95 % son los siguientes: 92 % [88 - 96] %
<b>Precisión</b>	El coeficiente de variación de precisión intermedia y repetibilidad es $\leq 15$ %.	Media general: $\bar{m} = 9,3$ mg/L Los parámetros de repetibilidad y de precisión intermedia son respectivamente iguales a: - coeficiente de repetibilidad: 1,6 % - coeficiente de variación de la precisión intermedia: 10,3 % - Intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia para 1 corrida con 1 medición realizada del modo habitual: $\pm 2,2$ mg/L
<b>Límite de cuantificación (QL)</b>  <b>Límite de detección (DL)</b>	El método en el límite de cuantificación debe ser: - exacto: La recuperación porcentual promedio debe estar incluida entre el 80 % y el 120 %. - preciso: El coeficiente de variación de la precisión intermedia y la repetibilidad no es mayor que 20 %.	$DL = 0,6$ mg/l $QL = 2$ mg/l - Recuperación porcentual promedio en el QL: 101,5 % Los parámetros de repetibilidad y de precisión intermedia son respectivamente iguales a: - coeficiente de repetibilidad: 4,7 % - coeficiente de variación de la precisión intermedia: 9,4 % - Intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia para 1 corrida con 1 medición realizada del modo habitual: $\pm 0,5$ mg/L

2.4.2.1 Especificidad

La especificidad se demostró a través de la capacidad del sistema cromatográfico para separar los distintos aniones. Se preparó una solución que contenía una mezcla de diferentes aniones y se determinó el tiempo de retención de cada anión. Luego, esta solución se agregó a una muestra de HBsAg para demostrar que la matriz de la muestra no induce interferencia en la detección y separación de los distintos aniones.





**2.4.2.2 Linealidad**

El diseño experimental fue el siguiente: dos operadores realizaron tres análisis independientes en días distintos.

Cada corrida incluía un rango de 5 concentraciones de bromuros. A una cantidad fija de muestra de HBsAg se le agregaron 5 niveles incrementales de bromuros.

**2.4.2.2.1 Resultados analíticos**

Los datos sometidos a análisis son el contenido de bromuros (muestra con agregado), expresado en mg/L, y se presentan en la tabla 19.

**Tabla 19: Linealidad, concentraciones medidas frente a concentraciones teóricas (mg/L)**

Concentración teórica (muestra con agregado)	Concentración medida (muestra con agregado) mg/l		
	Serie 1	Serie 2	Serie 3
2,5	2,36	2,40	2,85
5,0	4,35	4,34	4,84
10,0	8,32	9,61	9,44
20,0	17,34	16,88	18,21
40,0	36,44	34,92	37,83

**2.4.2.2.2 Análisis**

La linealidad en el rango elegido se analiza mediante los siguientes pasos:

- La homogeneidad de las varianzas límite se verifica mediante la prueba de Cochran.
- La dependencia entre la concentración teórica y la concentración medida de bromuros, y la linealidad de esta relación, se analizan mediante una regresión lineal no ponderada utilizando el método de los cuadrados mínimos. Debe mostrar una pendiente significativa y una desviación significativa de la linealidad.

La ecuación de la recta de regresión se presenta en la tabla 20.

**Tabla 20: Linealidad: Ecuación de la recta de regresión**

Ecuación de la recta de regresión	Coefficiente de determinación	Rango de linealidad (mg/L)
$Y = (0,0111 \pm 0,6603) + (0,9031 \pm 0,0320) \cdot X$	$R^2 = 0,9983$	[2,0 – 38,5]
donde: X= concentración teórica (µg/mL) Y = concentración medida (µg/mL)		
$P_{linealidad} < 0,0001$		
$P_{desviación\ de\ la\ linealidad} = 0,513$		

ROXANA MONTEMILONE  
DIRECTORA TÉCNICA  
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINGUEZ  
GERENTE  
SANOFI PASTEUR S.A.



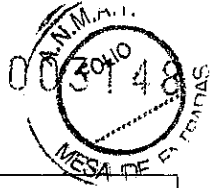
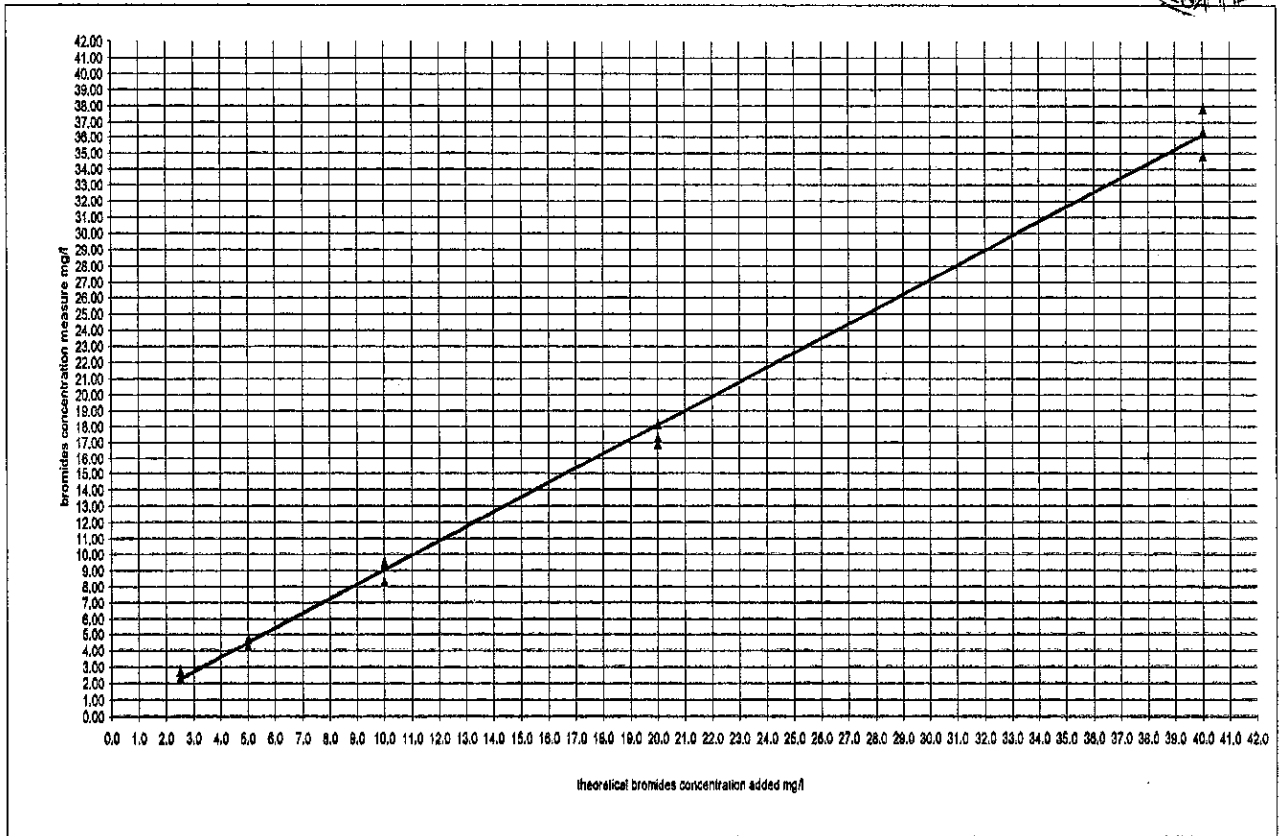


Figura 2: Linealidad: Gráfico de linealidad del contenido de bromuros



Los datos obtenidos del estudio de linealidad son homogéneos. Cumplen con la prueba de Cochran de homogeneidad de varianzas límite. El análisis de la varianza permite llegar a la conclusión de que la pendiente obtenida es significativa.

El rango de linealidad obtenido es [2,0 – 38,5] mg/L.

### 2.4.2.3 Exactitud

El diseño experimental fue el siguiente: dos operadores realizaron tres análisis independientes en días distintos.

Cada corrida incluía un rango de 5 concentraciones de bromuros. A una cantidad fija de muestra de HBsAg se le agregaron 5 niveles incrementales de bromuros.

#### 2.4.2.3.1 Resultados analíticos

Los datos sometidos a análisis son el contenido total de bromuros (muestra con agregado), expresado en mg/L. Los datos analizados son los obtenidos para la linealidad y se presentan en la tabla 19.

ROXANA MONTEMILONE  
DIRECTORA TÉCNICA  
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMÍNGUEZ  
ANALISTA  
SANOFI PASTEUR S.A.





### 2.4.2.3.2 Análisis

La exactitud se prueba mediante los siguientes pasos:

- Las recuperaciones porcentuales se calculan para cada nivel de concentración teórica y para cada grupo.
- Se verifica la homogeneidad de varianzas dentro de los niveles mediante la prueba de Cochran.
- Al adquirir la homogeneidad, la no significancia de las diferencias entre los niveles de concentración teórica se demuestra mediante un análisis de varianza.
- Cuando se prueba la igualdad de las medias entre niveles, se calcula la recuperación porcentual promedio con los límites de confianza del 95 %.

La recuperación porcentual es la relación entre la concentración medida dividida por la concentración teórica. Los resultados se expresan en porcentaje y se presentan en la tabla 21.

**Tabla 21: Exactitud: Recuperación promedio para cada nivel de concentración**

Nivel de concentración teórica (mg/mL)	Promedio del nivel de concentración teórica (µg/mL)	Recuperación promedio (%)
2,5	2,5	101,5
5,0	4,5	90,2
10,0	9,1	91,2
20,0	17,5	87,4
40,0	36,4	91,0

Los datos promedio obtenidos del estudio de exactitud son homogéneos. Cumplen con la prueba de Cochran de homogeneidad de varianzas dentro de los niveles. El análisis de varianza permite llegar a la conclusión de que las medias interniveles son iguales.

La recuperación porcentual promedio y sus límites de confianza del 95 % se presentan en la tabla 22.

**Tabla 22: Exactitud: Recuperación porcentual promedio y límites de confianza del 95 %**

Recuperación porcentual	Límites de confianza del 95 %
92 %	[88 % - 96 %]

La recuperación promedio calculada (como concentración medida/concentración teórica) expresada en porcentaje cumple con los criterios de aceptación, establecidos entre 80 y 120 %.





**2.4.2.4 Precisión**

La precisión se estudia en dos niveles: repetibilidad y precisión intermedia.

El diseño experimental fue el siguiente:

- Se realizaron 3 series bajo condiciones de precisión intermedia: Dos operadores llevaron a cabo tres análisis en forma independiente, con el mismo método, sobre una muestra homogénea, en el mismo laboratorio, en días diferentes.
- Dentro de cada serie, se llevaron a cabo 3 análisis bajo condiciones que garantizaban la repetibilidad: el mismo operador llevó a cabo los análisis en forma independiente, siguiendo el mismo método, sobre un lote homogéneo, en el mismo laboratorio, con los mismos equipos, en un período breve.

**2.4.2.4.1 Resultados analíticos**

Los datos sometidos a análisis son el contenido de bromuros de la muestra, expresado en mg/L, y se presentan en la Tabla 23.

**Tabla 23: Precisión: Contenido de bromuros (mg/mL)**

Prueba	Serie 1 mg/mL	Serie 2 mg/mL	Serie 3 mg/mL
1	8,35	9,34	10,02
2	8,32	9,64	10,18
3	8,32	9,47	10,45

**2.4.2.4.2 Análisis**

La precisión del método se prueba mediante los siguientes pasos, aplicados a los datos de la tabla 23.

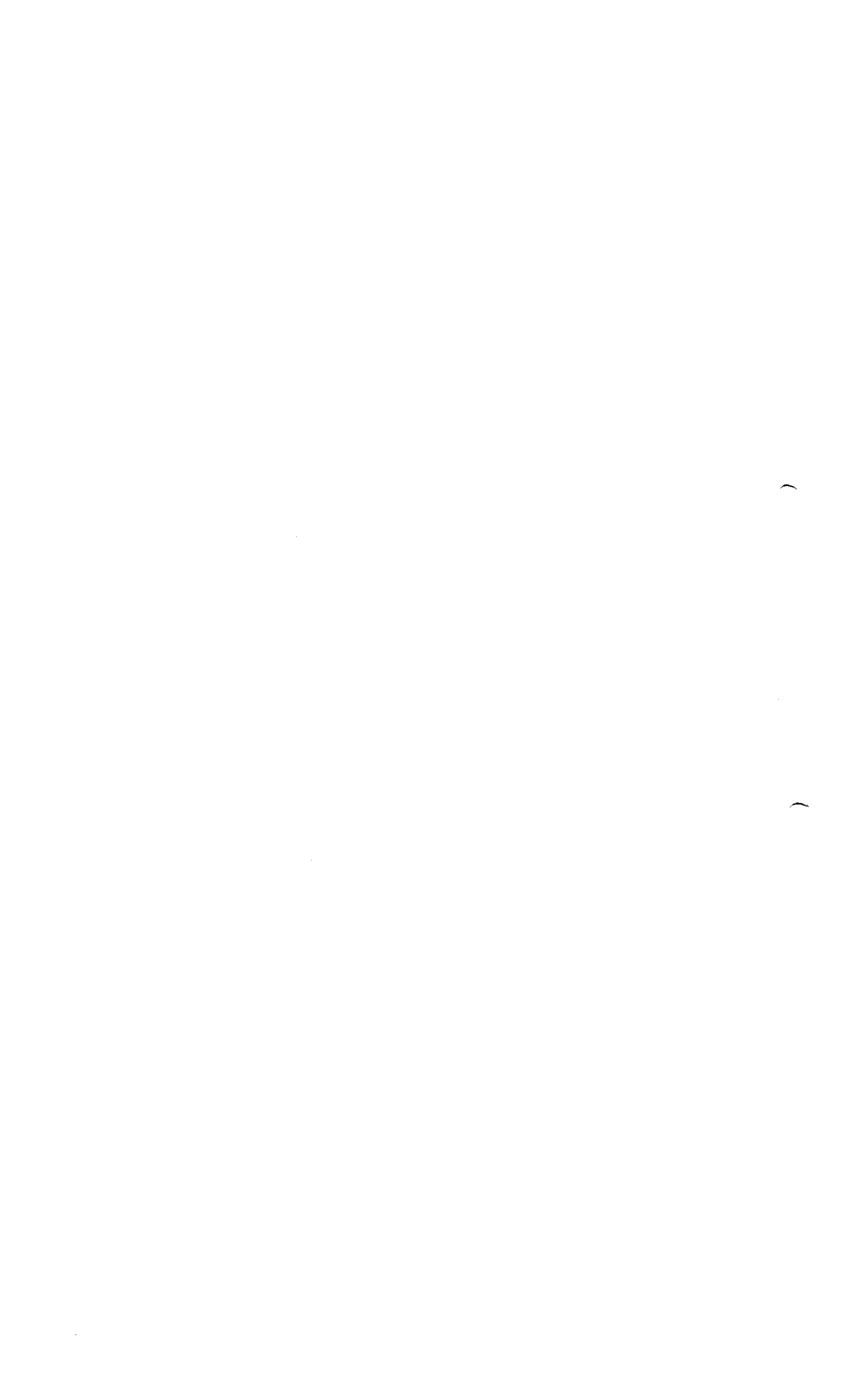
- La homogeneidad de las varianzas dentro de los grupos se verifica mediante la prueba de Cochran.
- Una vez adquirida la homogeneidad, se calculan los parámetros de repetibilidad y precisión intermedia.

Las características de repetibilidad y precisión intermedia se presentan en la tabla 24.

**Tabla 24: Precisión: Características de repetibilidad y precisión intermedia**

Características	Desviación estándar relativa	Desviación estándar	Intervalo de confianza del 95 % para 1 corrida con 1 medición
Características de repetibilidad	1,637 %	0,153	No se aplica,
Características de precisión intermedia	10,267 %	0,959	± 2,212 mg/l

ROXANA MONTEMILONE DIRECTORA TÉCNICA SANOFI PASTEUR S.A.  
CHRISTIAN DOMÍNGUEZ OPERADOR SANOFI PASTEUR S.A.





Los datos obtenidos del estudio de precisión son homogéneos. Cumplen con la prueba de homogeneidad de varianzas dentro de los grupos. Dado que la desviación estándar relativa de la precisión intermedia y la repetibilidad no es mayor que 15 %, el método es preciso.

#### 2.4.2.5 Límite de cuantificación

El objetivo consiste en demostrar la exactitud y la precisión al nivel del límite de cuantificación.

El diseño experimental fue el siguiente:

- Se llevaron a cabo 3 series bajo condiciones de precisión intermedia: un operador llevó a cabo dos series en forma independiente y otro operador llevó a cabo una serie, siguiendo el mismo método, sobre una muestra homogénea, en el mismo laboratorio, en días distintos.
- Dentro de cada serie, se llevaron a cabo 3 análisis bajo condiciones que garantizaban la repetibilidad: cada análisis lo llevó a cabo el mismo operador siguiendo el mismo método, utilizando la misma curva estándar de referencia y los mismos equipos.

##### 2.4.2.5.1 Resultados analíticos

Los datos sometidos a análisis son la concentración de bromuros de la muestra, expresada en mg/L, y se presentan en la tabla 25.

**Tabla 25: Límite de cuantificación: Precisión, concentración de bromuros (mg/L)**

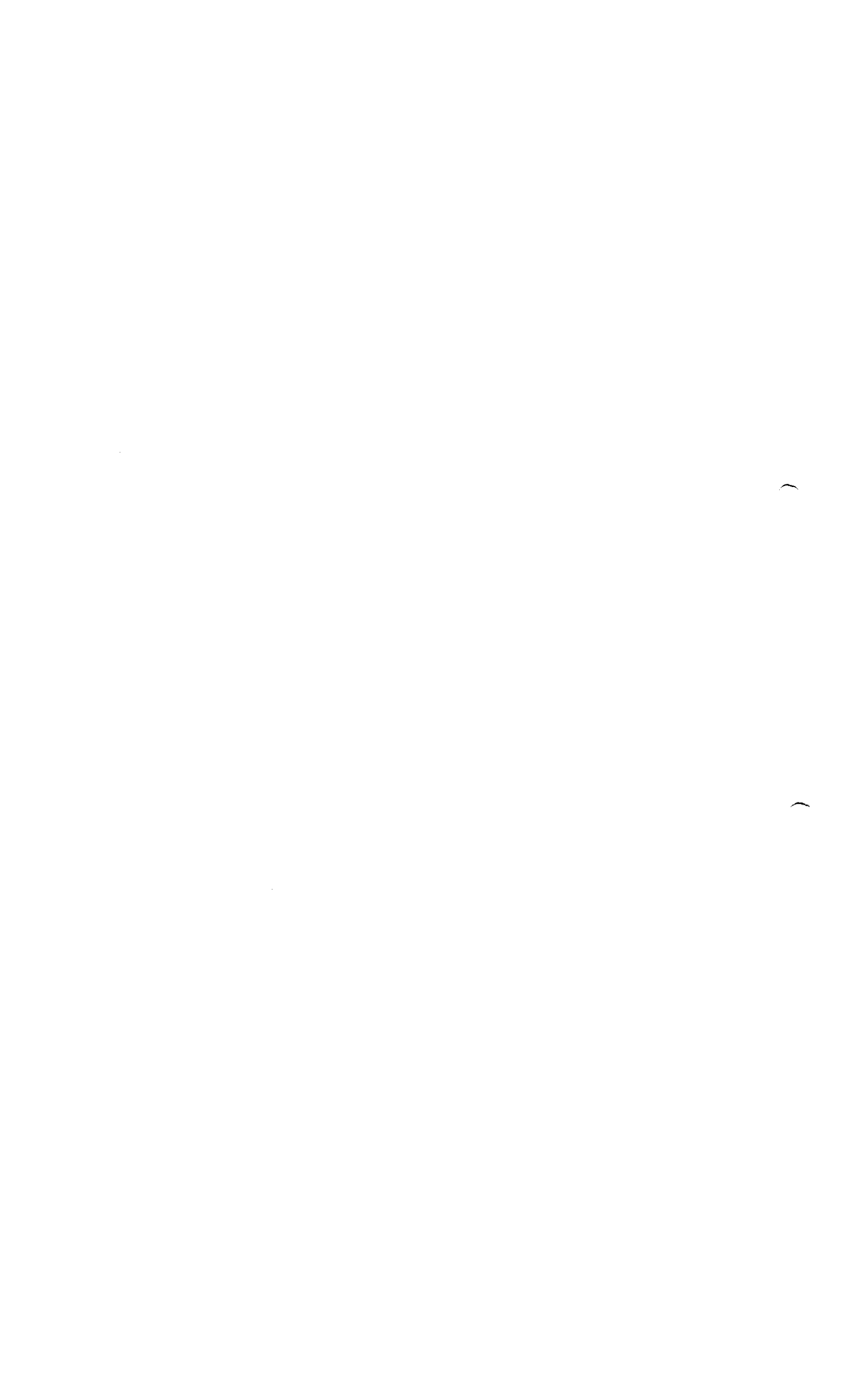
Prueba	Serie 1 mg/mL	Serie 2 mg/mL	Serie 3 mg/mL
1	2,10	2,60	2,40
2	2,20	2,30	2,50
3	2,10	2,60	2,50

El límite de cuantificación es 2 mg/L.

##### 2.4.2.5.2 Análisis

- Exactitud al nivel del límite de cuantificación (vea la tabla 21):  $\bar{R} = 101,5 \%$ ;
- La precisión del método se prueba mediante los siguientes pasos, aplicados a los datos de la tabla 25.
  - La homogeneidad de las varianzas dentro de los grupos se verifica mediante la prueba de Cochran.
  - Una vez adquirida la homogeneidad, se calculan los parámetros de repetibilidad y precisión intermedia.

Las características de repetibilidad y precisión intermedia se presentan en la tabla 26.



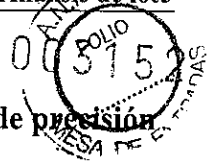


Tabla 26: Límite de cuantificación: Precisión, características de repetibilidad y de precisión intermedia

Características	Desviación estándar relativa	Desviación estándar	Intervalo de confianza del 95 % para 1 corrida con 1 medición
Características de repetibilidad	4,671 %	0,111	No se aplica.
Características de precisión intermedia	9,378 %	0,222	± 0,512 mg/l

Los datos obtenidos del estudio de precisión son homogéneos. Cumplen con la prueba de Cochran de homogeneidad de varianzas dentro de los grupos. Al nivel del límite de cuantificación (QL = 2 mg/L de muestra), el método es exacto y preciso.

#### 2.4.2.6 Conclusión

De acuerdo con los resultados obtenidos y evaluando los criterios de aceptación establecidos, el método es específico.

El método es lineal en el rango [2,0 – 38,5] mg/L.

La exactitud se demuestra en el mismo rango, con una recuperación porcentual del 92 % [88 - 96] %.

El método es preciso, dado que la desviación estándar relativa de la precisión intermedia es 10,3 % (criterios de aceptación: 15 % máximo).

El límite de cuantificación es 2 mg/L. En este límite, el método es exacto ( $\bar{R} = 101.5\%$ ) y preciso dado que la desviación estándar relativa de la precisión intermedia es 9,4 % (criterios de aceptación: 20 % máximo).

Tomando en cuenta los resultados obtenidos, el método es válido para determinar la concentración de bromuros en el principio activo HBsAg.

