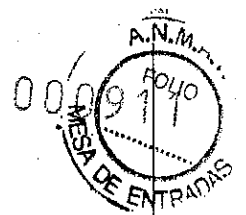


Tabla 40: Resultados de estabilidad para el PRP-AH elaborado a partir de PRP reprocesado, almacenado a $\leq 35^{\circ}\text{C}$: Lote FA007602

Pruebas	Criterios de aceptación	T0	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses	18 meses	24 meses
Contenido de cianuro residual	$\leq 5 \mu\text{g/mL}$	$< 0,004$	$< 0,004$	$< 0,004$	$< 0,004$	$< 0,004$	$< 0,004$	$< 0,004$
Contenido de polisacárido (contenido de fósforo)	Para cálculo	12,52	12,61	12,50	12,08	13,40	12,50	12,30
Porcentaje de ADH unida al polisacárido	1,4 - 2,6% p/p	1,73	1,54	1,89	2,00	1,84	1,93	1,95
Proporción de ADH libre/ADH total	$< 0,1$	0,041	No válido	0,044	0,015	0,072	0,062	0,017
Distribución del tamaño molecular						*		
Polisacárido eluido antes de $K_D 0,20$	$\leq 15\%$	2,76	No válido	9,70	3,10	6,30	6,21	3,75
K_D del polisacárido	0,40 - 0,60	0,50	0,49	0,50	0,46	0,46	0,48	0,48
Prueba de identificación de <i>Haemophilus</i> tipo b	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo

* Prueba realizada a los 16 meses

ROXANA MONTEMLONE DIRECTORA TÉCNICA SANOFI PASTEUR S.A.
 CHRISTIAN DOMÍNGUEZ APODERADO SANOFI PASTEUR S.A.





8 Procedimientos analíticos anteriores

8.1 Distribución del tamaño molecular en PRP-AH mediante LP-SEC

La determinación de la distribución del tamaño molecular en PRP mediante LP-SEC era el método vigente en el momento en que se realizaron los estudios de estabilidad.

- Referencia

La prueba se lleva a cabo de acuerdo con la Ph. Eur., 2.2.30. "Size-exclusion chromatography" (cromatografía de exclusión por tamaño).

- Principio

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

- Equipos y reactivos

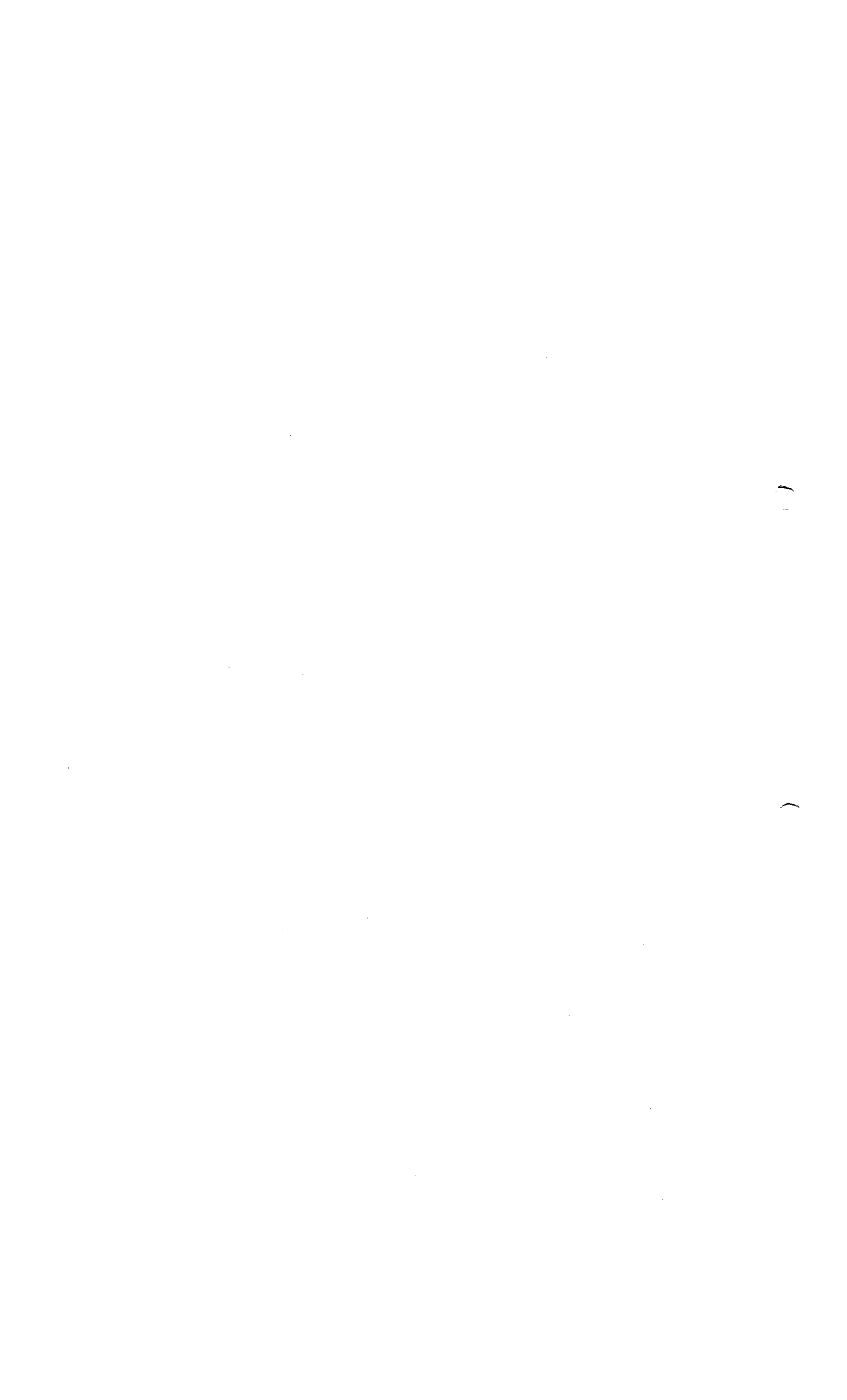
- **Equipo:** columna de vidrio para cromatografía con gel de agarosa al 4 % (por ejemplo: diámetro 1,6 cm, longitud 100 cm) (gel Sepharose CL 4B, o equivalente), recolector de fracciones, bomba peristáltica, refractómetro y grabador; equipo de laboratorio estándar
- **Reactivos:** Cloruro de sodio 0,1 M en agua ultrapurificada, agua ultrapurificada, cloruro de sodio
- Calibración de columna (referencia): utilice un lote de PRP-AH de referencia.

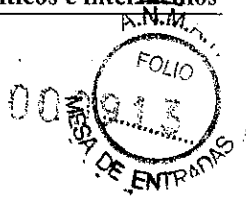
- Soluciones

- **Tampón para fase móvil:** Cloruro de sodio 0,1 M en agua ultrapurificada
- **Solución muestra:** prepare una solución que contenga el equivalente a 5 mg de PRP-AH, usando la solución de cloruro de sodio adecuada dependiendo del contenido teórico de PRP-AH (desde 0,11 hasta 0,20 M de solución de cloruro de sodio en agua ultrapurificada).
- **Solución de calibración de la columna:** prepare una solución que contenga el equivalente a 5 mg de PRP-AH, usando la solución de cloruro de sodio adecuada dependiendo del contenido teórico de PRP-AH (desde 0,11 hasta 0,20 M de solución de cloruro de sodio en agua ultrapurificada). V_0 y V_t corresponden al primer y último pico eluidos.

- Procedimiento operativo

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





Se equilibra la columna con el tampón para la fase móvil durante varias horas. El espectrofotómetro se conecta al grabador (a una longitud de onda de 206 nm).

Los volúmenes de inyección para la calibración de columnas y las soluciones de muestra corresponden a 1 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 el V_0 y el V_t , determinar los volúmenes de elución de K_D 0,2; 0,9 y 1,15 (para la solución muestra). Con el volumen de elución del pico principal, V_0 y V_t , determinar el K_D del PRP-AH (para la solución muestra y la solución de calibración de columnas). El K_D es una medición relativa del tamaño de una molécula y se calcula según la siguiente fórmula:

$$K_D = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

Donde:

- V_e = volumen de elución del pico
- V_0 = volumen de elución del volumen vacío de la columna (V_0)
- V_t = volumen de elución del volumen total de la columna (V_t)

Prepare la agrupamiento de efluentes antes de K_D de 0,2 (agrupamiento 1), entre K_D de 0,2 y antes de K_D de 0,9 (agrupamiento 2) y entre K_D de 0,9 y antes de K_D de 1,15.

Se determina el contenido de fósforo en las agrupaciones antes de K_D de 0,2 y antes de K_D de 0,9, por medio de un procedimiento analítico descrito en el capítulo 2.2.1. El volumen de la solución muestra de prueba que se utilizará para el agrupamiento de efluentes antes de K_D de 0,2 es de 0,5 mL y el volumen de la solución muestra de prueba que se utilizará para el agrupamiento de efluentes después de K_D de 0,9 es de 1 mL. Para cada agrupamiento, el contenido de fósforo obtenido se expresa en $\mu\text{g/mL}$. Se determina el porcentaje del polisacárido eluido antes de $K_D = 0,30$ según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de polisacárido eluido antes de } K_D \text{ de } 0,30 = \frac{C_{\text{agrupamiento 1}} \times V_{\text{agrupamiento 1}}}{(C_{\text{agrupamiento 1}} \times V_{\text{agrupamiento 1}}) + (C_{\text{agrupamiento 2}} \times V_{\text{agrupamiento 2}})} \times 100$$

Donde:

- C agrupamiento 1 = contenido de fósforo en el agrupamiento eluido antes de K_D de 0,30 ($\mu\text{g/mL}$)
- C agrupamiento 2 = contenido de fósforo en el agrupamiento eluido antes de K_D de 0,30 ($\mu\text{g/mL}$)
- V agrupamiento 1 = volumen del agrupamiento 1 (mL)
- V agrupamiento 2 = volumen del agrupamiento 2 (mL)

- Criterios de validez

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





El K_D del PRP-AH que se utiliza para calibrar la columna debe estar dentro de los límites de la gráfica de control.

El rendimiento cromatográfico se calcula por medio del contenido de fósforo determinado en el agrupamiento antes de K_D de 0,2 y en el agrupamiento después de K_D de 0,2 y después de K_D de 0,09 y el contenido de fósforo de PRP-AH sometido a prueba determinado según el procedimiento analítico descrito en el capítulo 2.2.1, según la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento cromatográfico} = \frac{C_{\text{agrupamiento 1}} \times V_{\text{agrupamiento 1}} + C_{\text{agrupamiento 2}} \times V_{\text{agrupamiento 2}}}{C_{\text{PRP-AH}} \times V_{\text{PRP-AH}}} \times 100$$

Donde:

- C agrupamiento 1 = contenido de fósforo en el agrupamiento eluido antes de K_D de 0,2 ($\mu\text{g/mL}$)
- C agrupamiento 2 = contenido de fósforo en el agrupamiento eluido después de K_D de 0,2 y antes de K_D de 0,9 ($\mu\text{g/mL}$)
- V agrupamiento 1 = volumen del agrupamiento 1 (mL)
- V agrupamiento 2 = volumen del agrupamiento 2 (mL)
- C_{PRPAH} = contenido de fósforo del PRP-AH sometido a prueba ($\mu\text{g/mL}$)
- $V_{\text{PRP-AH}}$ = volumen inyectado de PRP-AH sometido a prueba

8.2 ADH libre en el PRP-AH mediante colorimetría

La determinación de la ADH libre en el PRP-AH mediante colorimetría era el método vigente en el momento en que se realizaron los estudios de estabilidad.

• Principio

Los grupos funcionales NH_2 de ADH: $[\text{H}_2\text{N}-\text{HN}-\text{OC}-(\text{CH}_2)_{40}-\text{CO}-\text{NH}-\text{NH}_2]$ reaccionan con ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfónico en presencia de tetraborato de sodio para producir una molécula de color que se puede analizar mediante espectrofotometría a 500 nm.

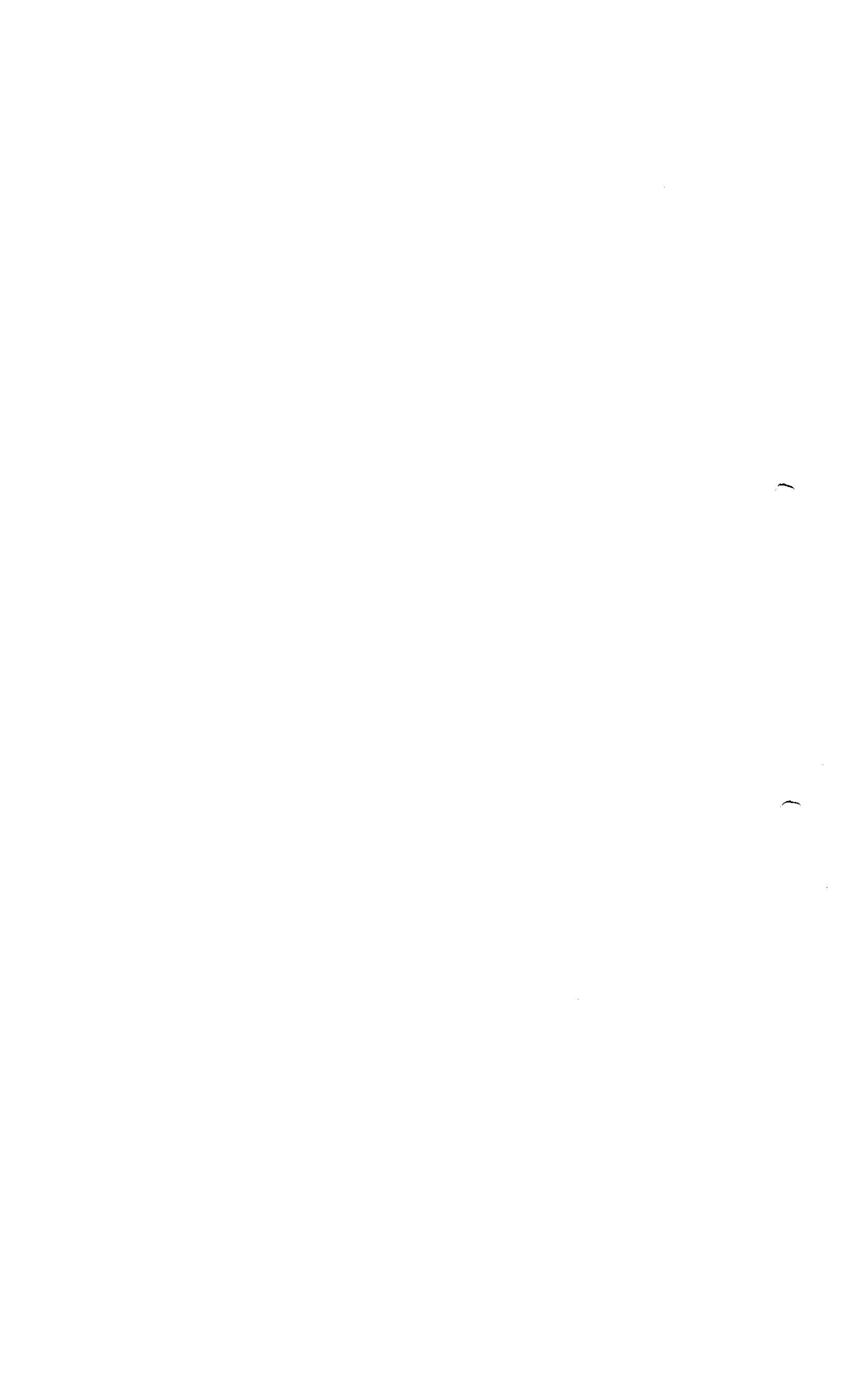
• Equipos y reactivos

- **Equipo:** equipo estándar de laboratorio y espectrofotómetro UV
- **Reactivos:** 5 % p/v de tetraborato de sodio dodecahidrato en agua purificada, 5 % p/v de ácido trinitrobenzeno sulfónico (TNBS) en agua purificada, solución de cloruro de sodio 0,1 M en agua purificada, agua purificada, dihidrazida del ácido adípico (ADH) para la solución de control.
- **Referencia:** Dihidrazida de ácido adípico (ADH)

• Soluciones

Agregar 1 mL de solución de tetraborato de sodio a los tubos de ensayo. Colocar los tubos en un horno a $+100^\circ\text{C}$ durante la noche hasta que estén completamente secos. Utilice estos tubos para soluciones estándar, testigo, de control y muestra.

- **Solución de TNBS:** Diluya el TNBS al 5 % p/v a razón de 1:25 con agua purificada.
- **Soluciones estándar:** prepare una solución madre estándar de referencia a razón de 50 nmol/mL de estándar de referencia de ADH en solución de cloruro de sodio 0,1 M.





Diluya esta solución a razón de 1:10 en una solución de cloruro de sodio 0,1 M (solución estándar de trabajo).

Coloque en 6 tubos de ensayo de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 y 0,5 mL de solución estándar de trabajo. Cuando sea necesario, afore el volumen de cada tubo a 2,0 mL utilizando la solución de cloruro de sodio 0,1 M.

El rango cubierto por las soluciones estándar es de 1 a 5 nmol de ADH, correspondiente a 2 hasta 10 nanoequivalentes de amino (nEq NH₂).

- **Testigo:** en un tubo de vidrio, agregue 2,0 mL de solución de cloruro de sodio 0,1 M.
- **Solución de control:** prepare una solución madre a razón de 5 nmol/mL de estándar de referencia de ADH en una solución de cloruro de sodio 0,1 M. Coloque 0,3 mL de solución de control en un tubo de ensayo y afores hasta 2,0 mL con solución de cloruro de sodio 0,1 M. Realizar cuatro pruebas.
- **Solución de muestra:** utilice la tercera fracción obtenida de la LP-SEC aplicada a la solución de PRP-AH, agrupe después de K_D 0,9 y antes de K_D 1,15). En tubos de ensayo, coloque 2,0 mL de la muestra sometida a prueba. Realizar cuatro pruebas.

- Procedimiento operativo

Selle y agite cada uno de los tubos preparados según la sección anterior. Agregue 0,3 mL de solución de TNBS. Los tubos se deben sellar, agitar y dejar en la oscuridad durante 60 minutos a temperatura ambiente.

- Lectura, cálculo, resultados

La absorbancia de cada solución se lee a 500 nm en comparación con el testigo. La curva de calibración de la densidad óptica de las soluciones estándar se representa como una función de la concentración de la función amina por muestra de prueba. Utilizando la curva de calibración, deduzca la concentración de nEq NH₂ (a) (nEq NH₂/TS) a partir de la DO de la muestra de prueba.

La concentración del nEq NH₂ por mL de PRP-AH se obtiene con la siguiente fórmula:

$$\text{nEq NH}_2 \text{ por mL de solución de PRP - AH} = \frac{a \cdot \text{dilución}}{\text{TS}}$$

Donde:

a: cantidad de nanoequivalentes de amina por muestra de prueba

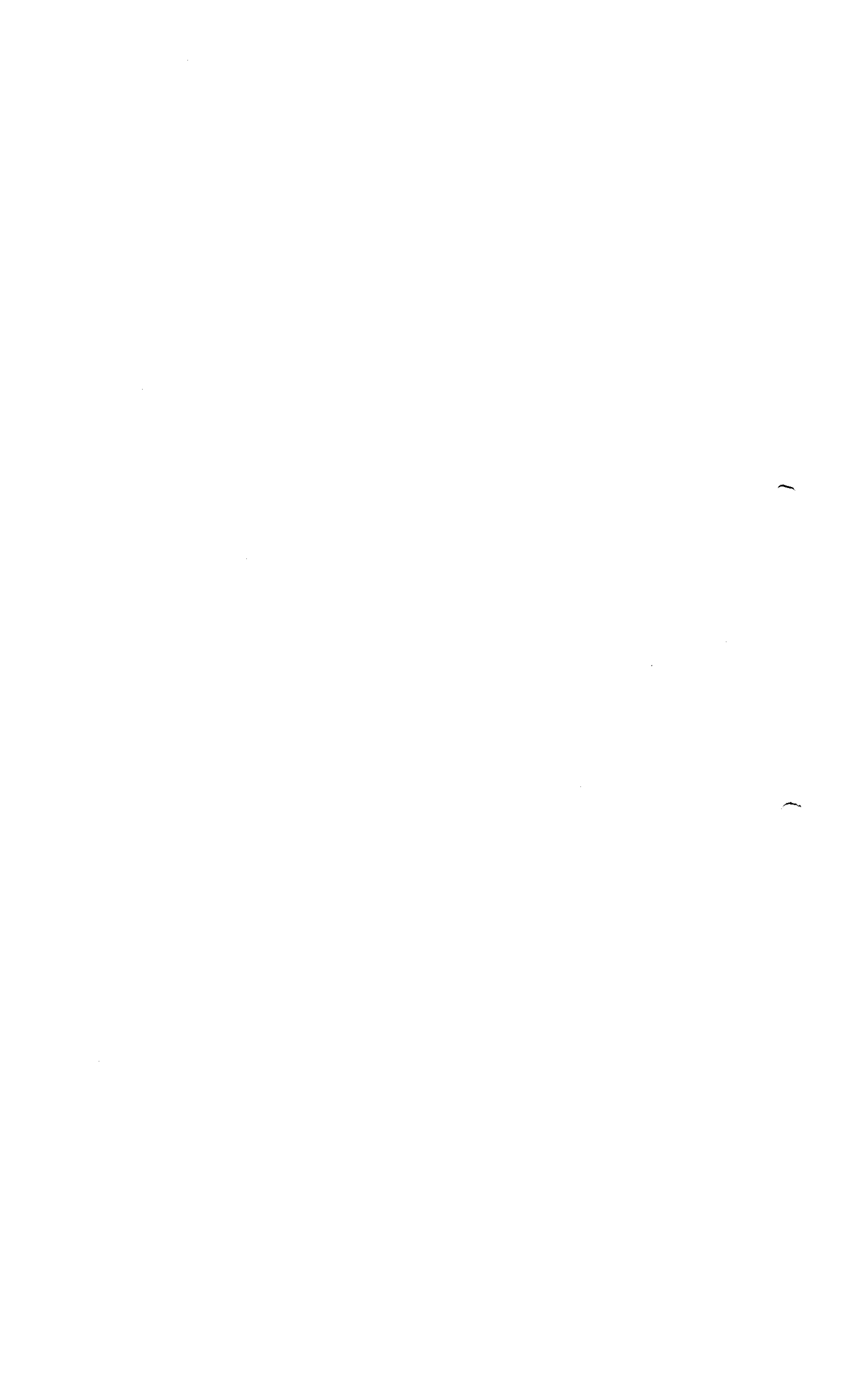
dilución: dilución de la muestra de prueba

TS: Volumen de la muestra de prueba (mL)

El resultado final es la media de los cuatro valores obtenidos en la solución de muestra.

- Criterios de validez

- El coeficiente de correlación de la línea de calibración es superior a 0,990.
- El valor de la solución de control (promedio de 4 determinaciones) se encuentra dentro del gráfico de control con un coeficiente de variación menor o igual que 10 %.





Proporción de ADH libre/ADH total y porcentaje de ADH unida a polisacárido en PRP-AH

Utilice los métodos descritos en los capítulos 2.3 y 2.4, y reemplace el contenido de ADH libre obtenido mediante HPLC (capítulo 2.4.2) por el contenido de ADH libre obtenido mediante colorimetría.

8.3 Contenido de cianuro residual

La determinación del contenido de cianuro residual era el método cuantitativo vigente en el momento en que se realizaron los estudios de estabilidad.

- Principio

El cianuro o los iones de cianato se transforman en cloruro de cianógeno mediante cloración y se analizan mediante cromatografía de gases con inyección por espacio de cabeza y detección por captura de electrones.

El ácido cianhídrico que se obtiene después de la acidificación con ácido ortofosfórico reacciona con cloramina T y produce cloruro de cianógeno volátil que se puede analizar.

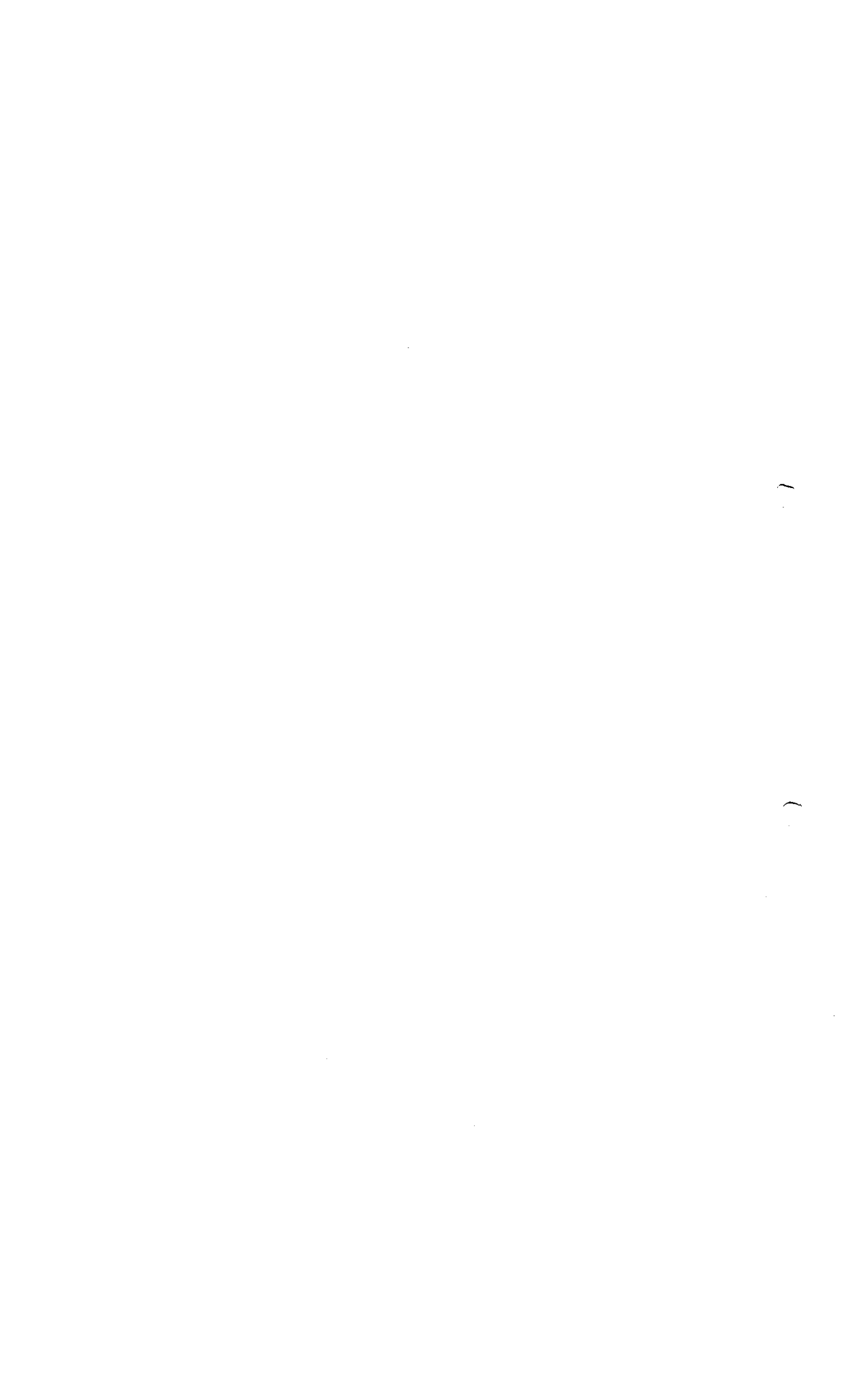
- Equipos y reactivos

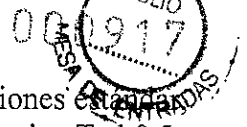
- **Equipo:** equipo de laboratorio estándar; el equipo específico que se debe utilizar es:
 - Sistema computarizado de cromatografía de gases con detector de captura de electrones;
 - Columna capilar de metil silicona (L = 60 m, d.i. = 0,23 mm, d.e. = 0,32 mm, grosor de la película = 3 μ m), o equivalente.
 - Muestreador de espacio de cabeza;
 - Viales para espacio de cabeza con sellos.
- **Reactivos:** ácido ortofosfórico puro, cloramina T al 0,5 % en agua, agua ultrapurificada.
- **Referencia:** solución estándar de cianuro a razón de 1 g/L en hidróxido de sodio 0,1 M.

- Soluciones

- **Soluciones estándar:** prepare de manera exacta un rango de soluciones estándar de cianuro de 1 ng/mL, 2 ng, 10 ng/mL, 20 ng/mL y 40 ng/mL diluyendo 1 g/L de solución estándar de cianuro en agua ultrapurificada. Si es necesario, utilice las concentraciones adecuadas de soluciones de productos intermedios. Coloque 5 mL de cada solución estándar en un vial para espacio de cabeza.
- **Soluciones muestra:** coloque 2,5 mL de PRP-AH en el vial para espacio de cabeza. Complete hasta 50 mL con agua purificada. Duplique.
- **Soluciones muestra con agregados:** coloque 2,5 mL de PRP-AH en el vial para espacio de cabeza. Complete hasta 5 mL con agua ultrapurificada y solución de cianuro para agregados, para que la solución final de PRP-AH con agregado contenga 20 ng/mL de cianuro. Duplique.
- **Testigo:** utilice agua ultrapurificada. Coloque 5 mL en un vial para espacio de cabeza.

- Procedimiento operativo





En cada vial para espacio de cabeza preparado con las soluciones anteriores (soluciones estándar de muestra, de muestra con agregado y testigo), agregue 1 mL de solución de cloramina T al 0,5 % y 0,1 mL de ácido fosfórico puro. Coloque el tapón inmediatamente en los tubos y mezcle.

El cloruro de cianógeno volátil que se produce durante la reacción se analiza mediante cromatografía de gases. Las condiciones que se mencionan a continuación se pueden modificar dependiendo del equipo utilizado.

- Parámetros de muestreador de espacio de cabeza:
 - Temperatura de control de la muestra: +80°C
 - Temperatura de la aguja: +85°C
 - Temperatura de la línea de transferencia: +90°C
 - Tiempo de control de la temperatura: 60 minutos
 - Tiempo de presurización de la muestra: 2 minutos
 - Tiempo de inyección: 0,08 minutos
 - Duración de la extracción: 0,2 minutos
- Parámetros de la cromatografía de gases:
 - Temperatura del horno: +60 °C durante 10 minutos
 - La presión del gas de arrastre se establece en 24 psi en la columna (aproximadamente, 3 mL/mn)
 - Temperatura del detector: +300°C
- Lectura, cálculo, resultados

Integre el pico de interés y utilice las alturas de los picos.

Establezca la regresión lineal de la curva de calibración. Utilizando la curva de calibración, deduzca la cantidad de cianuro residual ($\mu\text{g}/\text{TS}$) a partir de la altura de los picos de la muestra de prueba y tenga en cuenta el factor de dilución.

Si el resultado es inferior a 4 ng/mL, informe: < 0,004 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

- Criterios de validez

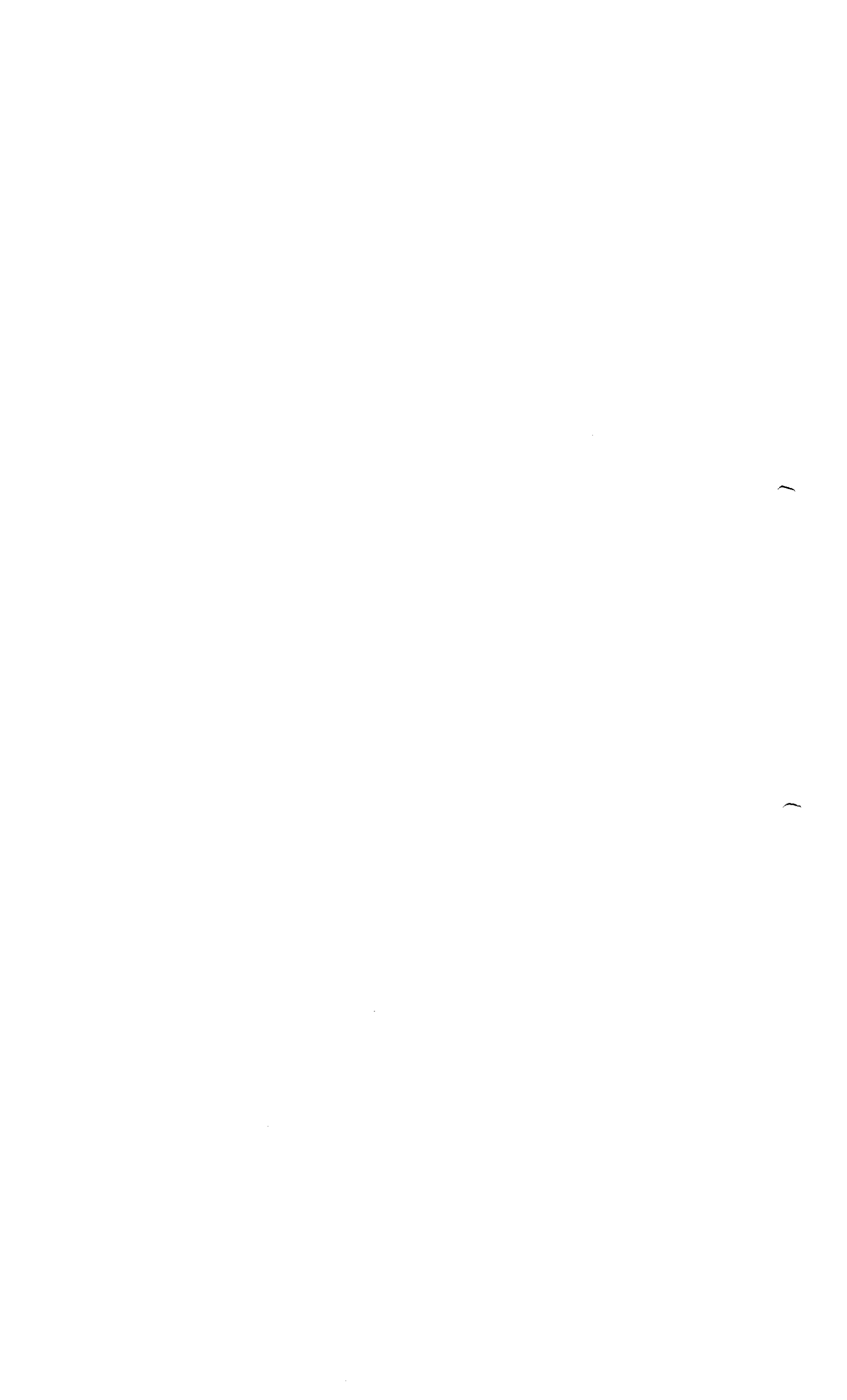
Si el resultado es inferior a 4 ng/mL para un agregado de 20 ng/mL, el valor obtenido para la muestra con agregado debe encontrarse dentro del límite de 20 ± 4 ng/mL.

Si el resultado es mayor o igual que 4 ng/mL para un agregado de 20 ng/mL, el valor obtenido para la muestra con agregado debe encontrarse dentro del límite de $(20 + [\text{resultado}/2]) \pm 4$ ng/mL.

8.4 Validación del procedimiento analítico para la distribución por tamaño molecular en el PRP-AH mediante LP-SEC

- Resumen

Dado que la prueba corresponde a una medición física, el parámetro estudiado fue la precisión (repetibilidad y precisión intermedia). Se presenta un resumen de la validación en la siguiente tabla.



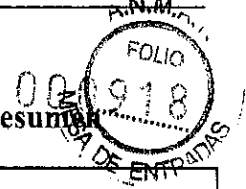


Tabla 41: Distribución del tamaño molecular mediante LP-SEC: validación, resumen

Características	Criterios de aceptación	Resultados
Precisión	Determinación de K_D Intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia de $< \pm 0,04$	Los parámetros de repetibilidad y precisión intermedia son respectivamente iguales a: - coeficiente de variación: 0,9% y 2,4% - Intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia para 1 medición que se realiza de la manera habitual: $\pm 0,02$
	Porcentaje de polisacárido eluido antes de K_D de 0,2: Sin límite asignado	Los parámetros de repetibilidad y precisión intermedia son respectivamente iguales a: - Coeficientes de variación: 6,6% - Intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia para 1 medición que se realiza de la manera habitual: $\pm 0,6 \%$

• Precisión en la determinación de K_D

Se analizaron seis grupos en 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.

Dentro de cada grupo, se llevaron a cabo 3 corridas en 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 lapso corto de tiempo.

Las moléculas se separan por medio de LP-SEC y se detectan mediante UV. Se determinó el K_D del PRP-AH para cada corrida. Los resultados se proporcionan en la siguiente tabla:

Tabla 42: Distribución por tamaño molecular mediante LP-SEC: validación, precisión en la determinación de K_D

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6
0,46	0,46	0,47	0,48	0,49	0,48
0,47	0,45	0,47	0,48	0,49	0,48
0,47	0,46	0,47	0,48	0,48	0,48

Se verifica la homogeneidad de las varianzas intragrupalas mediante una prueba de Cochran a un nivel de significancia del 5 %. Los parámetros de repetibilidad y precisión intermedia se calcularon utilizando el cálculo de varianzas (varianza de repetibilidad en los grupos completos, varianza intergrupal 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 tabla que aparece a continuación.





Tabla 43: Características de repetibilidad y precisión intermedia

Características	Desviación estándar	Coefficiente de variación	Intervalo de confianza del 95 %
Características de repetibilidad	0,004	0,86%	/
Características de precisión intermedia	0,011	2,42%	± 0,02

El intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia es inferior a 0,04.

- Precisión del porcentaje de polisacárido eluido antes de K_D de 0,20

Se analizaron tres grupos en 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.

Dentro de cada grupo, se llevaron a cabo 3 corridas en 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 lapso corto de tiempo.

Las moléculas se separan por medio de LP-SEC y se detectan mediante espectrofotometría. Se determina el porcentaje del polisacárido eluido antes de K_D de 0,2 mediante la prueba del fósforo, para cada corrida. Los resultados se proporcionan en la siguiente tabla:

Tabla 44: Distribución por tamaño molecular mediante LP-SEC: validación, precisión en el % de polisacárido eluido antes de K_D 0,20

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
3,95	4,06	3,69
3,88	3,92	3,69
3,73	4,24	4,39

Se verifica la homogeneidad de las varianzas intragrupal mediante una prueba de Cochran a un nivel de significancia del 5 %. Los parámetros de repetibilidad y precisión intermedia se calcularon utilizando el cálculo de varianzas (varianza de repetibilidad en los grupos completos, varianza intergrupala 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 tabla que aparece a continuación.

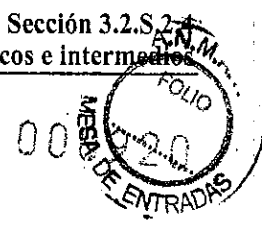


Tabla 45: Características de repetibilidad y precisión intermedia

Características	Desviación estándar	Coefficiente de variación	Intervalo de confianza del 95 %
Características de repetibilidad	0,259	6,56%	/
Características de precisión intermedia	0,259	6,56%	± 0,598%

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 0,86 % y 2,42 %, respectivamente, y el intervalo de confianza de la precisión intermedia es de ±0,02 para 1 corrida en la determinación de K_D . Además, los coeficientes de variación de repetibilidad y precisión intermedia son, aproximadamente, del 7 % respectivamente, y el intervalo de confianza de la precisión intermedia es de ±0,6 % para 1 corrida en el porcentaje de polisacárido eluido antes de K_D de 0,20.

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

8.5 Validación del procedimiento analítico para la ADH libre en PRP-AH mediante colorimetría



• **Resumen**

Como ensayo cuantitativo, se evaluaron la linealidad, la exactitud, la precisión y el límite de cuantificación. El contenido de ADH libre se determina mediante una reacción colorimétrica, aplicada en una tercera fracción cromatográfica obtenida del PRP-AH siguiendo el método LP-SEC, que mide la absorción espectrofotométrica a 500 nm de un complejo de ácido trinitrobenceno sulfónico frente a ADH. Dado que la absorción a esta longitud de onda no es específica para ese complejo coloreado, no se puede evaluar la especificidad.

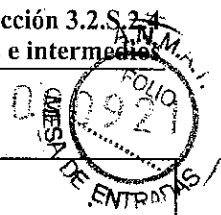
El resumen de la validación se presenta en la tabla que aparece a continuación.

Tabla 46: Contenido de ADH libre en el PRP-AH mediante colorimetría: validación, resumen

Características	Criterios de aceptación	Resultados
Linealidad	Significancia de la pendiente: $P_{\text{linealidad}} < 0,01$ No hay desviación de la linealidad: $P_{\text{desviación de la linealidad}} > 0,05$	$P_{\text{linealidad}} < 0,0001$; $P_{\text{desviación de la linealidad}} = 0,97$ Después de un ajuste lineal de $Y = \text{concentración medida en función de } X = \text{muestra}$, en una escala logarítmica doble, se destaca la siguiente relación: $Y = -0,0966 + 1,0679 \cdot X$ Coeficiente de correlación lineal: $r = 0,9253$ con 16 grados de libertad


 ROXANA MONTEMILONE
 DIRECTORA TÉCNICA
 SANOFI PASTEUR S.A.

 CHRISTIAN DOMINGUEZ
 APODERADO
 SANOFI PASTEUR S.A.





Características	Criterios de aceptación	Resultados
		Rango de linealidad: [0,32-5,36] nEq NH ₂
Exactitud	Sin límite asignado	La recuperación porcentual promedio y sus límites de confianza del 95 % son los siguientes: 103 % [95 % - 111 %]
Precisión	El coeficiente de variación de la precisión intermedia es ≤ 30%.	Los parámetros de repetibilidad y precisión intermedia son respectivamente iguales a: - coeficiente de variación: 17,2% - intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia para 1 prueba con 1 replicado realizado del modo habitual: ± 0,33 nEq NH ₂ /mL en la tercera fracción cromatográfica
Límite inferior de cuantificación	Comparación con la concentración más baja de la curva estándar.	LC = 1,60 nEq NH ₂

• Linealidad

Tres operadores llevaron a cabo tres corridas independientes en 3 días diferentes. Cada prueba incluía un rango de 6 concentraciones de ADH libre.

Los datos analizados son concentraciones de ADH libre expresadas en nEq NH₂ y se presentan en la tabla que aparece a continuación, ordenados según el volumen de la solución de PRP-AH utilizado para cada nivel analizado.

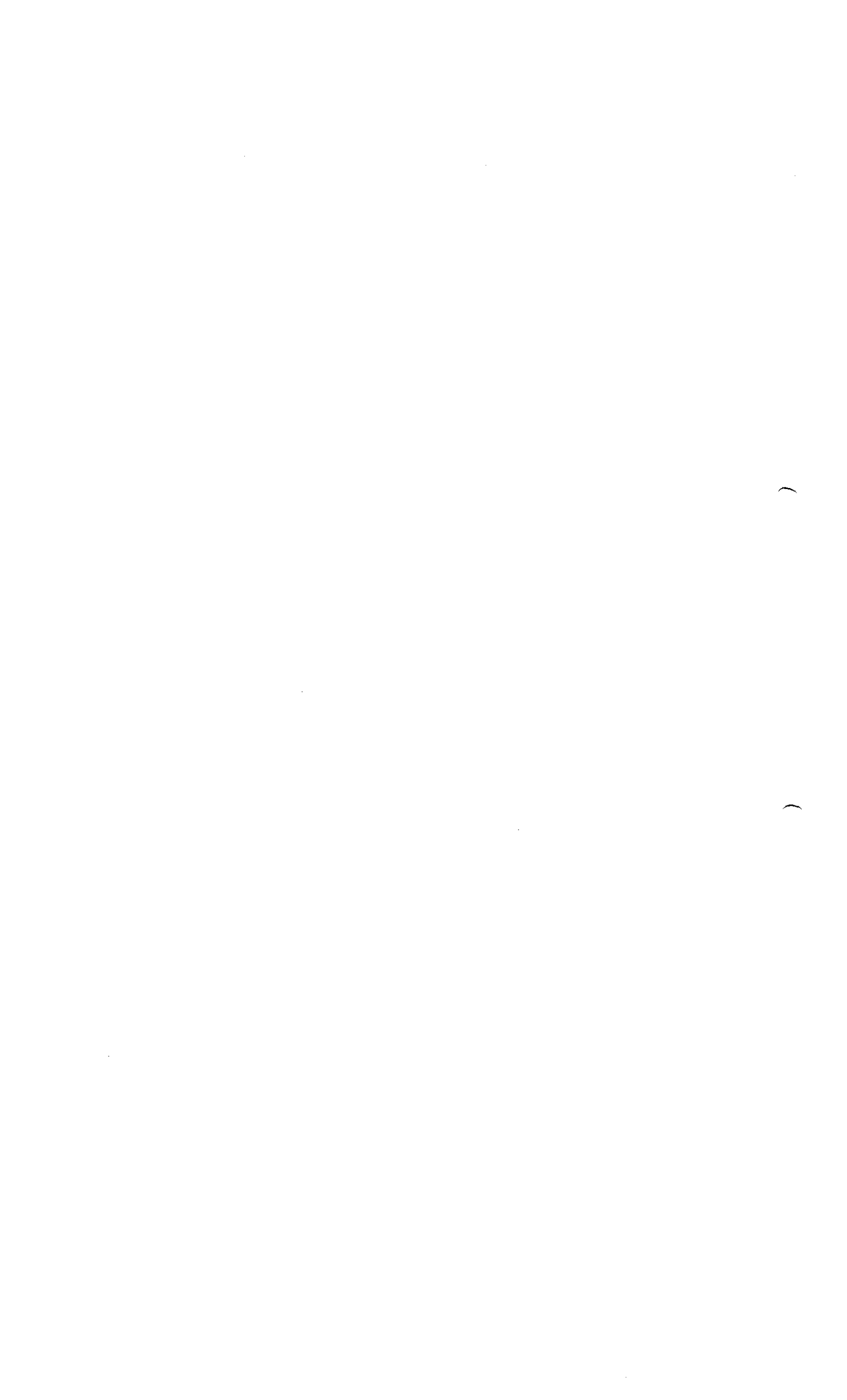
Tabla 47: Contenido de ADH libre en el PRP-AH mediante colorimetría: validación, linealidad

Concentración teórica de ADH libre (nEq NH ₂)	Grupo 1 (nEq NH ₂)	Grupo 2 (nEq NH ₂)	Grupo 3 (nEq NH ₂)
1,5	1,76	1,28	1,18
2,0	2,63	2,05	1,61
2,5	3,28	2,57	2,11
3,0	3,38	3,37	2,76
3,5	3,92	3,62	3,14
4,0	4,66	4,12	3,71

Se les aplica a los datos una regresión lineal no ponderada, en la que se usa el método de los cuadrados mínimos. Se verifica la homogeneidad de las varianzas límite mediante una prueba de Cochran a un nivel de significancia del 5 %. La dependencia entre las cantidades esperadas de ADH libre y las cantidades medidas de ADH libre, así como la linealidad de esta relación, se evalúan mediante un análisis de varianza de la regresión. El análisis de varianza permite concluir la significancia de la pendiente ya que el valor P de linealidad con 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 del 5% es superior al 5% (valor P = 0,97).

La ecuación de la recta de regresión es:

[Handwritten Signature]
 ROXANA MONTEMILONE
 DIRECTORA TÉCNICA
 SANOFI PASTEUR S.A.
 CHRISTIAN DOMINGUEZ
 APODERADO
 SANOFI PASTEUR S.A.





$$Y = (-0,0966 \pm 0,6678) + (1,0679 \pm 0,2319) \cdot X$$

Donde:

X = cantidad teórica (nEq NH₂)

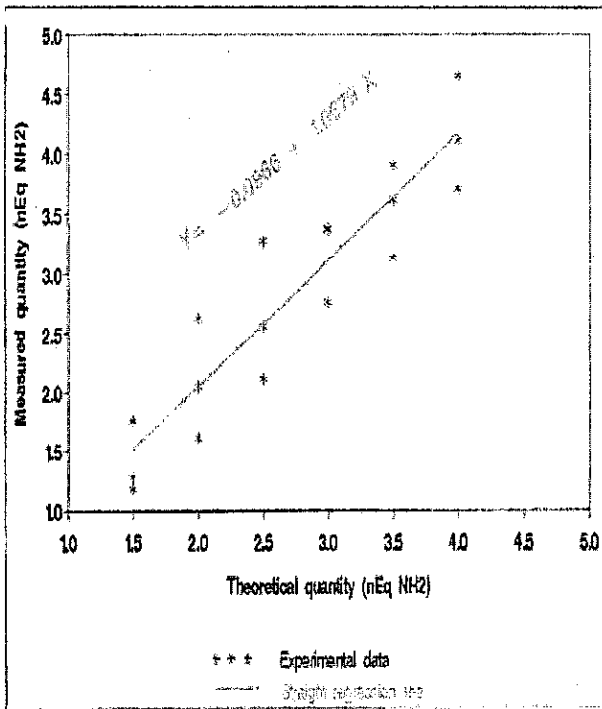
Y = cantidad medida (nEq NH₂)

Coefficiente de correlación lineal r = 0,9253 con 16 grados de libertad

Rango de linealidad: [0,32–5,36] nEq NH₂

La figura que aparece a continuación presenta la gráfica de linealidad.

Figura 8: Contenido de ADH libre en el PRP-AH: validación, gráfica de linealidad



• Exactitud

Los datos analizados corresponden a los resultados obtenidos en la prueba de linealidad. Las recuperaciones porcentuales entre las cantidades de ADH libre medida y teórica se calculan 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 significancia 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 límites de confianza del 95 %:



Tabla 48: Recuperación porcentual promedio

Recuperación porcentual	Límites de confianza del 95 %
102,6%	[94,6 - 110,7]%

• Precisión

Se analizaron tres grupos en condiciones de precisión intermedia: las corridas 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 3 diferentes días.

Dentro de cada grupo, se llevaron a cabo 3 corridas en 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 lapso corto de tiempo.

Los datos analizados son concentraciones de ADH libre, expresadas en nEq NH₂ por mL, de la tercera fracción cromatográfica de LP-SEC en PRP-AH, y se presentan en la tabla que aparece a continuación.

Tabla 49: Contenido de ADH total en el PRP-AH: validación, precisión:

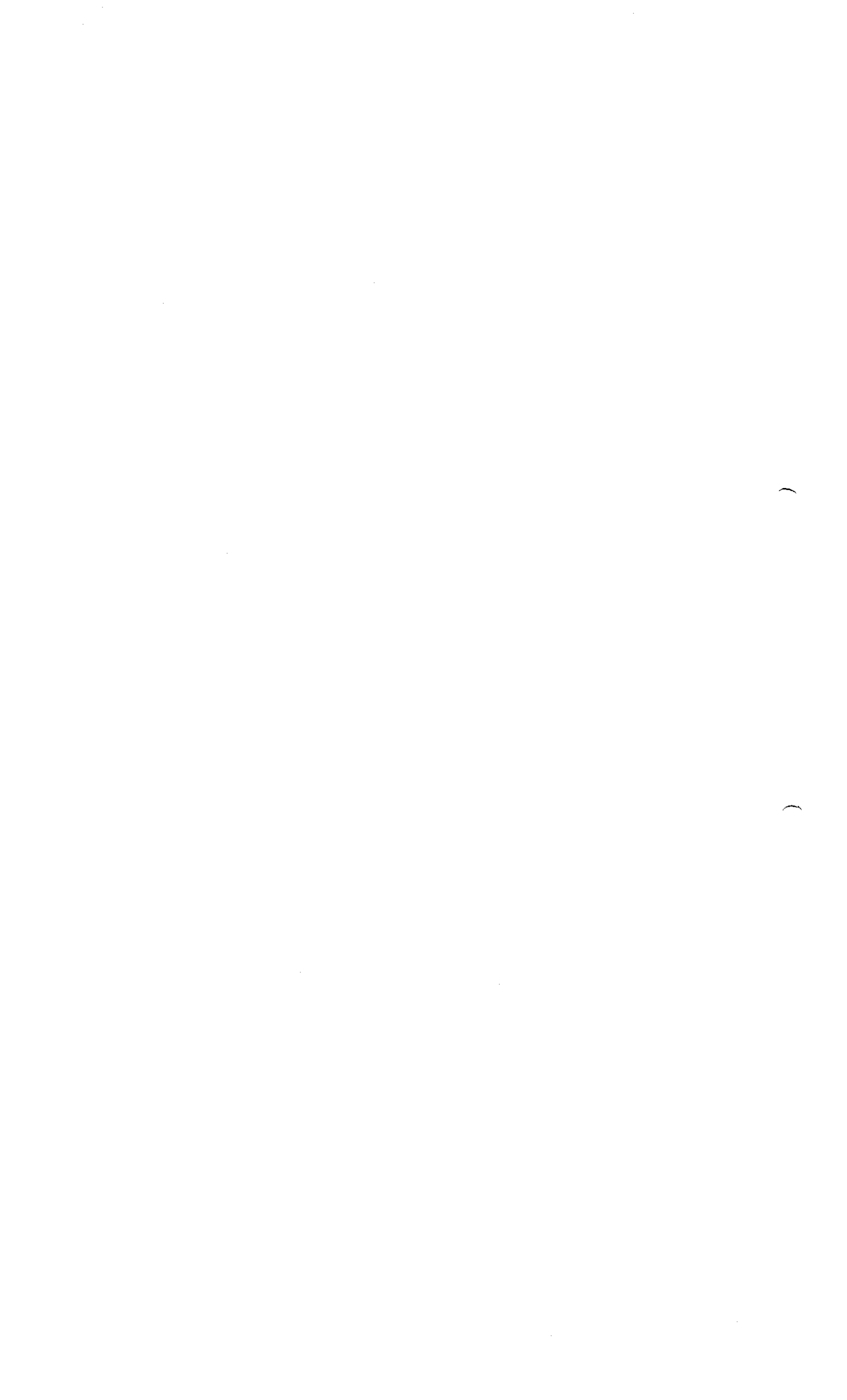
Grupo 1 (nEq NH ₂ /mL)	Grupo 2 (nEq NH ₂ /mL)	Grupo 3 (nEq NH ₂ /mL)
0,98	0,65	0,68
0,76	0,83	0,84
0,77	0,91	1,01

Se verifica la homogeneidad de las varianzas intragrupalas mediante una prueba de Cochran a un nivel de significancia del 5 %. Los parámetros de repetibilidad y precisión intermedia se determinaron utilizando el cálculo de varianzas (varianza de repetibilidad en los grupos completos, varianza intergrupala 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, así como el intervalo de confianza del 95 % para 1 corrida (1 duplicado) realizada de la manera habitual, se presentan en la tabla que aparece a continuación.

Tabla 50: Características de repetibilidad y precisión intermedia

Características	Desviación estándar	Coficiente de variación	Intervalo de confianza del 95 %
Características de repetibilidad	0,141	17,16 %	/
Características de precisión intermedia	0,141	17,16 %	± 0,33





El coeficiente de variación de la precisión intermedia es inferior al 30 %.

- Límite inferior de cuantificación

Se determinó el límite inferior de cuantificación mediante un estudio estadístico que tuvo como objetivo definir el límite a partir del cual la respuesta de la muestra se considera diferente a la del testigo y se puede cuantificar.

Se realizaron treinta curvas estándar independientes. Se calculó la pendiente de cada curva estándar. La pendiente media se determinó al igual que la desviación estándar residual de todas las rectas de regresión utilizando el método de mínimos cuadrados. Se determinó el límite inferior de cuantificación utilizando la siguiente fórmula:

$LC (nEq NH_2) = (\text{desviación estándar residual de toda la recta de regresión} * 10) / \text{curva estándar de la pendiente media.}$

En la tabla que aparece a continuación, se presentan los resultados obtenidos para cada pendiente.





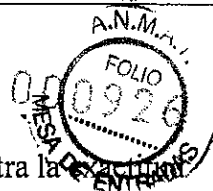
Tabla 51: Contenido de ADH en el PRP-AH: validación, límite inferior de cuantificación

Densidades ópticas medidas a 500 nm para el rango de calibración				
1 nEq NH ₂	2 nEq NH ₂	3 nEq NH ₂	4 nEq NH ₂	5 nEq NH ₂
0,036	0,051	0,061	0,079	0,101
0,023	0,037	0,052	0,069	0,085
0,028	0,046	0,067	0,077	0,098
0,026	0,047	0,060	0,079	0,095
0,015	0,028	0,048	0,067	0,080
0,021	0,036	0,051	0,068	0,081
0,037	0,051	0,074	0,091	0,103
0,019	0,032	0,049	0,062	0,080
0,021	0,034	0,051	0,064	0,083
0,026	0,042	0,055	0,073	0,089
0,028	0,040	0,057	0,067	0,089
0,020	0,031	0,056	0,071	0,082
0,022	0,038	0,056	0,070	0,093
0,016	0,030	0,047	0,063	0,076
0,021	0,040	0,047	0,068	0,083
0,007	0,031	0,041	0,063	0,081
0,019	0,036	0,051	0,064	0,081
0,017	0,034	0,052	0,070	0,081
0,022	0,040	0,054	0,071	0,091
0,025	0,037	0,055	0,069	0,081
0,013	0,028	0,049	0,060	0,078
0,026	0,044	0,055	0,078	0,095
0,021	0,040	0,058	0,065	0,086
0,010	0,030	0,048	0,057	0,081
0,023	0,031	0,051	0,072	0,084
0,019	0,034	0,056	0,066	0,081
0,021	0,039	0,053	0,073	0,086
0,015	0,030	0,048	0,066	0,084
0,028	0,045	0,063	0,081	0,096
0,023	0,039	0,054	0,070	0,088

La pendiente media del rango de calibración es igual a 0,0162 y la desviación estándar residual media de la recta de regresión es igual a 0,0026.

El límite de cuantificación del ADH libre corresponde a 1,60 nEq NH₂. Por lo tanto, el intervalo de validación del método es [1,60 - 5,36] nEq NH₂.





• Conclusión

El método es lineal en el rango: [1,60 - 1662] nEq NH₂ de ADH libre. Se demuestra la exactitud en el mismo rango, con una recuperación promedio del 103%. Se verifica la precisión del método, dado que los coeficientes de repetibilidad y precisión intermedia son, aproximadamente, del 17 % respectivamente con un intervalo de confianza de la precisión intermedia de $\pm 0,33$ nEq NH₂/mL en el efluente para 1 corrida que se realiza del modo habitual.


El método es válido para medir la ADH libre mediante colorimetría en PRP-AH.

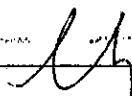
8.6 Validación del procedimiento analítico para el contenido de cianuro residual

El análisis de cianuros residuales se lleva a cabo utilizando cromatografía de gases en el PRP-AH. Como ensayo cuantitativo, se evaluaron la linealidad, la exactitud, la precisión y el límite inferior de cuantificación. No se estudió la especificidad debido a que no se pudo preparar ninguna matriz de PRP-AH sin utilizar bromuro de cianuro. En la tabla 52 se presenta un resumen de la validación.

Tabla 52: Contenido de cianuro residual en el PRP-AH: validación, resumen

Características	Criterios de aceptabilidad	Resultados
Linealidad	Significancia de la pendiente: $P_{\text{linealidad}} < 0,01$ No hay desviación de la linealidad: $P_{\text{desviación de la linealidad}} > 0,05$	$P_{\text{linealidad}} < 0,0001$; $P_{\text{desviación de la linealidad}} = 0,98$ Después de un ajuste lineal de $Y =$ cantidad medida en función de $X =$ cantidad teórica de cianuro, se destaca la siguiente relación: $Y = 0,042 + 0,891 \cdot X$ Coeficiente de correlación lineal: $r = 0,9967$ con 7 grados de libertad Rango de linealidad: [2,6 - 10,6] $\mu\text{g/L}$
Exactitud	La recuperación porcentual promedio calculada para todos los niveles teóricos de agregado se encuentra entre el 80 % y el 120 %.	La recuperación porcentual promedio y sus límites de confianza del 95 % son los siguientes: 90 % [87 % - 94 %]
Precisión	Sin límite asignado	<u>Producto sin agregados</u> (concentración promedio de cianuros $\approx 1 \mu\text{g/L}$): los parámetros de repetibilidad y precisión intermedia son respectivamente iguales a: - coeficiente de variación: 28,1% y 38,4% - intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia para 1 corrida con 1 duplicado realizado del modo habitual: $\pm 0,85 \mu\text{g/L}$ <u>Producto con agregados</u> (agregados de 2, 5 y 10 $\mu\text{g/L}$): los coeficientes de variación de la precisión intermedia son respectivamente iguales a 6 %, 4 % y 4 %
Límite inferior de cuantificación	Incluido en el rango de linealidad	LC = 2,6 $\mu\text{g/L}$


ROXANA MONTEMILONE
 DIRECTORA TÉCNICA
 SANOFI PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DOMINGUEZ
 APODERADO
 SANOFI PASTEUR S.A.



• Linealidad

Se realizaron tres corridas independientes en 3 días distintos. Cada corrida incluía un rango de 3 soluciones de PRP-AH con agregado de cianuro y una solución de PRP-AH sin agregados. Se utilizó el contenido de cianuro de las soluciones de PRP-AH sin agregado para poder determinar la cantidad medida con agregado de cianuro en cada solución de PRP-AH con agregado.

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 53. Corresponden a la cantidad medida con agregado de cianuro presente y se expresan en µg/L.

Tabla 53: Contenido de cianuro residual en el PRP-AH: validación, linealidad; Agregado medido de cianuros (µg/L)

Cantidad teórica con agregado de cianuro (µg/L)	Grupo 1 (µg/L)	Grupo 2 (µg/L)	Grupo 3 (µg/L)
2	1,81	1,77	1,90
5	4,80	4,14	4,55
10	8,96	9,33	8,58

Se les aplica a los datos una regresión lineal no ponderada, en la que se usa el método de los cuadrados mínimos. Se verifica la homogeneidad de las varianzas límite mediante una prueba de Cochran a un nivel de significancia del 5 %. La dependencia entre las cantidades teóricas esperadas y el cianuro medido, y la linealidad de esta relación se evalúan mediante un análisis de varianza de la regresión. El análisis de varianza permite llegar a la conclusión de que la pendiente es significativa, ya que el valor P de linealidad con la tabla Snedecor a un nivel de significancia del 1 % es inferior al 1 % (valor P < 0,0001), y de que la desviación de la linealidad no es significativa, ya que el valor P de la falta de ajuste de la linealidad con la tabla Snedecor al 5 % de significancia es superior al 5 % (valor P = 0,98).

La ecuación de la recta de regresión es:

$$Y = (0,042 \pm 0,425) + (0,891 \pm 0,065) \cdot X$$

Donde:

X = cantidad teórica

Y = cantidad medida

Coefficiente de correlación lineal r = 0,9967 con 7 grados de libertad

El método es lineal en el rango [210] µg/L de cianuro agregado en una muestra que contiene un promedio de 0,60 µg/L de cianuros (resultados obtenidos de soluciones sin agregados). Por ende, el procedimiento es lineal en el rango [2,6 - 0,6] µg/mL de cianuros.

ROXANA MONTEMLONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.



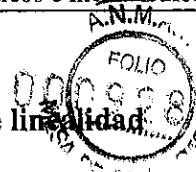
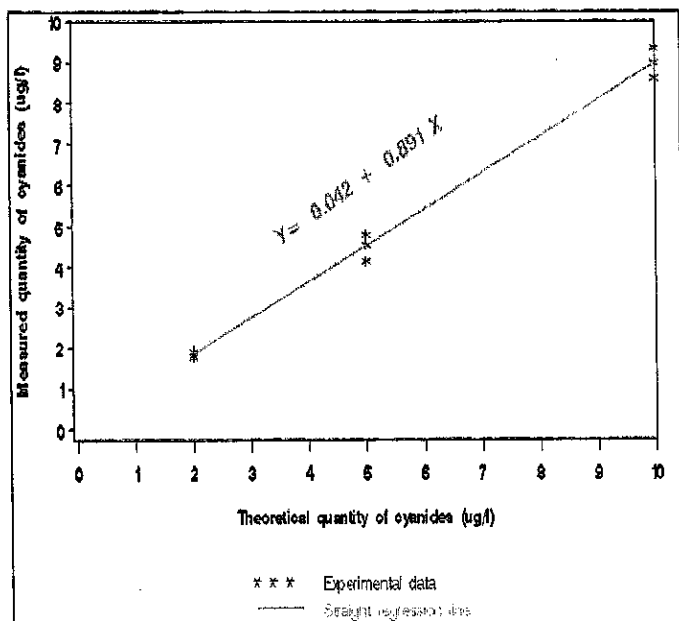


Figura 9: Contenido de cianuro residual en el PRP-AH: validación, gráfica de linealidad



• Exactitud

Los datos analizados corresponden a la cantidad medida con agregado de cianuro presente y se expresan en µg/L. Los resultados se presentan en la tabla 13.

Se calculan las recuperaciones porcentuales entre los factores de concentración teórica y 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 significancia 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 límites de confianza del 95%:

Tabla 54: Homogeneidad de las varianzas interniveles

Recuperación porcentual	Límites de confianza del 95 %
90,27%	[87,01 - 93,54] %

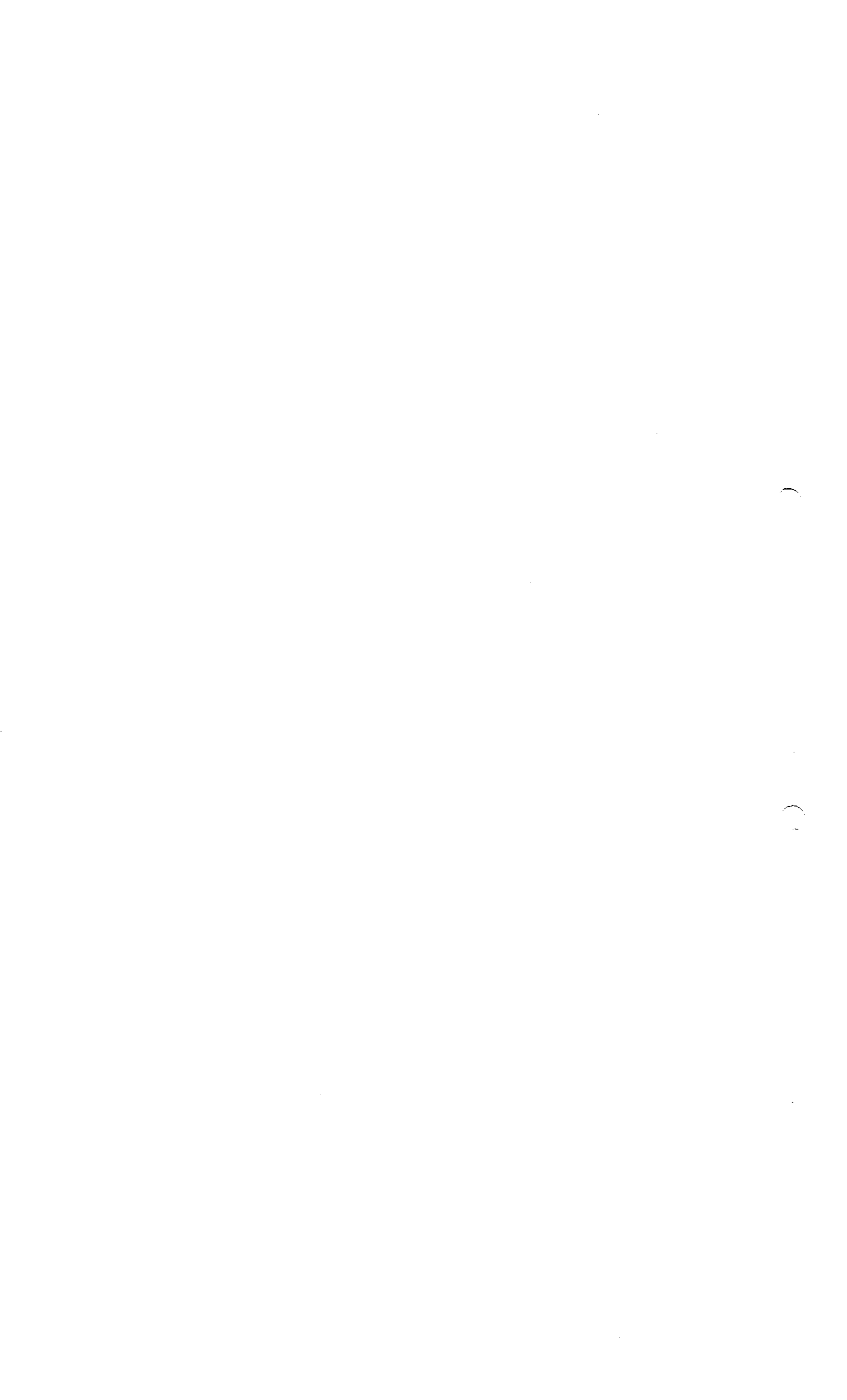
La recuperación porcentual media se encuentra entre el 80 % y el 120 %.

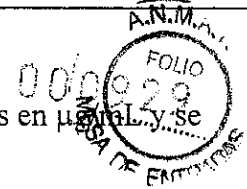
• Precisión

Se analizaron nueve grupos 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 realizó el mismo operador en diferentes días.

Dentro de cada grupo, se llevaron a cabo 2 análisis en 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.

ROXANA MONTEMILONE DIRECTORA TÉCNICA SANOFI PASTEUR S.A.
CHRISTIAN DOMINGUEZ APODERADO SANOFI PASTEUR S.A.





Los datos analizados corresponden a las concentraciones de cianuro expresadas en $\mu\text{g/L}$ y se presentan a continuación en la tabla 55.

Tabla 55: Contenido de cianuro residual en el PRP-AH: validación, precisión: Contenido de cianuros presente en el producto ($\mu\text{g/L}$)

Análisis	Grupo 1 ($\mu\text{g/L}$)	Grupo 2 ($\mu\text{g/L}$)	Grupo 3 ($\mu\text{g/L}$)	Grupo 4 ($\mu\text{g/L}$)	Grupo 5 ($\mu\text{g/L}$)	Grupo 6 ($\mu\text{g/L}$)	Grupo 7 ($\mu\text{g/L}$)	Grupo 8 ($\mu\text{g/L}$)	Grupo 9 ($\mu\text{g/L}$)
1	0,49	0,76	0,95	0,96	0,73	0,79	1,11	2,00	1,39
2	1,08	0,97	1,09	1,03	0,84	1,33	1,17	1,85	0,47

Se verifica la homogeneidad de las varianzas intragrupalas mediante una prueba de Cochran a un nivel de significancia del 5 %. Los parámetros de repetibilidad y precisión intermedia se calcularon utilizando el cálculo de varianzas (varianza de repetibilidad en los grupos completos, varianza intergrupala 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.

Tabla 56: Características de repetibilidad y precisión intermedia

Características	Desviación estándar	Coefficiente de variación	Intervalo de confianza del 95 %
Características de repetibilidad	0,297	28,11%	/
Características de precisión intermedia	0,405	38,38%	$\pm 0,855$

Se evaluó la precisión en un producto sin agregados, con un contenido de cianuros menor al límite inferior de cuantificación, lo cual explica los valores elevados de los coeficientes de variación de repetibilidad y precisión intermedia (aproximadamente, 28 % y 38 %).

Sin embargo, para la prueba de rutina, se le agrega al producto una cantidad conocida de cianuro. Además, se pudo evaluar la precisión intermedia del método a partir de los datos de linealidad y exactitud. Los coeficientes de variación obtenidos son, aproximadamente, del 6 %, 4 % y 4 % para los agregados de 2, 5 y 10 μg , respectivamente.

Los resultados de precisión se consideraron aceptables.

- Límite inferior de cuantificación

Se evaluó el diseño experimental a partir del testigo, obtenido en 18 corridas independientes.

Los datos analizados son la altura de los picos del testigo y se presentan en la tabla 57.



Tabla 57: Contenido de cianuro residual en el PRP-AH: validación, límite inferior de cuantificación; altura de los picos del testigo

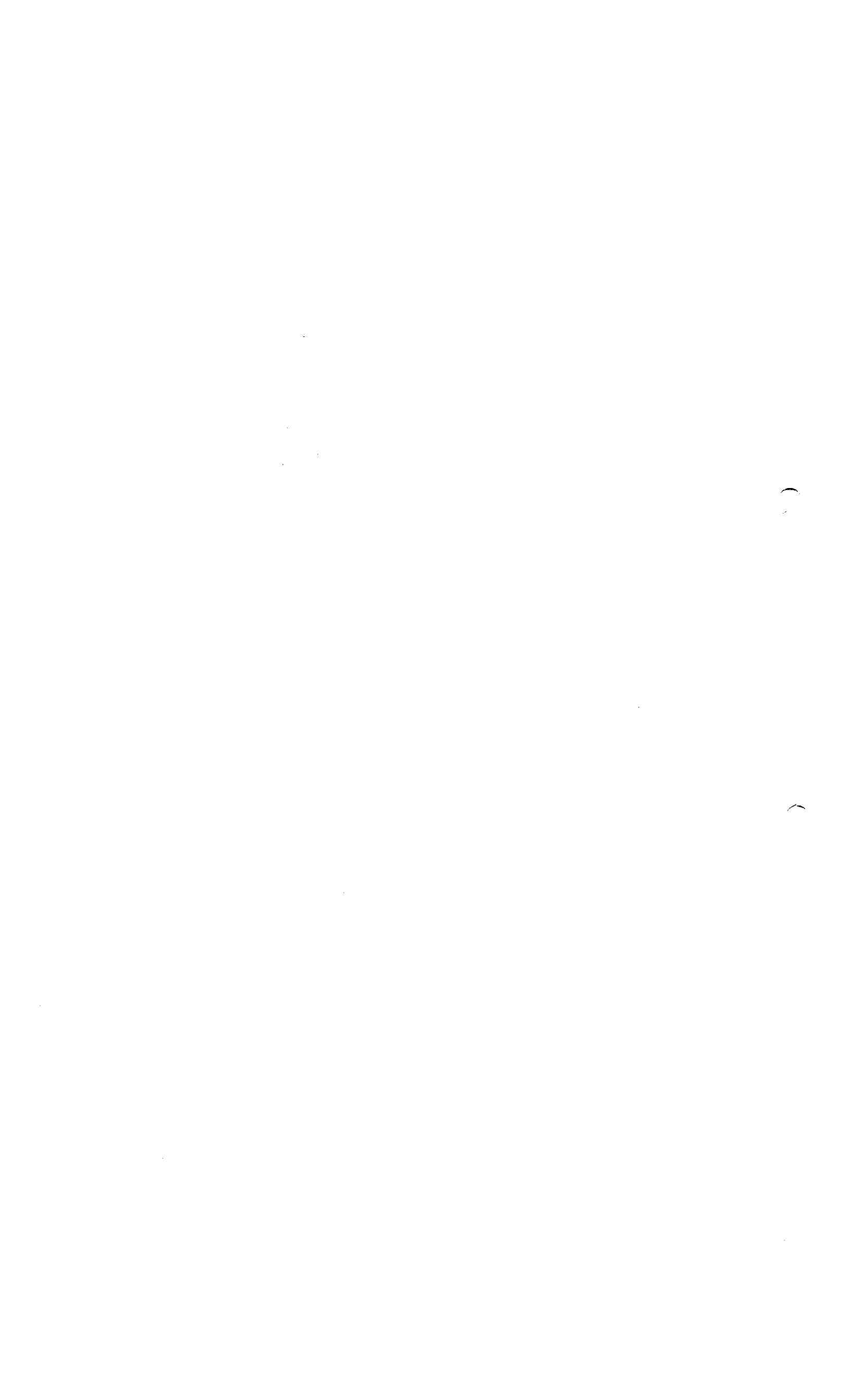
	Testigo
Día 1	6487 5489
Día 2	8298 6911
Día 3	6023 4811
Día 4	4271 5010
Día 5	7632 6669
Día 6	4760 5345
Día 7	7589 5219
Día 8	3821 4669
Día 9	4820 6717

Se calcularon la media y la desviación estándar de las mediciones del testigo (altura de los picos). Se determinó el límite inferior de cuantificación con la fórmula $LC = \text{media de las mediciones del testigo} + 10 \times \text{desviación estándar de las mediciones del testigo}$. Se determinó el límite inferior de cuantificación en la concentración con la ecuación de la curva estándar; el resultado obtenido es $LC = 0,79 \mu\text{g/L}$ que es inferior al límite inferior del rango de linealidad ($2,6 \mu\text{g/mL}$). Por lo tanto, éste último valor se establece como el límite inferior de cuantificación.

• **Conclusión**

El método es lineal en el rango: $[2,6 - 10,6] \mu\text{g/L}$ de cianuros. Se demuestra la exactitud en el mismo rango, con una recuperación promedio del 90%. La precisión del método se considera satisfactoria, ya que los coeficientes de variación de la precisión intermedia son, aproximadamente, del 6 %, 4 % y 4 % para los agregados de 2, 5 y 10 μg , respectivamente. El límite inferior de cuantificación es igual al límite inferior del rango de linealidad, que corresponde a $2,6 \mu\text{g/L}$.


El método es válido para el análisis de cianuros utilizando cromatografía de gases en el PRP-AH.

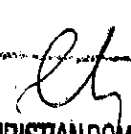




3.2.S.2.4

Control de los Pasos Críticos e Intermedios - Intermedio PTP - PRP-T


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.

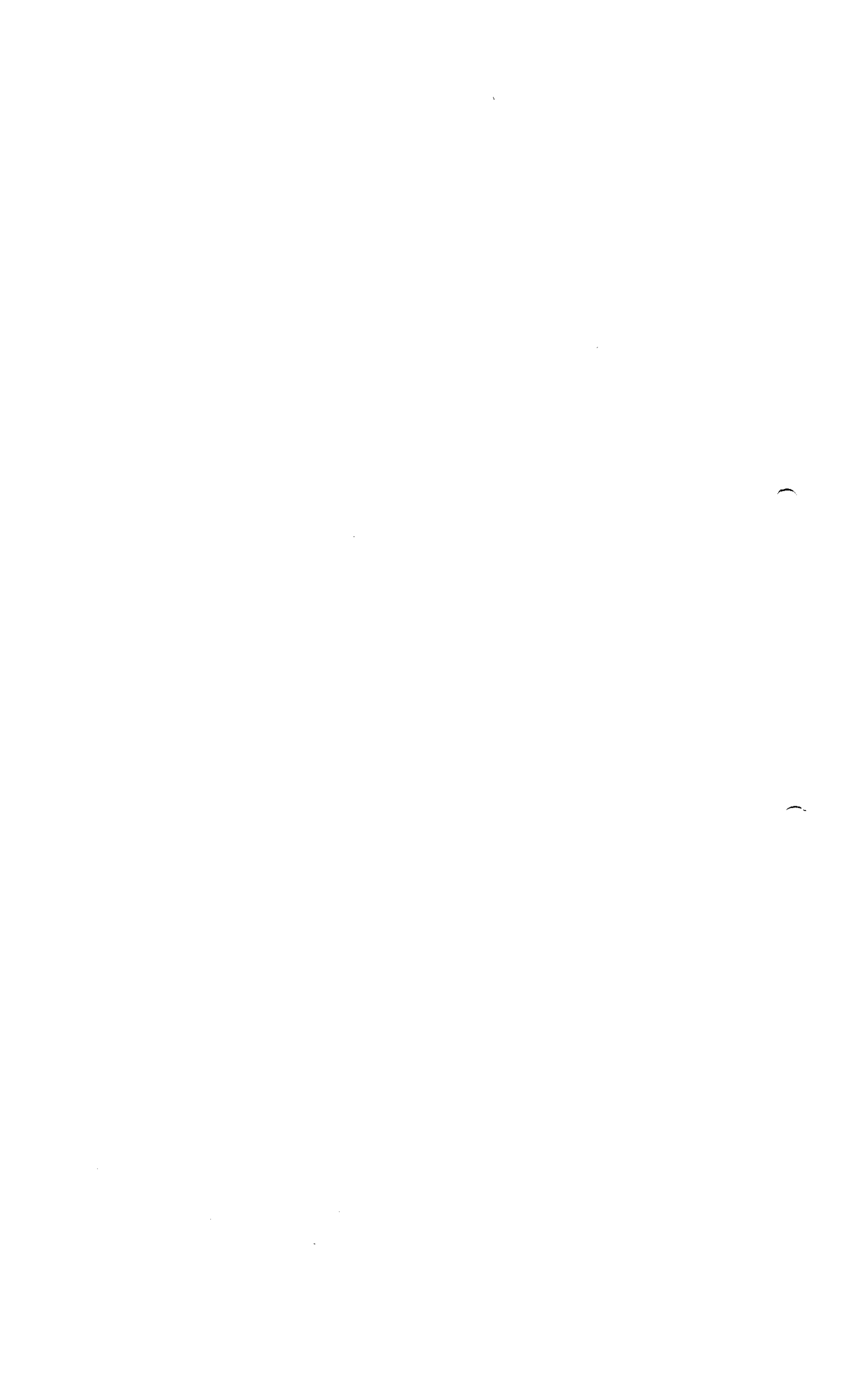


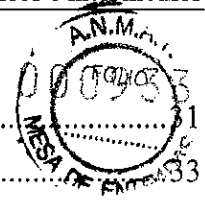


Sección 3.2.S.2.4 - Control de los pasos críticos e intermedios Producto intermedio PTP


Índice


Lista de tablas	3
Lista de figuras	5
1 Especificaciones	6
2 Procedimientos analíticos	7
2.1 Contenido de nitrógeno proteico y nitrógeno total	7
2.2 Proporción entre contenido de nitrógeno proteico y total.....	9
2.3 Densidad óptica a 280 nm y 260 nm.....	9
2.4 Título de floculación.....	9
2.5 Pureza antigénica	9
2.6 Distribución del tamaño molecular (HPLC): porcentaje de monómeros.....	9
2.7 Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica.....	11
3 Validación de los procedimientos analíticos	12
3.1 Contenido de nitrógeno proteico.....	12
3.2 Contenido de nitrógeno total.....	17
3.3 Índice DO_{280}/DO_{260}	22
3.4 Título de floculación.....	24
3.5 Distribución por tamaño molecular mediante HPLC (porcentaje de monómeros).....	26
4 Análisis de lotes.....	28
5 Justificación de las especificaciones.....	29
6 Sistema de cierre del envase	30
7 Estabilidad	31

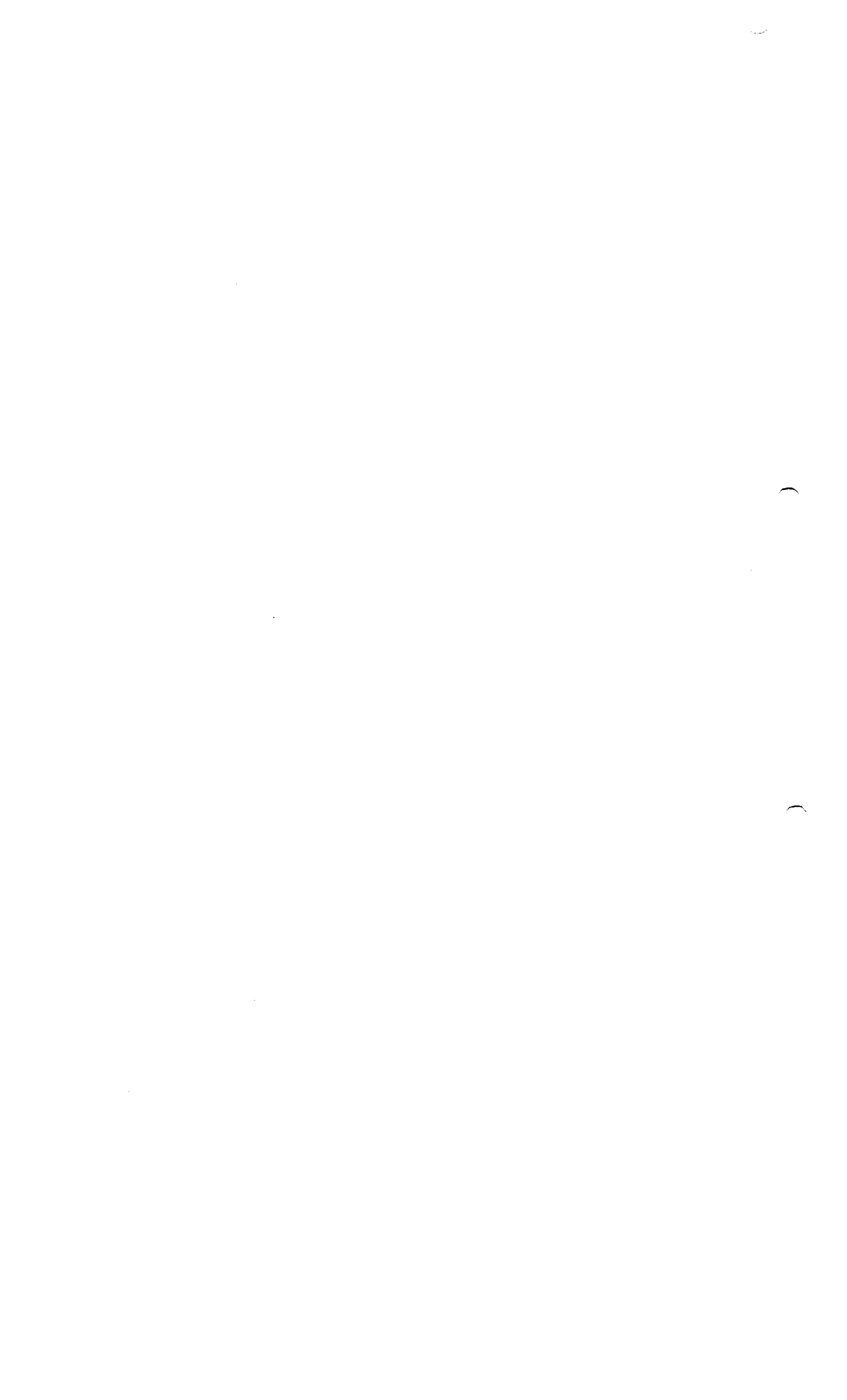




- 7.1 Resumen y conclusiones de estabilidad.....
- 7.2 Datos de estabilidad.....


ROXANA MONTEMILONE DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DOMINGUEZ APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.

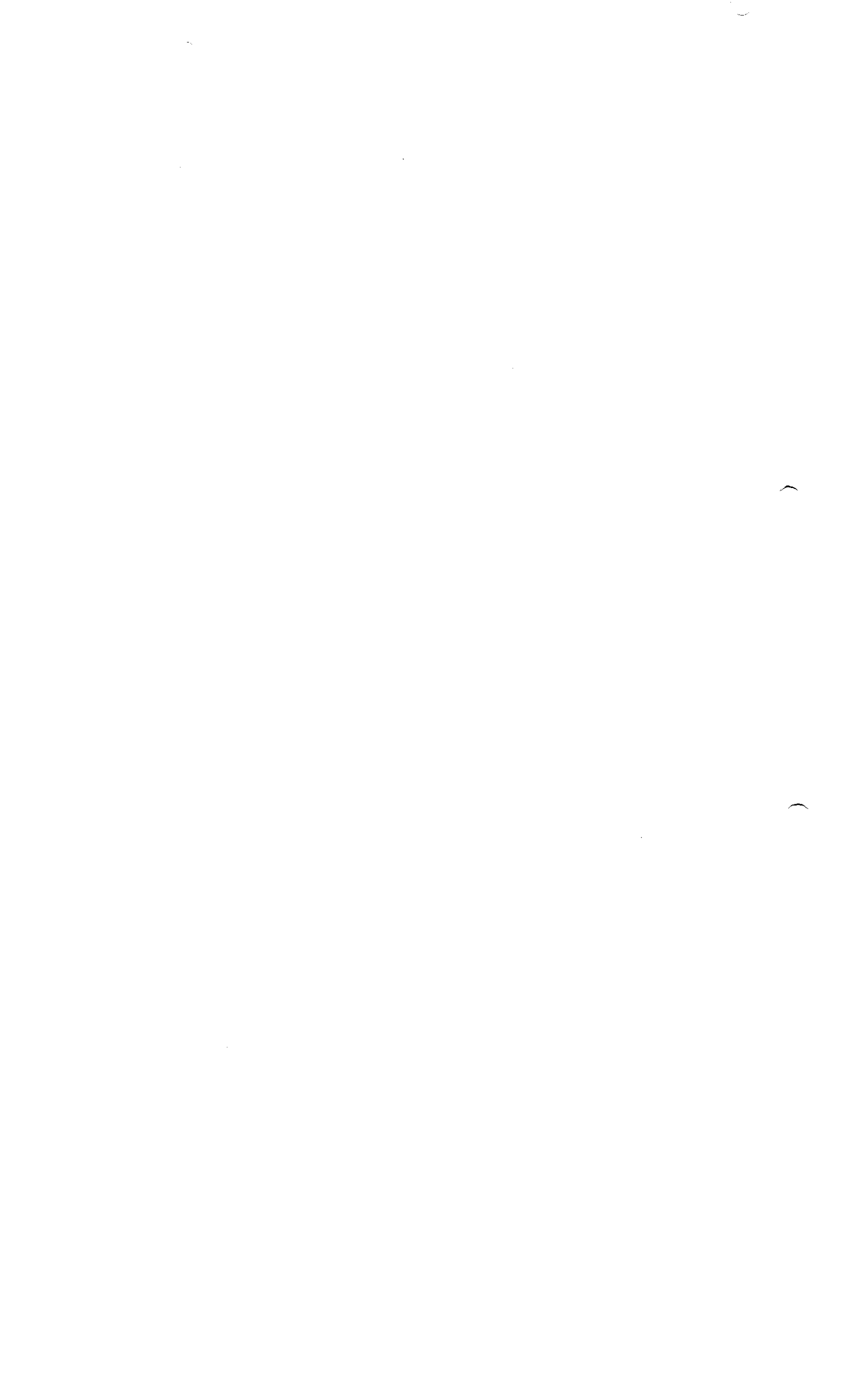


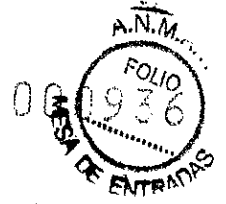


Lista de tablas

Tabla 1: Especificaciones de la proteína tetánica purificada (PTP)	6
Tabla 2: Condiciones cromatográficas	10
Tabla 3: Nitrógeno proteico en PTP, resumen de validación	12
Tabla 4: Nitrógeno proteico en PTP, validación: linealidad: cantidad de nitrógeno proteico en la muestra (µg)	13
Tabla 5: Nitrógeno proteico en el PTP: validación, exactitud: Factor de concentración calculado	14
Tabla 6: Recuperación porcentual media	15
Tabla 7: Nitrógeno proteico en el PTP: validación, precisión: Contenido de nitrógeno proteico (µg/mL)	15
Tabla 8: Características de repetibilidad y precisión intermedia.....	16
Tabla 9: Nitrógeno total en el PTP: validación, resumen.....	17
Tabla 10: Nitrógeno total en PTP: validación, linealidad: Cantidad de nitrógeno total en la muestra (µg)	18
Tabla 11: Nitrógeno total en PTP: validación, exactitud: Factor de concentración calculado.....	19
Tabla 12: Recuperación porcentual media	20
Tabla 13: Nitrógeno total en PTP: validación, precisión: contenido de nitrógeno proteico (µg/mL)	20
Tabla 14: Características de repetibilidad y precisión intermedia.....	21
Tabla 15: Índice DO ₂₈₀ /DO ₂₆₀ en el PTP: resumen de validación	22
Tabla 16: Índice DO ₂₈₀ /DO ₂₆₀ en el PTP: validación, precisión: Índices DO ₂₈₀ /DO ₂₆₀	22
Tabla 17: Características de repetibilidad y precisión intermedia.....	23
Tabla 18: Título de floculación en PTP: validación, resumen	24
Tabla 19: Título de floculación en la PTP: validación, precisión: títulos de floculación (Lf/mL) .	24
Tabla 20: Características de repetibilidad y precisión intermedia.....	25
Tabla 21: Distribución por tamaño molecular en la PTP: validación, resumen	26
Tabla 22: Distribución del tamaño molecular en la PTP: validación, precisión: resultados de los porcentajes de monómeros	26
Tabla 23: Características de precisión intermedia.....	27
Tabla 24: Resultados del análisis de lotes de PTP	28

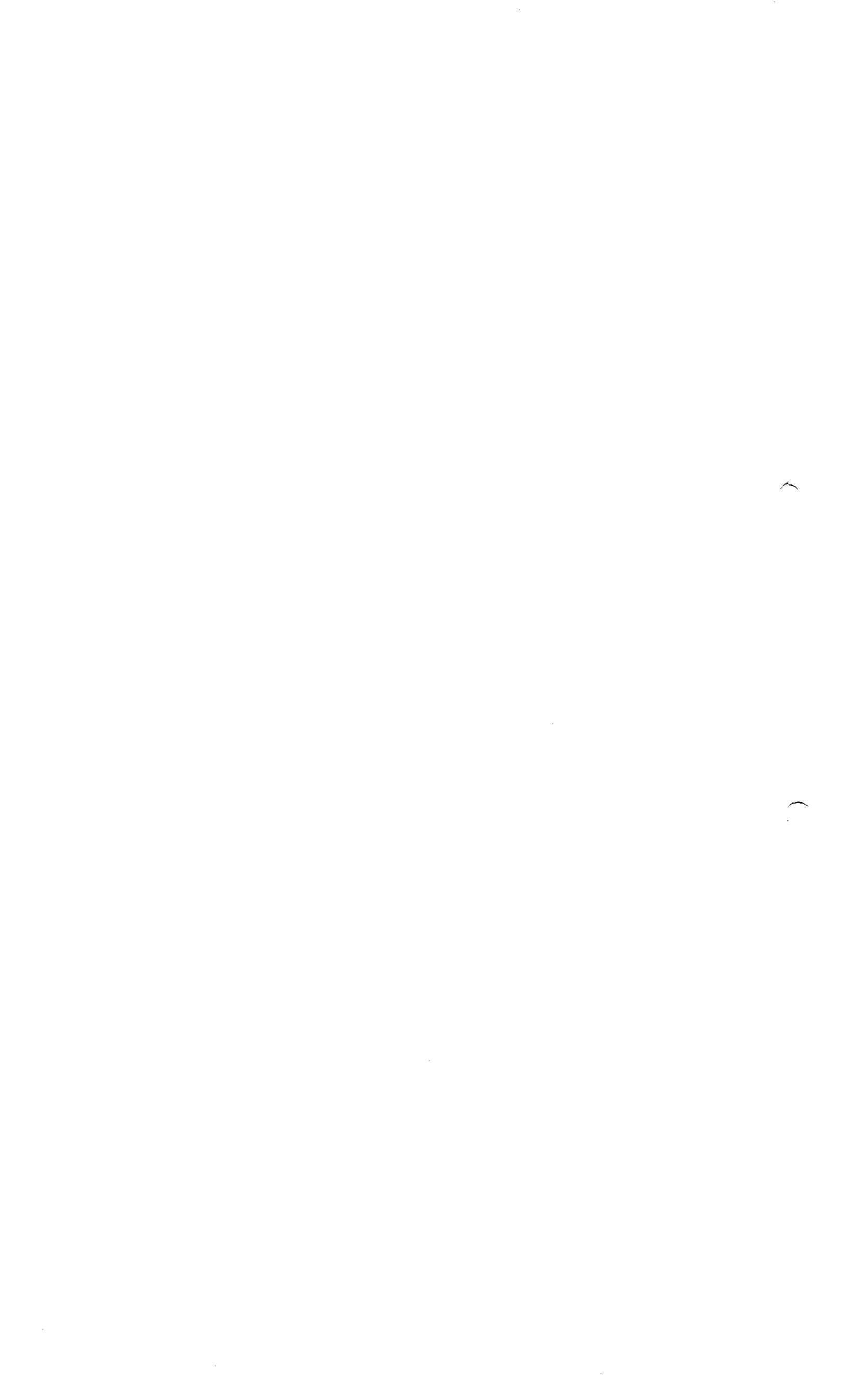






Lista de figuras

Figura 1: Nitrógeno proteico en PTP: validación, gráfica de linealidad14
Figura 2: Nitrógeno total en el PTP: validación, gráfica de linealidad19





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

1 Especificaciones

Tabla 1: Especificaciones de la proteína tetánica purificada (PTP)

Pruebas	Requeridas por	Métodos	Criterios de aceptación
Contenido de nitrógeno proteico	/	Ph. Eur. 2.5.9, edición actual, y 2.5.33, edición actual, método 7.A Método Kjeldahl después de la precipitación de proteínas con ácido tricloroacético y mineralización con ácido sulfúrico	Para calcular la proporción nitrógeno proteico / nitrógeno total y la pureza antigénica
Contenido de nitrógeno total	/	Ph. Eur. 2.5.9 Método Kjeldahl después de una mineralización con ácido sulfúrico	Para calcular la proporción nitrógeno proteico / nitrógeno total
Proporción nitrógeno proteico / nitrógeno total	/	Cálculo	≥ 0,8
Índice DO ₂₈₀ /DO ₂₆₀	/	Medición de la densidad óptica	≥ 1,3
Título de floculación	Ph. Eur. 0452/1219, edición actual TRS 800/897	Ph. Eur. 2.7.27, edición actual, prueba de Ramon. Floculación visible y comparación con una referencia calibrada	Para calcular la pureza antigénica
Pureza antigénica	Ph. Eur. 0452/1219, edición actual TRS 800/897	Cálculo: valor obtenido de la razón entre el título de floculación y el contenido de nitrógeno proteico.	>1500 Lf/mg de nitrógeno proteico
Distribución del tamaño molecular (HPLC), porcentaje de monómeros	/	Ph. Eur. 2.2.30, edición actual Cromatografía de exclusión por tamaño (HPLC)	> 50% de monómeros
Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica	Ph. Eur. 0452/1219, edición actual	Ph. Eur. 2.6.1, edición actual Filtración por membrana	Sin crecimiento microbiano





2 Procedimientos analíticos

Para los procedimientos analíticos descritos en la Farmacopea Europea (Ph. Eur.), sólo se proporciona la referencia y se mencionan detalles específicos si corresponde.

Para los procedimientos analíticos no descritos en la Ph. Eur., se proporcionan los métodos en este capítulo.

2.1 Contenido de nitrógeno proteico y nitrógeno total

Referencia

La prueba se lleva a cabo de acuerdo con la monografía 2.5.9 de la Ph. Eur. "Determination of nitrogen by sulphuric acid digestion" y 2.5.33 "Total protein" (método 7.A) con el método de Kjeldhal.

Principio

El nitrógeno orgánico que contiene la muestra analizada se transforma en sulfato de amonio durante una mineralización sulfúrica. Después de alcalinizar con hidróxido de sodio, se recolecta el amoníaco destilado y se analiza con una solución titulada de ácido clorhídrico.

Como se indica en la Ph. Eur. 2.5.33 método 7.A, la interferencia causada por la presencia en la muestra de prueba de otras sustancias que contienen nitrógeno puede afectar la determinación de proteínas mediante este método. En consecuencia, se realiza una precipitación de la solución de PTP con ácido tricloroacético antes del análisis de determinación del nitrógeno a fin de analizar el contenido de nitrógeno proteico.

Equipos y reactivos

- **Equipo:** equipo estándar de laboratorio con centrifugadora, unidad y tubos de digestión y sistema de destilación Kjeldahl.
- **Reactivos:** agua purificada desionizada, hidróxido de sodio 1 N, ácido sulfúrico concentrado y 2/3 N, solución de 5 glucosa monohidrato a razón de 50 g/L en agua purificada, ácido clorhídrico 0,01N en agua purificada, sulfato dipotásico, sulfato de cobre, selenio negro, ácido tricloroacético al 40 % p/v en agua purificada y ácido tricloroacético al 5 % p/v en agua purificada, solución de control a razón de 200 µg/mL de nitrógeno en agua purificada (por lo común usar sulfato de amoníaco desecado).

Soluciones

- **Catalizador de mineralización:** proporciones relativas: 100 g de sulfato dipotásico, 5 g de sulfato de cobre y 2,5 g de selenio, mezclado y molido en mortero.
- **Solución muestra para el contenido de nitrógeno total:** agregue 2 mL de la solución de PTP analizada en un tubo de digestión. Duplicar.
- **Solución muestra para el contenido de nitrógeno proteico:** utilice 2 mL de la solución de PTP analizada y complete hasta 5 mL con agua purificada. Agregue 3 mL de solución de

