

ácido tricloroacético al 40 % p/v, agite enérgicamente y deje a temperatura ambiente. Centrifugue a 4000 rpm durante varios minutos y deseche el sobrenadante. Agregue 5 mL de solución de ácido tricloroacético al 5% p/v, agite enérgicamente y deje a temperatura ambiente. Centrifugue a 4000 rpm durante varios minutos y deseche el sobrenadante. Disuelva el precipitado con 1 mL de solución de hidróxido de sodio 1 N. Agregue a un tubo de digestión. Duplique.

- **Aparato testigo:** corresponde a un tubo de digestión vacío. Triplique.
- **Testigo digerido:** agregue 1 mL de solución de 50 g/L de glucosa monohidrato a un tubo de digestión. Duplique.
- **Solución de control:** agregue 1 mL de solución interna de control de nitrógeno a razón de 2 mg/mL a un tubo de digestión. Duplique.

Procedimiento operativo

Para digerir los tubos del aparato testigo, las soluciones de control, el testigo digerido y las soluciones muestra para determinar el contenido de nitrógeno total o de nitrógeno proteico, agregue 1 comprimido del catalizador de mineralización y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado.

La digestión se realiza con una unidad de digestión Kjeldahl (por lo común durante 120 minutos, con 40 minutos a + 200 °C, 40 minutos a + 300 °C y 40 minutos a + 400 °C). Las condiciones pueden variar según el equipo utilizado.

Lectura, cálculo, resultados

Considerando que 1 mL de HCl 0,01 N corresponde a 0,14 mg de nitrógeno, se utilizan las siguientes ecuaciones para calcular el contenido de nitrógeno de las soluciones muestra y de control:

$$\text{mg de nitrógeno por mL de muestra} = \frac{(V - V_0) \times 0,14 \times d}{X}$$

$$\text{mg de nitrógeno por mL de control interno} = \frac{(V - V_0') \times 0,14 \times d}{1}$$

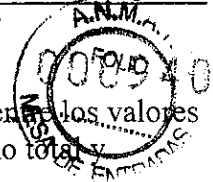
Donde:

- V = volumen de HCl 0,01 N usado para la solución de muestra digerida (en mL)
- V₀ = volumen medio de HCl 0,01 N usado para las soluciones testigo digeridas (en mL)
- V_{0'} = volumen medio de HCl 0,01 N usado para el testigo del aparato (en mL)
- X = volumen de la muestra de prueba del producto (en mL)
- D = dilución

Criterios de validez

El resultado correspondiente a la solución de control debe estar dentro de los límites establecidos en la gráfica de control.





La diferencia entre los valores de los 2 ensayos del control interno y la diferencia entre los valores de los 2 ensayos de soluciones de muestra (respectivamente, contenido de nitrógeno total y nitrógeno proteico) es inferior al 10 % (no es aplicable si VV_0 es bajo).

2.2 Proporción entre contenido de nitrógeno proteico y total

Calcule la proporción entre el contenido de nitrógeno proteico y el contenido de nitrógeno total en la PTP obtenidos con el método indicado en el capítulo 2.1.

2.3 Densidad óptica a 280 nm y 260 nm

La absorción de la solución de PTP analizada se mide con un espectrofotómetro a 280 nm y 260 nm usando agua purificada como blanco. Se calcula el índice de $DO_{280\text{ nm}}/DO_{260\text{ nm}}$.

2.4 Título de floculación

Esta prueba se aplica de acuerdo con los requisitos de la monografía 2.7.27 de la Ph. Eur. "Prueba de Ramon".

2.5 Pureza antigénica

Para calcular la pureza antigénica, el título de floculación se divide entre el contenido de nitrógeno proteico de la muestra y se expresa en Lf/mg de nitrógeno proteico.

2.6 Distribución del tamaño molecular (HPLC): porcentaje de monómeros

Referencia

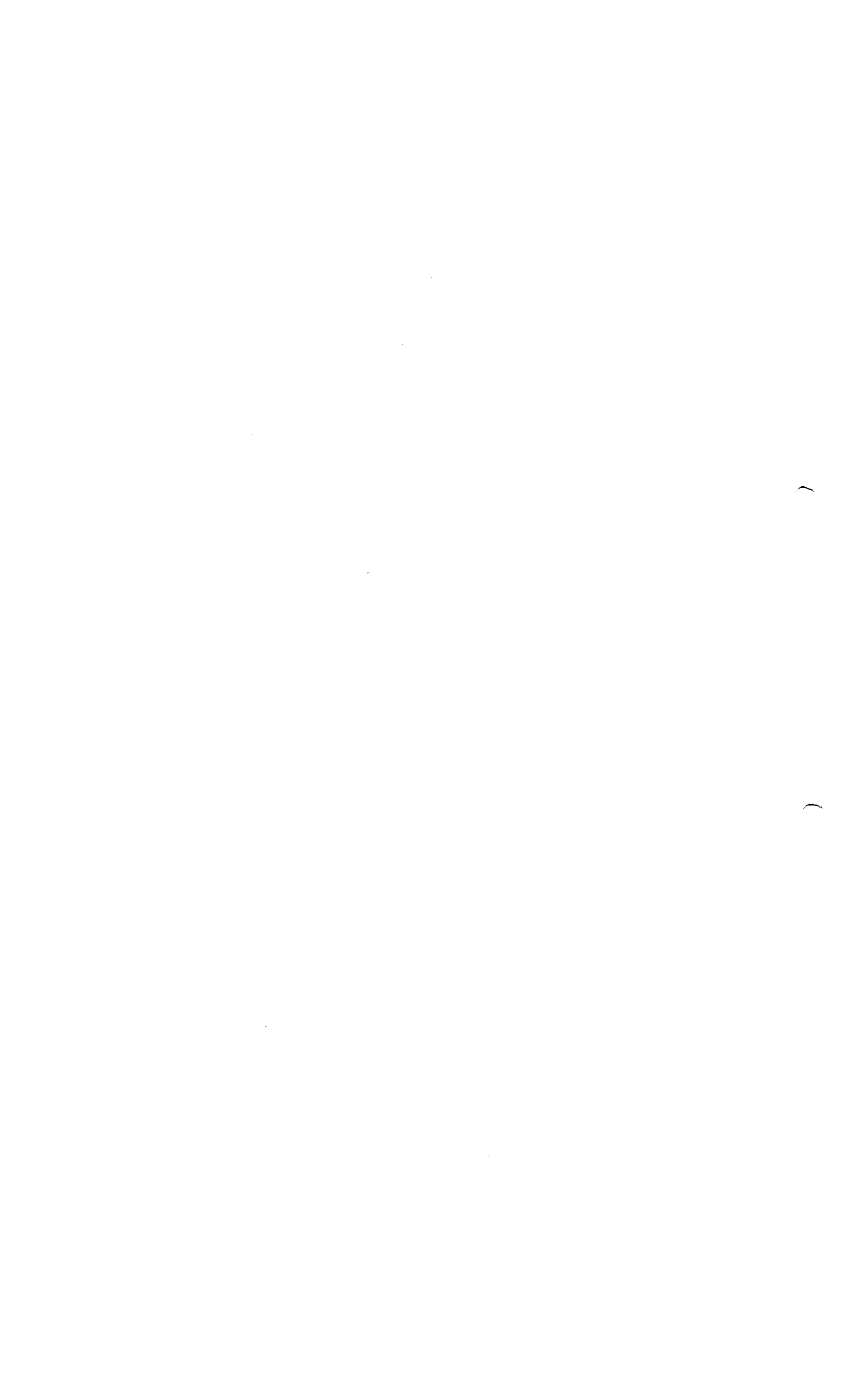
Ph. Eur., prueba general 2.2.30 "Cromatografía de exclusión por tamaño"

USP <621> Cromatografía de exclusión por tamaño.

Principio

Se realiza el análisis con un sistema de HPLC con una columna de tamiz molecular. La cromatografía de exclusión por tamaño es un método en el que se separan los componentes de una mezcla según su tamaño molecular basándose en el flujo de la muestra a través de un relleno poroso. Las biomoléculas grandes que no pueden pasar por los poros del material del relleno se eluyen primero de la columna. Las moléculas más pequeñas pueden ingresar parcial o totalmente en las partículas del relleno. Se eluirán de la columna después de los componentes de la muestra excluidos.

Luego, las moléculas separadas se detectan con un espectrofotómetro UV. El tiempo de retención es inversamente proporcional a su peso molecular. El resultado se expresa como un coeficiente de partición (K_D).





Equipos y reactivos

- **Equipo:** equipo de laboratorio estándar; el equipo específico que se debe utilizar es:
 - Sistema computarizado de HPLC con detector UV
 - Columna de 7,5 x 300 mm, TOSOHAAS TSK gel G3000SW o equivalente
 - Filtros de 0,22 µm y 0,45 µm.
- **Reactivos:** fosfato de sodio monohidrato, fosfato disódico de hidrógeno dihidrato, solución de cloruro de sodio al 0,9%, azida sódica, agua (ultrafiltrada) y kit de calibración para probar la columna.

Soluciones

- **Tampón de fase móvil:** proporciones relativas: fosfato disódico de hidrógeno dihidratado 4,873 g; fosfato de sodio monohidratado 1,741 g; cloruro de sodio 11,688 g; azida de sodio 0,050 g completada hasta 1000 mL de agua. Filtrar a través de un filtro de 0,22-µm.
- **Agua de azida:** proporciones relativas: 1 g de azida sódica completada hasta 2000 mL de agua. Filtre a través de un filtro de 0,22-µm.
- **Muestra:** diluir la muestra en tampón de fase móvil a 2 mg/mL. Filtrar a través de un filtro de 0,22-µm. Transfiera una alícuota al vial para HPLC.

Procedimiento operativo

Una vez equilibrado el sistema con la fase móvil, llevar a cabo el análisis de las muestras apropiadas usando las condiciones cromatográficas que se describen en la Tabla 2.

Tabla 2: Condiciones cromatográficas

Bomba	Inyector	Detección
Tasa de flujo: 0,5 mL/min. 100% elución isocrática del tampón de fase móvil	Volumen de inyección: 30 µL	Detección de UV λ = 280 nm

Al final de una corrida, se deben enjuagar el sistema y las columnas con agua de azida.

Lectura, cálculo, resultados

Los cromatógrafos se integran con métodos apropiados.

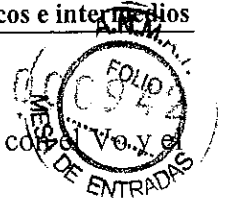
Ajustar, si es necesario, las líneas base hasta alcanzar el nivel inferior de los picos.

El kit de calibración permite determinar el V_0 el V_t del sistema cromatográfico.

El perfil de elución obtenido muestra dos pequeños picos, a saber, los polímeros y los dímeros de la proteína tetánica y un pico principal que representa los monómeros de la proteína tetánica. El software calcula el área relativa de cada componente.

Criterios de validez

La prueba de calibración de la columna debe ser satisfactoria.



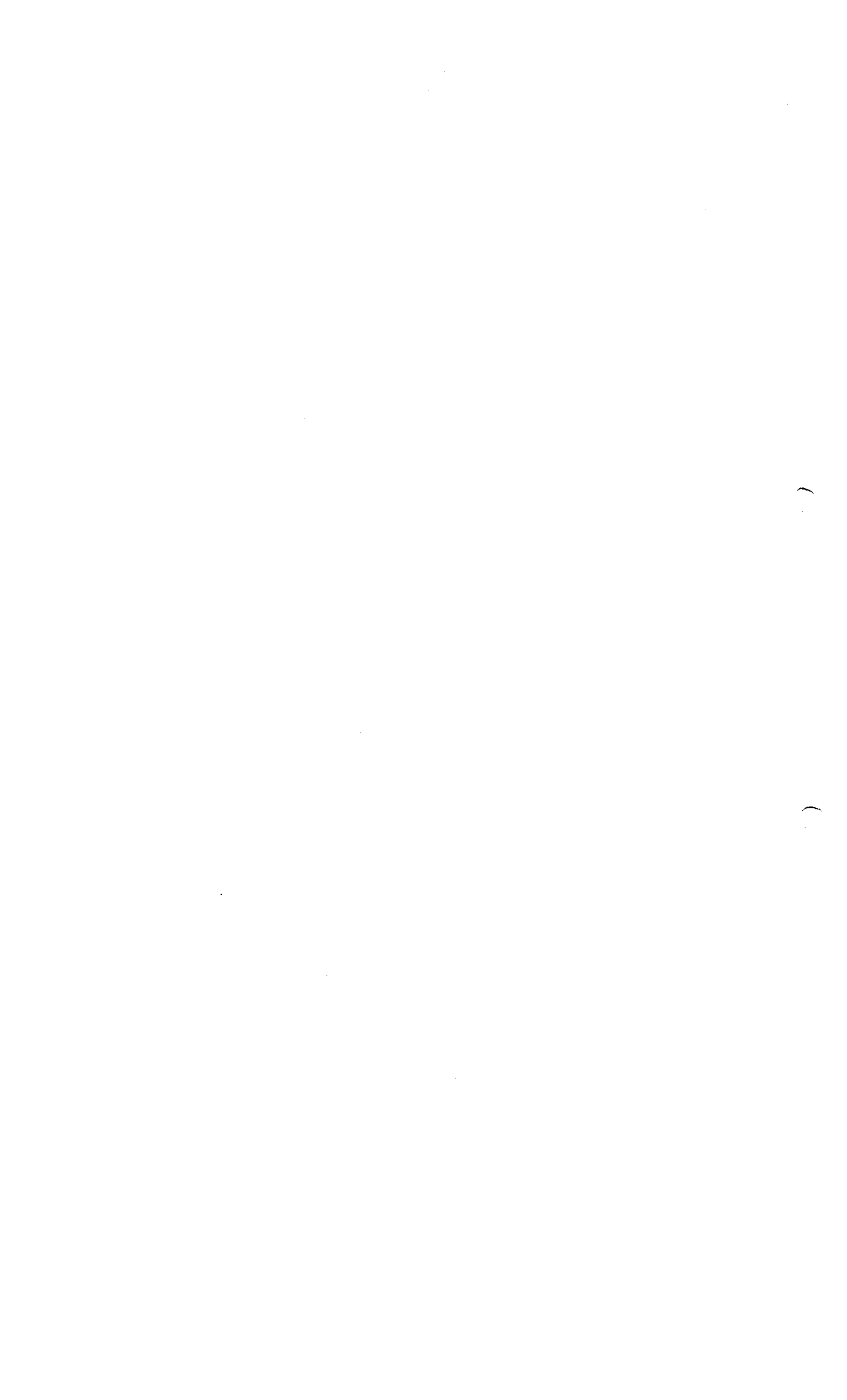
El K_D del monómero de la proteína tetánica se encuentra entre 0,20 y 0,30 (calcular con V_t determinados a partir del análisis con el kit de calibración).

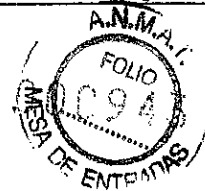
La línea base debe ser estable.

Ausencia de picos de parásitos.

2.7 Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica

Esta prueba se aplica de acuerdo con los requisitos de la monografía 2.6.1 de la Ph. Eur. "Esterilidad".





3 Validación de los procedimientos analíticos

Se proporcionan los resultados de validación para las pruebas utilizadas para liberar los intermedios, cuando estas pruebas no se describen en la Ph. Eur.

La validación se llevó a cabo según los lineamientos de la ICH Q2 (R1) "Procedimientos analíticos de validación: texto y metodología".

3.1 Contenido de nitrógeno proteico

La prueba de análisis de nitrógeno proteico utilizando el método de Kjeldhal después de la precipitación de proteínas (con base en las monografías de la Ph. Eur. números 2.59 y 2.5.33, método 7.A) en la PTP se describe en el capítulo 2.1. Como ensayo cuantitativo, se evaluaron la linealidad, la exactitud y la precisión. El método es específico para el ión amonio después de la mineralización sulfúrica del nitrógeno orgánico; no se estudió el parámetro de especificidad. Se presenta un resumen de la validación en la Tabla 3.

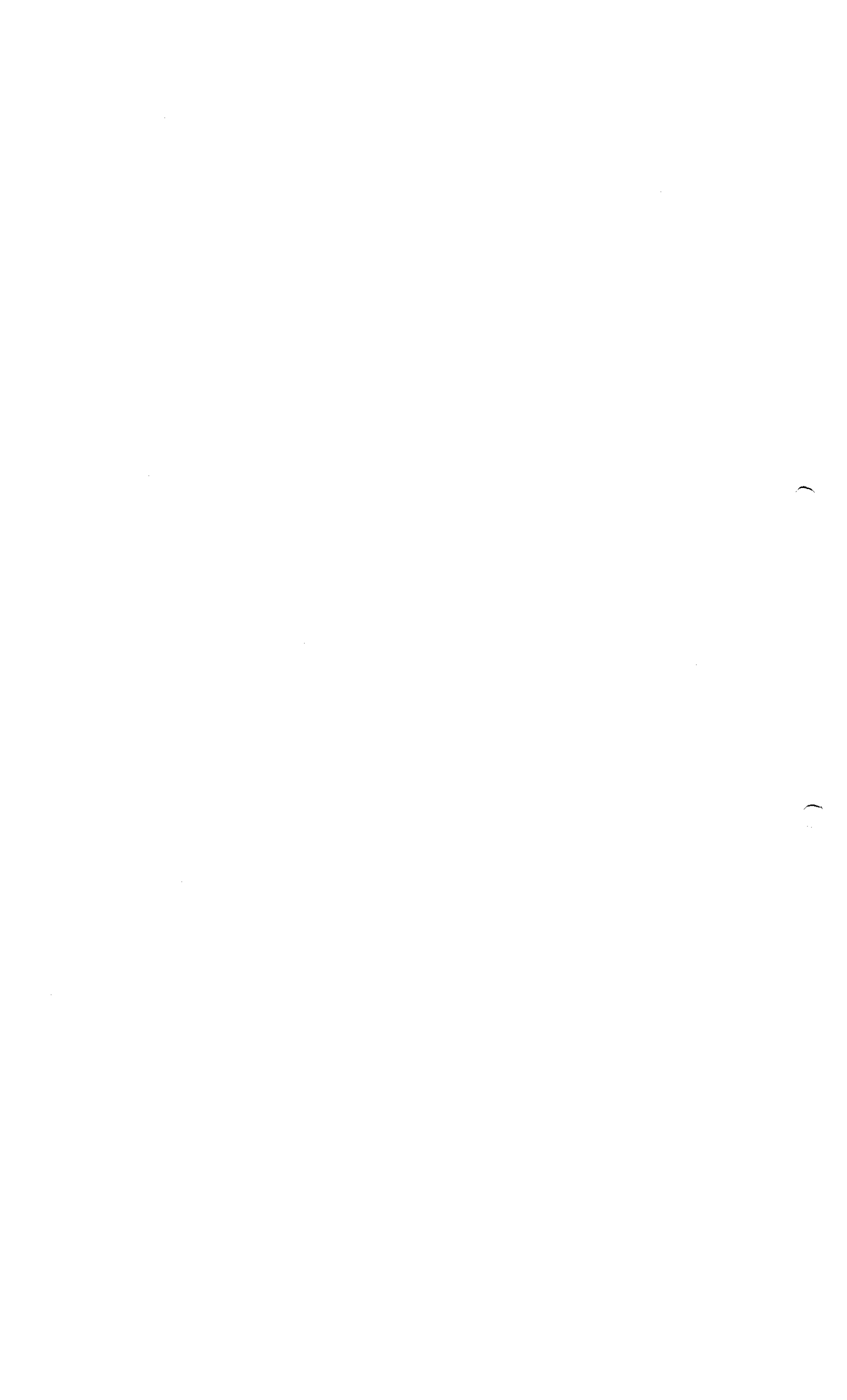
Tabla 3: Nitrógeno proteico en PTP, resumen de validación

Características	Criterios de aceptación	Resultados
Linealidad	Significancia de la pendiente: $P_{linealidad} < 0,01$ No hay desviación de la linealidad: $P_{desviación\ de\ la\ linealidad} > 0,05$	$P_{linealidad} < 0,0001$; $P_{desviación\ de\ la\ linealidad} = 0,87$ Después del ajuste lineal de $Y =$ concentración medida en función de $X =$ volumen de solución sometido a prueba, se destaca la siguiente relación: $Y = -11,12 + 106,98 \cdot X$ Coeficiente de correlación lineal $r = 0,9940$ con 13 grados de libertad Rango de linealidad: [60 - -560] μg
Exactitud	El valor 100% está incluido dentro del intervalo de confianza del porcentaje promedio de recuperación.	La recuperación porcentual media y sus límites de confianza del 95 % son los siguientes: 97 % [88 % - - 106 %]
Precisión	Sin límite asignado	Los parámetros de repetibilidad y precisión intermedia son respectivamente iguales a: - Coeficiente de variación: 6,2 % y 6,4 % - Intervalos de confianza del 95 % de precisión intermedia para 1 corrida con una medición realizada de la manera habitual: $\pm 13,7 \mu\text{g/mL}$

3.1.1 Linealidad

Tres operadores llevaron a cabo tres pruebas independientes. Cada corrida incluyó un rango de 5 volúmenes de la solución de PTP sometida a prueba.

Los datos analizados son las cantidades de nitrógeno proteico expresado en mg, y se presentan en la Tabla 4.



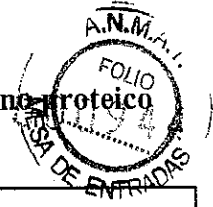


Tabla 4: Nitrógeno proteico en PTP, validación: linealidad: cantidad de nitrógeno proteico en la muestra (µg)

Volumen de la solución de PTP de análisis (mL)	Grupo 1 (µg)	Grupo 2 (µg)	Grupo 3 (µg)
1	102,2	111,3	56,0
2	210,8	229,0	184,2
3	317,7	320,7	303,0
4	418,0	410,8	423,6
5	533,5	496,5	530,0

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 (volumen muestra de la solución de PTP) y las cantidades medidas de nitrógeno proteico, al igual que la linealidad de esta relación, se prueban mediante un análisis de varianza de la regresión. El análisis de varianza permite concluir la significancia de la pendiente ya que el valor de linealidad P usando la tabla Snedecor a un nivel de significancia del 1% es inferior al 1% (valor P < 0,0001), y una desviación insignificante de la linealidad ya que el valor P de la falta de ajuste de la linealidad con la tabla Snedecor al 5 % es superior al 5 % (valor P = 0,87).

La ecuación de la línea recta de regresión es:

$$Y = (11,12 \pm 23,37) + (106,98 \pm 7,05) X$$

Donde:

- X = volumen (mL)
- Y = cantidad medida de nitrógeno proteico (µg)
- Coeficiente de correlación lineal r = 0,9940 con 13 grados de libertad
- Rango de linealidad: [60,15 - 59,5] µg de nitrógeno proteico

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.

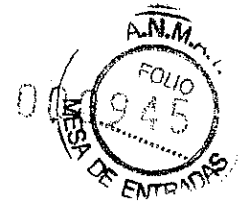
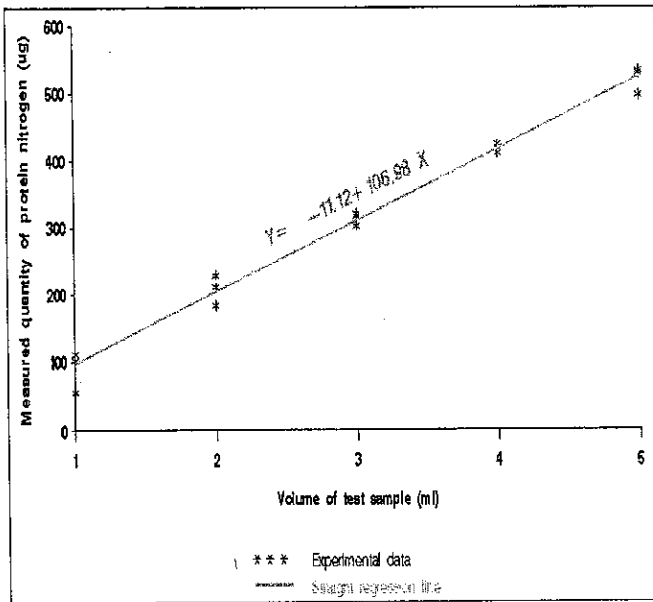


Figura 1: Nitrógeno proteico en PTP: validación, gráfica de linealidad



3.1.2 Exactitud

Los datos analizados corresponden al factor de concentración calculado, a partir de los resultados obtenidos en la prueba de linealidad (vea la Tabla 4). Los factores de concentración teórica corresponden a la proporción entre el volumen analizado de la solución de PTP y el volumen de PTP a razón de 2 mL (volumen típico de uso de rutina). Los factores de concentración medidos corresponden a la proporción del contenido de nitrógeno proteico obtenido con el volumen de la prueba con respecto al contenido de nitrógeno proteico obtenido con el volumen de PTP a 2 mL. Los resultados del factor de concentración en los cuatro niveles involucrados se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5: Nitrógeno proteico en el PTP: validación, exactitud: Factor de concentración calculado

Factor de concentración teórica	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
0,5	0,48	0,49	0,30
1,5	1,51	1,40	1,64
2,0	1,98	1,79	2,30
2,5	2,53	2,17	2,88

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 significación del 5 %

Se demuestra la igualdad de las medias entre los niveles mediante el análisis de varianza y se calcula la recuperación porcentual media con límites de confianza del 95%:

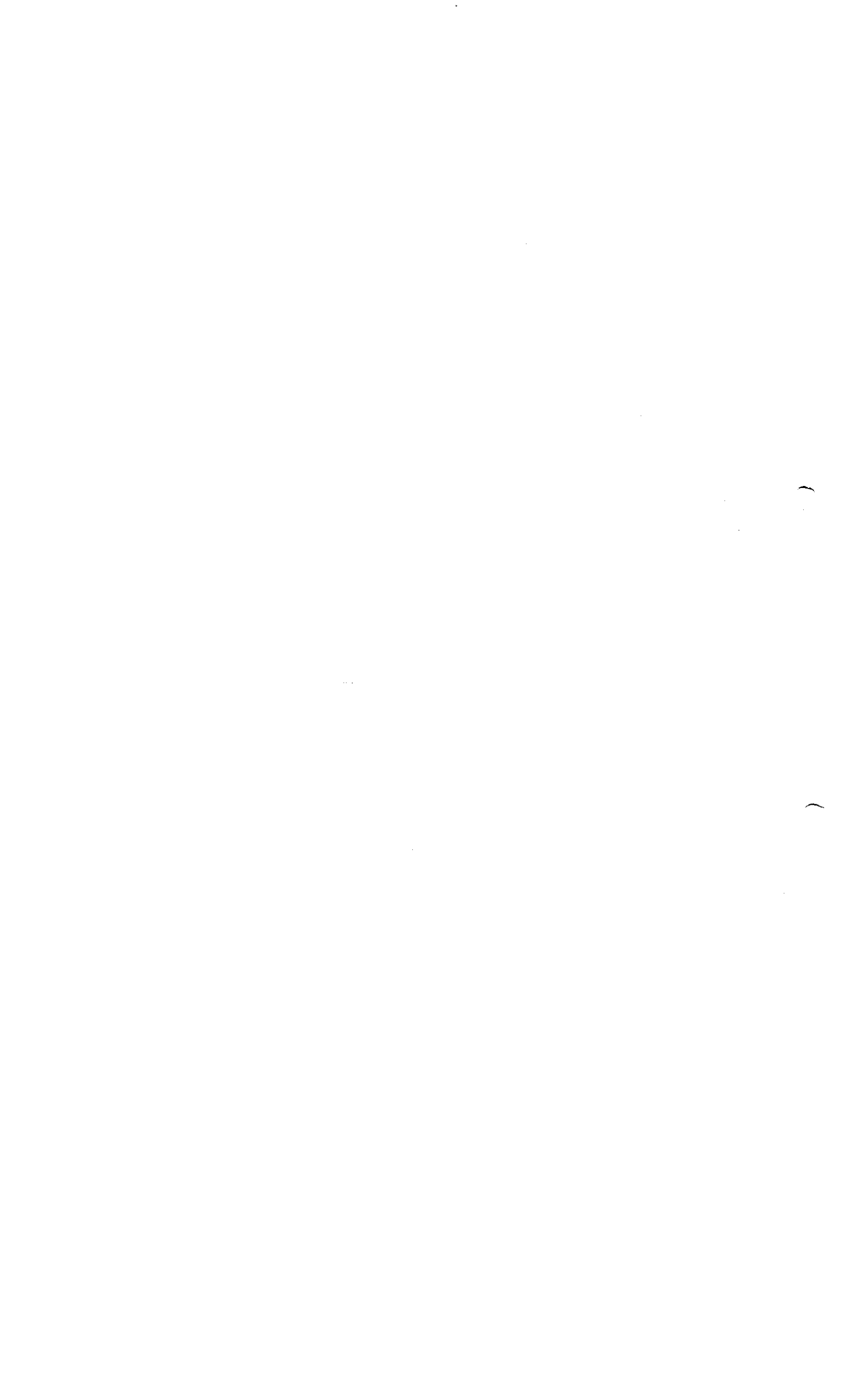




Tabla 6: Recuperación porcentual media

Recuperación porcentual	Límites de confianza del 95 %
97%	[88 - 106]%

El valor 100% está dentro de los límites de confianza.

3.1.3 Precisión

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

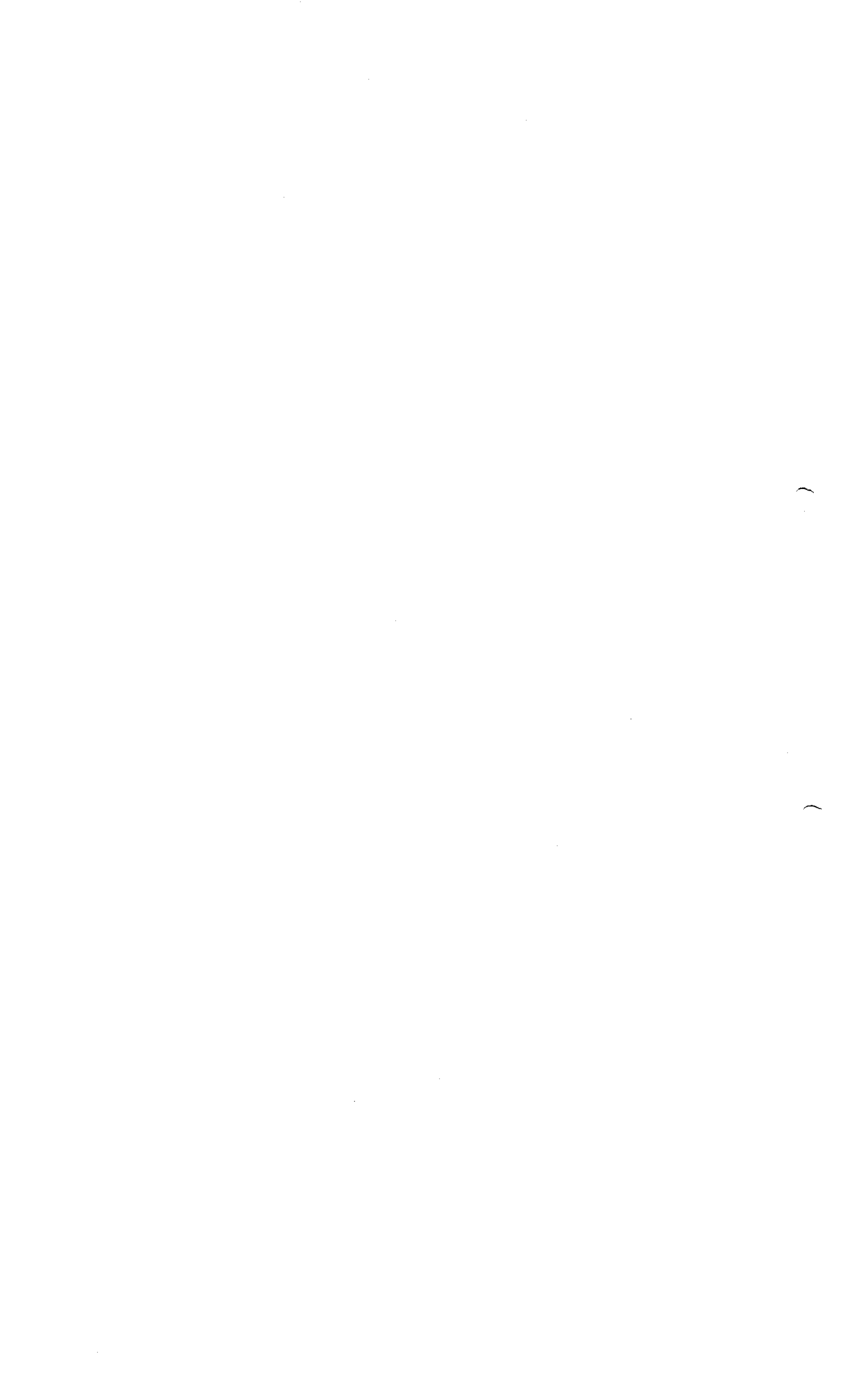
Dentro de cada grupo, se llevaron a cabo 6 análisis bajo condiciones que garantizaban la repetibilidad: los análisis se llevaron a cabo en forma independiente utilizando el mismo método, en una muestra primaria homogénea, en el mismo laboratorio, con los mismos equipos y los realizó el mismo operador en una corrida de 3 días.

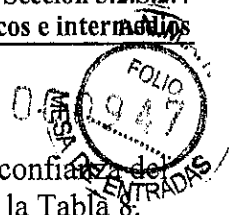
Los datos analizados son las concentraciones del contenido de nitrógeno proteico expresado en mg/mL, y se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7: Nitrógeno proteico en el PTP: validación, precisión: Contenido de nitrógeno proteico (µg/mL)

Análisis	Grupo 1 (µg/mL)	Grupo 2 (µg/mL)	Grupo 3 (µg/mL)
1	108,5	107,8	105,0
2	101,2	107,8	107,1
3	105,0	106,4	91,7
4	97,3	102,9	94,5
5	107,8	103,6	93,8
6	98,0	88,9	93,8

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.





Las características de repetibilidad y precisión intermedia, así como el intervalo de confianza del 95% para 1 corrida (1 medición) que se lleva a cabo habitualmente, se presentan en la Tabla 8.

Tabla 8: Características de repetibilidad y precisión intermedia

Características	Desviación estándar	Coefficiente de variación	Intervalo de confianza del 95 %
Características de repetibilidad	6,29	6,22%	/
Características de precisión intermedia	6,50	6,42%	±3,71 µg/mL

3.1.4 Conclusión

El método es lineal en el rango: [60 - 560] µg de nitrógeno proteico. Se demuestra la exactitud en el mismo rango, con una recuperación media del 97%. La precisión del método se verifica ya que la repetibilidad y el coeficiente de precisión intermedia de las variaciones son de alrededor del 6%.

El método es válido para medir el nitrógeno proteico en la solución de PTP utilizando el método Kjeldahl.





3.2 Contenido de nitrógeno total

La prueba de contenido total mediante el método de Kjeldhal (con base en las monografías 2.5.9 y 2.5.33, método 7.A de la Ph. Eur.) en el PTP se describe en el capítulo 2.1. Como análisis cuantitativo, se evaluaron la linealidad, la exactitud y la precisión. El método es específico para el ión amonio después de la mineralización sulfúrica del nitrógeno orgánico. En la Tabla 9 se presenta un resumen de la validación.

Tabla 9: Nitrógeno total en el PTP: 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 del ajuste lineal de $Y =$ concentración medida en función de $X =$ volumen de solución sometido a prueba, se indica la siguiente relación: $Y = 1,84 + 112,44 \cdot X$ Coeficiente de correlación lineal $r = 0,9992$ con 13 grados de libertad Rango de linealidad: [100 - -578] μg
Exactitud	El valor 100% está incluido dentro del intervalo de confianza de recuperación porcentual medio.	La recuperación porcentual promedio y sus límites de confianza del 95 % son los siguientes: 100,4 % [99.6 % - 101.1 %]
Precisión	Sin límite asignado	Los parámetros de repetibilidad y precisión intermedia son respectivamente iguales a: - Coeficiente de variación: 2,9 % y 2,9 % - Intervalos de confianza del 95 % de precisión intermedia para 1 corrida con una medición realizada de la manera habitual: $\pm 6,8 \mu\text{g/mL}$





3.2.1 Linealidad

Tres operadores llevaron a cabo tres pruebas independientes. Cada corrida incluyó un rango de 5 volúmenes de muestra de solución de PTP analizada.

Los datos analizados son cantidades de nitrógeno total expresadas en μg y se presentan a continuación en la Tabla 10.

Tabla 10: Nitrógeno total en PTP: validación, linealidad: Cantidad de nitrógeno total en la muestra (μg)

Solución de PTP analizada (mL)	Grupo 1 (μg)	Grupo 2 (μg)	Grupo 3 (μg)
1	112,7	113,4	116,2
2	228,2	221,2	228,2
3	341,6	334,6	347,2
4	461,3	441,0	450,8
5	575,4	550,9	564,9

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 %. Se evalúan, mediante un análisis de varianza de la regresión, la dependencia entre las cantidades esperadas (volumen de muestra de la solución de PTP) y las cantidades de nitrógeno proteico medidas, así como la linealidad de esta relación. 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 = 0,97).

La ecuación de la línea recta de regresión es:

$$Y = (1,84 \pm 9,20) + (112,44 \pm 2,77) X$$

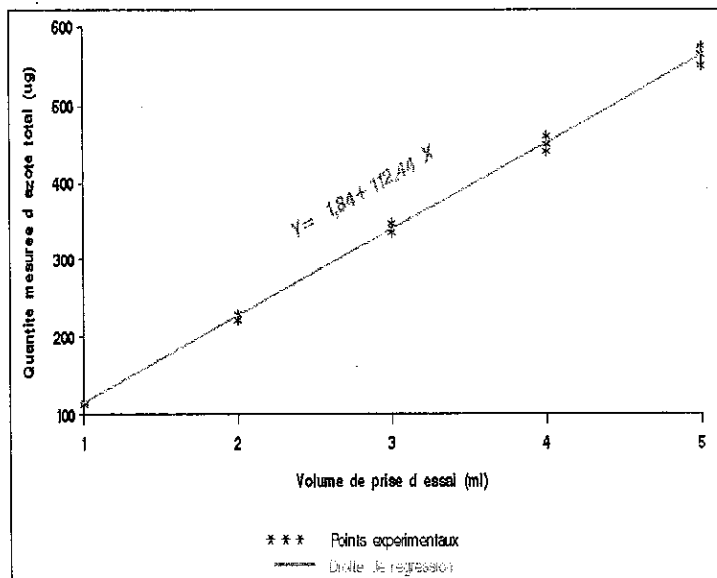
Donde:

- X = volumen (mL)
- Y = cantidad medida de nitrógeno total (μg)
- Coeficiente de correlación lineal $r = 0,9992$ con 13 grados de libertad
- Rango de linealidad: [100,2 - 578,1] μg de nitrógeno total





Figura 2: Nitrógeno total en el PTP: validación, gráfica de linealidad

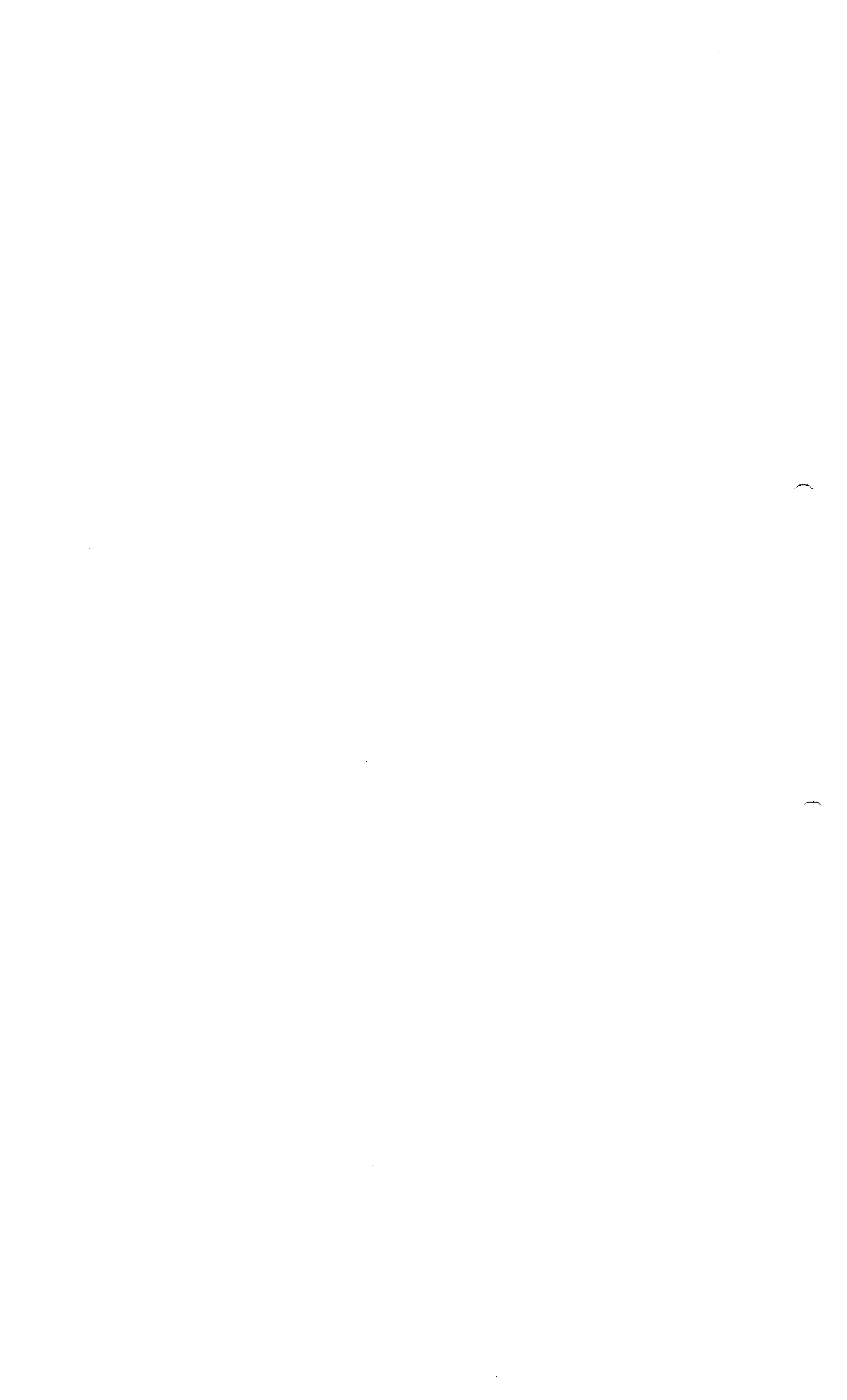


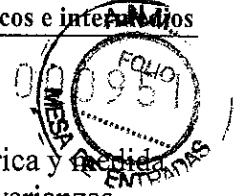
3.2.2 Exactitud

Los datos analizados corresponden al factor de concentración calculado, a partir de los resultados obtenidos en la prueba de linealidad (ver la Tabla 10). Los factores de concentración teórica corresponden a la proporción entre el volumen analizado de la solución de PTP y el volumen de PTP a razón de 2 mL (volumen típico utilizado de manera habitual). Los factores de concentración medidos corresponden a la proporción del contenido de nitrógeno total obtenido con el volumen de la prueba con respecto al contenido de nitrógeno total obtenido con el volumen de PTP a 2 mL. Los resultados del factor de concentración en los cuatro niveles involucrados se presentan en la Tabla 11.

Tabla 11: Nitrógeno total en PTP: validación, exactitud: Factor de concentración calculado

Factor de concentración teórica	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
0,5	0,49	0,51	0,51
1,5	1,50	1,51	1,52
2,0	2,02	1,99	1,98
2,5	2,52	2,49	2,48





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 12: Recuperación porcentual media

Recuperación porcentual	Límites de confianza del 95 %
100,4 %	[99,6 - -101,1]%

El valor 100% está dentro de los límites de confianza.

3.2.3 Precisión

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

Dentro de cada grupo, se llevaron a cabo 6 análisis bajo condiciones que garantizaban la repetibilidad: los análisis se llevaron a cabo de forma independiente utilizando el mismo método, en una muestra primaria homogénea, en el mismo laboratorio, con los mismos equipos y los realizó el mismo operador en una corrida de 3 días.

Los datos analizados son concentraciones del contenido de nitrógeno proteico expresado en µg/mL y se presentan a continuación en la Tabla 13.

Tabla 13: Nitrógeno total en PTP: validación, precisión: contenido de nitrógeno proteico (µg/mL)

Análisis	Grupo 1 (µg/mL)	Grupo 2 (µg/mL)	Grupo 3 (µg/mL)
1	113,7	112,0	115,5
2	115,5	110,6	115,5
3	112,7	105,7	113,4
4	106,4	107,8	111,3
5	116,9	114,1	109,2
6	114,1	114,1	111,3

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

