

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 14.

**Tabla 14: Características de repetibilidad y precisión intermedia**

Características	Desviación estándar	Coefficiente de variación	Intervalo de confianza del 95 %
Características de repetibilidad	3,24	2,88%	/
Características de precisión intermedia	3,24	2,88%	±6,83 µg/mL

**3.2.4 Conclusión**

El método es lineal en el rango: [100 - 578] µg de nitrógeno total. Se demuestra la exactitud en el mismo rango, con una recuperación media del 100%. Se verifica la precisión del método ya que los coeficientes de variación de repetibilidad y de precisión intermedia están alrededor del 2,9%.

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





### 3.3 Índice $DO_{280}/DO_{260}$

El método de medición de la densidad óptica a 280 nm y 260 nm del PTP por espectrometría se describe en el capítulo 2.3. Puesto que la prueba corresponde a una medición física, la característica de validación estudiada es la precisión, en términos de repetibilidad y precisión intermedia. Se presenta un resumen de la validación en la Tabla 15.

**Tabla 15: Índice  $DO_{280}/DO_{260}$  en el PTP: resumen de validación**

Características	Criterios de aceptabilidad	Principio
Precisión	Sin límite asignado	Los parámetros de repetibilidad y precisión intermedia son respectivamente iguales a: - Coeficiente de variación: 0,4 % y 0,5 % - Intervalo de confianza del 95% de la precisión intermedia para 1 prueba con 1 duplicado realizado del modo habitual: $\pm 0,020$

#### 3.3.1 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 un solo día.

Los datos analizados son los índices  $DO_{280}/DO_{260}$  entre las densidades ópticas a 280 nm y a 260 nm, y se presentan en la Tabla 16.

**Tabla 16: Índice  $DO_{280}/DO_{260}$  en el PTP: validación, precisión: Índices  $DO_{280}/DO_{260}$**

Análisis	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
1	1,800	1,795	1,779
2	1,805	1,792	1,781
3	1,791	1,791	1,781
4	1,798	1,792	1,795
5	1,799	1,790	1,768
6	1,792	1,785	1,792

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% varianzas de repetibilidad y entre grupos.

Las características de repetibilidad y precisión intermedia, así como el intervalo de confianza del 95% para 1 corrida (1 duplicado) que se lleva a cabo habitualmente, se presentan en la Tabla 17.


**Tabla 17: Características de repetibilidad y precisión intermedia**

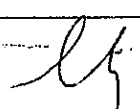
Características	Desviación estándar	Coefficiente de variación	Intervalo de confianza del 95 %
Características de repetibilidad	0,007	0,37%	/
Características de precisión intermedia	0,010	0,53%	±0,020

**3.3.2 Conclusión**

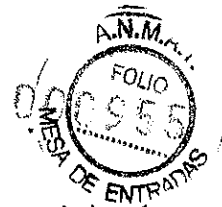
La repetibilidad y la precisión intermedia son aceptables, puesto que los respectivos coeficientes de variación son menores al 1%. La precisión del método se considera satisfactoria.

El método es válido para medir el índice  $DO_{280}/DO_{260}$  en la PTP.

  
ROXANA MONTEMILONE  
DIRECTORA TÉCNICA  
SANOFI PASTEUR S.A.

  
CHRISTIAN DOMINGUEZ  
APODERADO  
SANOFI PASTEUR S.A.





### 3.4 Título de floculación

El método del título de floculación en la PTP se describe en el capítulo 2.4. La característica de validación estudiada es la precisión. Como el título de floculación es un análisis biológico que no utiliza una curva estándar, no se estudiaron la linealidad ni la exactitud. Además, el título de floculación se analiza en la PTP probada contra un estándar SAT conocido (controlado con un Suero Antitetánico Estándar internacional) que determina el título de floculación. Por consiguiente, esta prueba es específica para este intermedio y no se estudió la especificidad durante la validación. En la Tabla 18 que aparece a continuación se presenta un resumen de la validación.

**Tabla 18: Título de floculación en PTP: validación, resumen**

Características	Criterio de aceptación	Resultados
Precisión	Sin límite asignado	Intervalo de confianza del 95% de precisión intermedia para 1 corrida realizada del modo habitual: $\pm 0,046$ que corresponde a $\pm 1,11$ en forma aritmética

#### 3.4.1 Precisión

Se analizaron seis 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 6 operadores en 6 diferentes días.

Dentro de cada grupo, se llevaron a cabo 3 corridas correspondientes a las repeticiones y se usaron para evaluar la repetibilidad.

Los datos analizados son títulos de floculación expresados en Lf/ml, que se presentan en la Tabla 19. Todos los cálculos se realizan con logaritmos, dado que los datos siguen una distribución logarítmica normal.

**Tabla 19: Título de floculación en la PTP: validación, precisión: títulos de floculación (Lf/mL)**

Análisis	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6
1	300	300	270	270	300	300
2	300	300	300	300	300	300
3	270	300	300	300	270	300

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 la precisión intermedia se obtuvieron con el cálculo de varianza (varianza de repetibilidad, 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 20.

**Tabla 20: Características de repetibilidad y precisión intermedia**

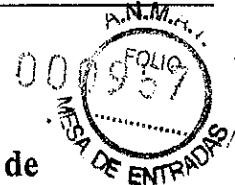
Características	Varianza	Desviación estándar	Intervalo de confianza del 95 %
Características de repetibilidad	0,000465	0,022	/
Características de precisión intermedia	0,000465	0,022	± 0,046 correspondiente a $\bar{x}$ + 1.11 en forma aritmética

### 3.4.2 Conclusión

El método es preciso puesto que el intervalo de confianza de la precisión intermedia es  $\pm 1,11$  para 1 corrida realizada del modo habitual en la etapa de PTP.

El método es válido para medir el título de floculación en la PTP.





### 3.5 Distribución por tamaño molecular mediante HPLC (porcentaje de monómeros)

El método para determinar la distribución del tamaño molecular (porcentaje de monómeros) mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) en PTP se describe en el capítulo 2.6. Puesto que la prueba corresponde a una medición física, la única característica estudiada fue la precisión, en términos de precisión intermedia. En la Tabla 21 se presenta un resumen de la validación.

**Tabla 21: Distribución por tamaño molecular en la PTP: validación, resumen**

Característica	Criterio de aceptación	Resultado
Precisión	El coeficiente de variación de la precisión intermedia debería ser <5%	Coeficiente de variación de la precisión intermedia: 0.7% Intervalos de confianza del 95% de la precisión intermedia para 1 corrida realizada del modo habitual: ±1,1 % de monómeros

#### 3.5.1 Precisión

Se realizaron nueve mediciones 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 diferentes días.

Los datos analizados son porcentajes de monómeros, que se presentan en la Tabla 22.

**Tabla 22: Distribución del tamaño molecular en la PTP: validación, precisión: resultados de los porcentajes de monómeros**

Corrida	Porcentaje de monómeros
1	69,7
2	70,7
3	71,2
4	71,0
5	71,0
6	71,1
7	70,6
8	70,4
9	71,0

Las características de la precisión intermedia se determinaron mediante cálculos de desviación estándar y varianza. Se determinó un intervalo de confianza de 95% usando una prueba de la t a un nivel de significación del 5%.





Las características de precisión intermedia, así como el intervalo de confianza del 95 % correspondientes a 1 corrida se describen en la Tabla 23.

**Tabla 23: Características de precisión intermedia**

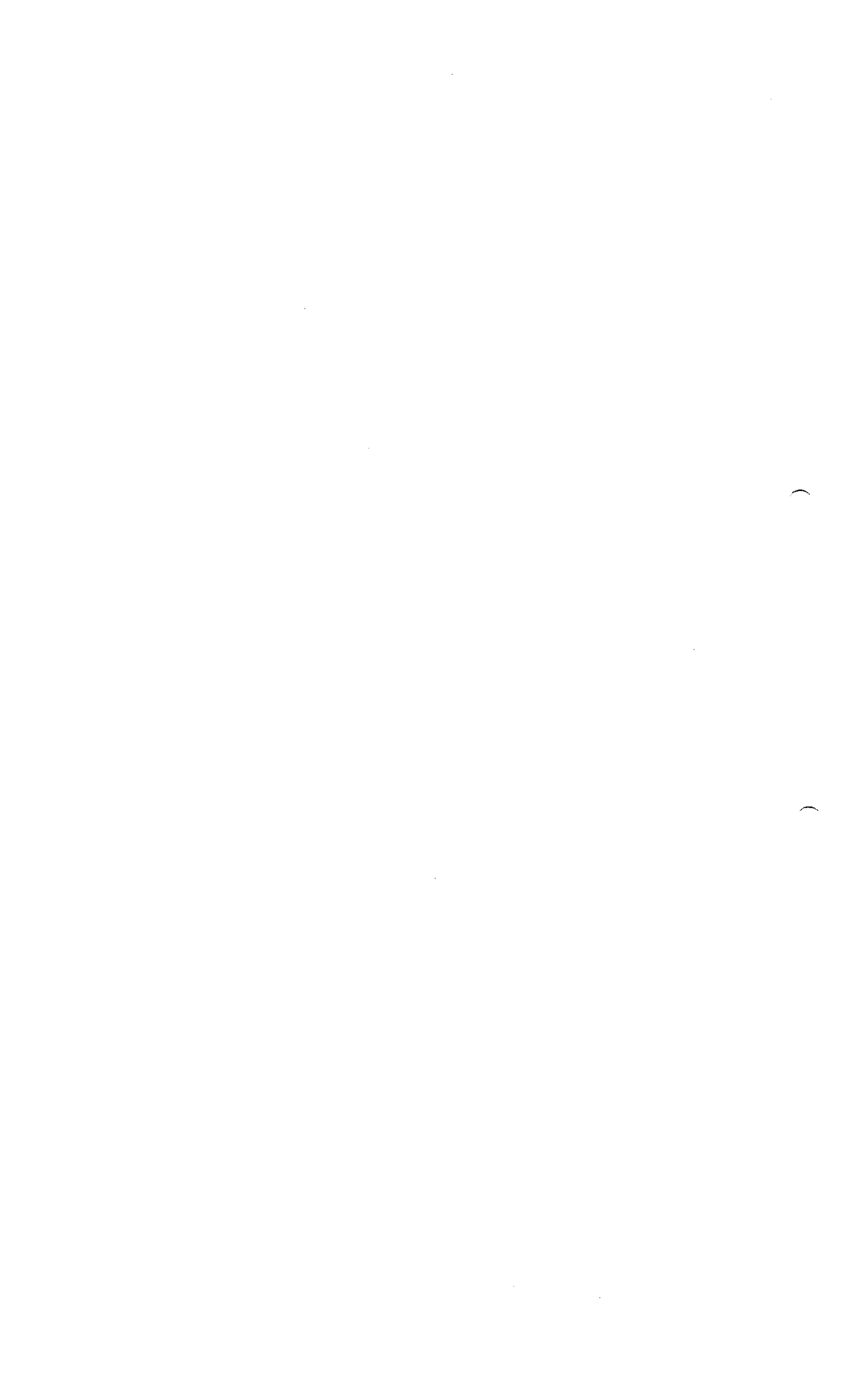
Características	Desviación estándar	Coefficiente de variación	Intervalo de confianza del 95 %
Características de precisión intermedia	0,47	0,66%	±1,08 % de monómeros

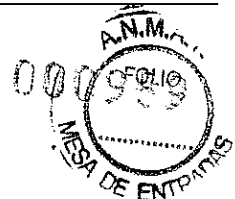
El coeficiente de variación es inferior al 5%.

### 3.5.2 Conclusión

El método es preciso, dado que el coeficiente de variación de la precisión intermedia es igual a 0,66% y el intervalo de confianza de 95 % de la precisión intermedia es ±1,08 por ciento de monómeros para una corrida habitual.

El método es válido para determinar el tamaño molecular (porcentaje de monómeros) de la PTP.



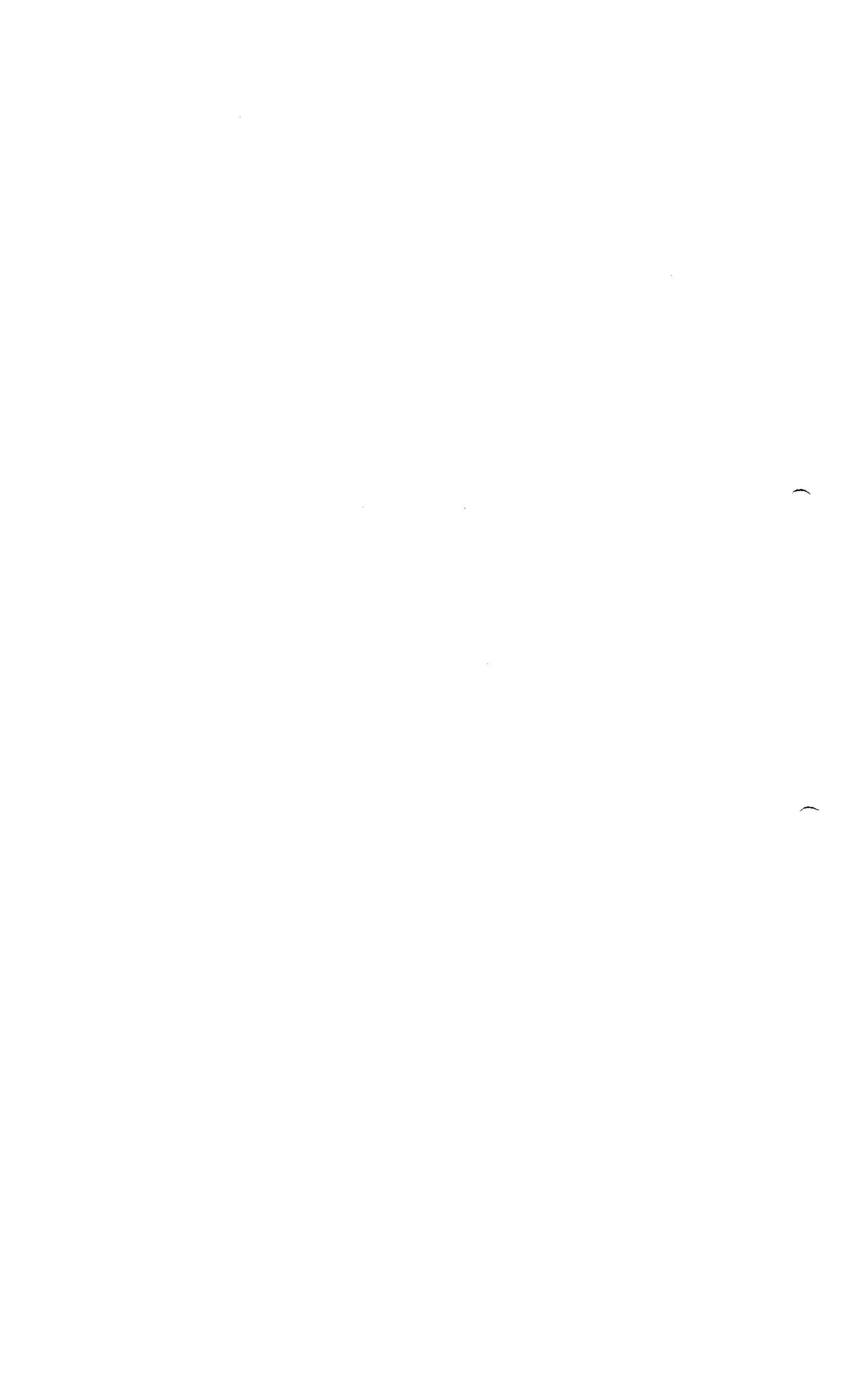


#### 4 Análisis de lotes

Los resultados obtenidos de las pruebas de control de calidad realizados en 3 lotes industriales consecutivos de PTP se presentan en la Tabla 24.

**Tabla 24: Resultados del análisis de lotes de PTP**

Pruebas	Criterios de aceptación	FA350783 21 jul 2009	FA350785 27 jul 2009	FA354112 03 sep 2009
Contenido de nitrógeno proteico	Para calcular la proporción nitrógeno proteico / nitrógeno total y la pureza antigénica	0,125 mg/mL	0,109 mg/mL	0,107 mg/mL
Contenido de nitrógeno total	Para calcular la proporción nitrógeno proteico / nitrógeno total	0,130 mg/mL	0,118 mg/mL	0,120 mg/mL
Índice nitrógeno proteico / nitrógeno total	≥ 0,8	0,96	0,92	0,89
Índice DO <sub>280</sub> /DO <sub>260</sub>	≥ 1,3	2,02	1,85	1,89
Título de floculación	Para calcular la pureza antigénica	300 Lf/mL	270 Lf/mL	270 Lf/mL
Pureza antigénica	>1500 Lf/mg de nitrógeno proteico	2400	2477	2523
Distribución por tamaño molecular (HPLC)	> 50% de monómeros	69,70	70,30	70,10
Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica	Sin crecimiento microbiano	Cumple	Cumple	Cumple





## 5 Justificación de las especificaciones

Se realizan las pruebas de acuerdo con la monografía 1219 de la Ph. Eur.

- Contenido de nitrógeno proteico

El contenido de nitrógeno proteico se determina para calcular la proporción nitrógeno proteico / nitrógeno total y la pureza antigénica.

- Contenido de nitrógeno total

El contenido de nitrógeno total se determina para calcular la proporción nitrógeno proteico / nitrógeno total.

- Proporción nitrógeno proteico / nitrógeno total

La proporción nitrógeno proteico / nitrógeno total se evalúa como un indicador de la uniformidad de la producción y para evaluar el nivel de nitrógeno no proteico residual. La especificación se definió durante el desarrollo del producto.

- Índice  $DO_{280}/DO_{260}$

Este índice se evalúa como un indicador de la uniformidad de la producción, para controlar la eficacia de la eliminación de los ácidos nucleicos comprobando que la contaminación de aminoácidos (en nuestro caso proteínas) ( $DO_{280}$ ) por ácidos nucleicos ( $DO_{260}$ ) sea baja. La especificación se definió durante el desarrollo del producto.

- Título de floculación

Se determina el título de floculación para calcular la pureza antigénica.

- Pureza antigénica

Esta especificación se hace de acuerdo con los requisitos de la monografía 0452 de la Ph. Eur. para garantizar la pureza de la proteína tetánica.

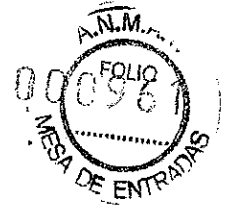
- Distribución del tamaño molecular (porcentaje de monómeros)

La proporción de la forma monomérica se evalúa como un indicador de la uniformidad de la producción. La especificación se definió durante el desarrollo del producto.

- Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica

Esta especificación se hace de acuerdo con los requisitos de la Ph. Eur.





## 6 Sistema de cierre del envase

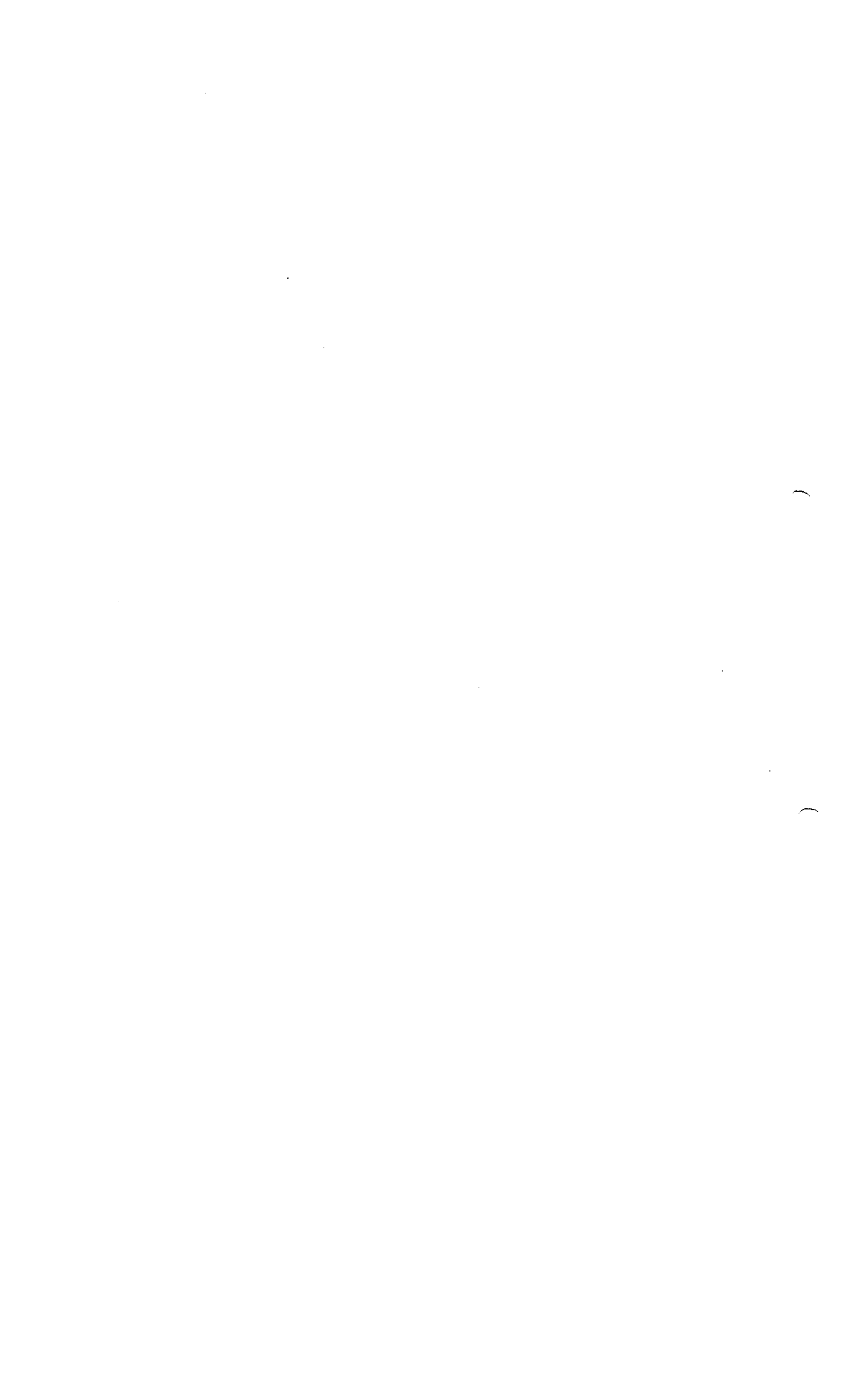
La composición del sistema de cierre del envase para los productos intermedios almacenados se detalla en la Tabla 25.

**Tabla 25: Composición del sistema de cierre del envase para el almacenamiento de los intermedios**

Producto	Sistema de cierre del envase
Proteína tetánica purificada	Recipiente de polipropileno con tapón de polímero.

ROXANA MONTEMILONE  
DIRECTORA TÉCNICA  
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINGUEZ  
APODERADO  
SANOFI PASTEUR S.A.





## 7 Estabilidad

### 7.1 Resumen y conclusiones de estabilidad

#### 7.1.1 Protocolo del estudio

Los estudios de estabilidad del intermedio PTP se resumen en la Tabla 26.

**Tabla 26: Panorama de los estudios de estabilidad de la PTP**

	Toxoide tetánico purificado (PTP)
<b>Objetivo</b>	Confirmar la vida útil de la PTP a $+5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$
<b>Pruebas</b>	Contenido de nitrógeno proteico Contenido de nitrógeno total* Proporción nitrógeno proteico / nitrógeno total* Índice $DO_{280}/DO_{260}$ * Título de floculación Pureza antigénica Distribución del tamaño molecular Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica* Irreversibilidad del toxoide tetánico**
<b>Diseño del estudio</b>	Número de lotes: 3 Estudio a $+5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ Calendario (meses): T0, T3, T6, T9, T12 y T18 *: prueba realizada en T0 y en el momento de medición final **: prueba realizada en T9 meses y en el momento de medición final
<b>Estado</b>	Completado

#### 7.1.2 Diseño del estudio

Se evalúa la estabilidad de tres lotes consecutivos de proteína tetánica purificada analizando el producto almacenado a  $+5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$  durante un período de 18 meses. Las características de los tres lotes se presentan en la Tabla 27.





Tabla 27: Información general del producto sobre la PTP

Nombre del producto	Proteína tetánica purificada		
Número de lote	FA246980 - 23 oct 2006	FA253589 - 06 nov 2006	FA254931 - 20 nov 2006
Tipo de lote	Lotes industriales		
Envase	Viales de polipropileno con tapón de polímero para imitar las condiciones de almacenamiento normales.		

### 7.1.3 Pruebas seleccionadas y criterios de aceptación

Las pruebas seleccionadas y sus respectivos criterios de aceptación corresponden a los aplicados para el control de liberación (ver el capítulo 1).

Se agregó la irreversibilidad del toxoide tetánico como un dato suplementario indicador de estabilidad para mostrar la no reversibilidad de la PTP a lo largo del tiempo. Los criterios de aceptación corresponden a los que se aplican a la prueba de "ausencia de toxina e irreversibilidad de toxoide" para la CTP (ver la sección 3.2.S.2.4, Controles de los pasos críticos e intermedios, CTP), adaptada a la única realización de la prueba de irreversibilidad (sin síntomas de tétanos y por lo menos 80% de supervivencia).

### 7.1.4 Procedimientos analíticos

Los procedimientos analíticos aplicados a los estudios de estabilidad de la PTP correspondientes a las pruebas de liberación se presentan en el capítulo 2. Los procedimientos analíticos aplicados a la irreversibilidad del toxoide corresponden a los aplicados en las pruebas de liberación de la CTP (ver la sección 3.2.S.2.4, Controles de los pasos críticos e intermedios, intermedio CTP).

Los datos de validación de los procedimientos analíticos se presentan en el capítulo 3.

### 7.1.5 Discusión

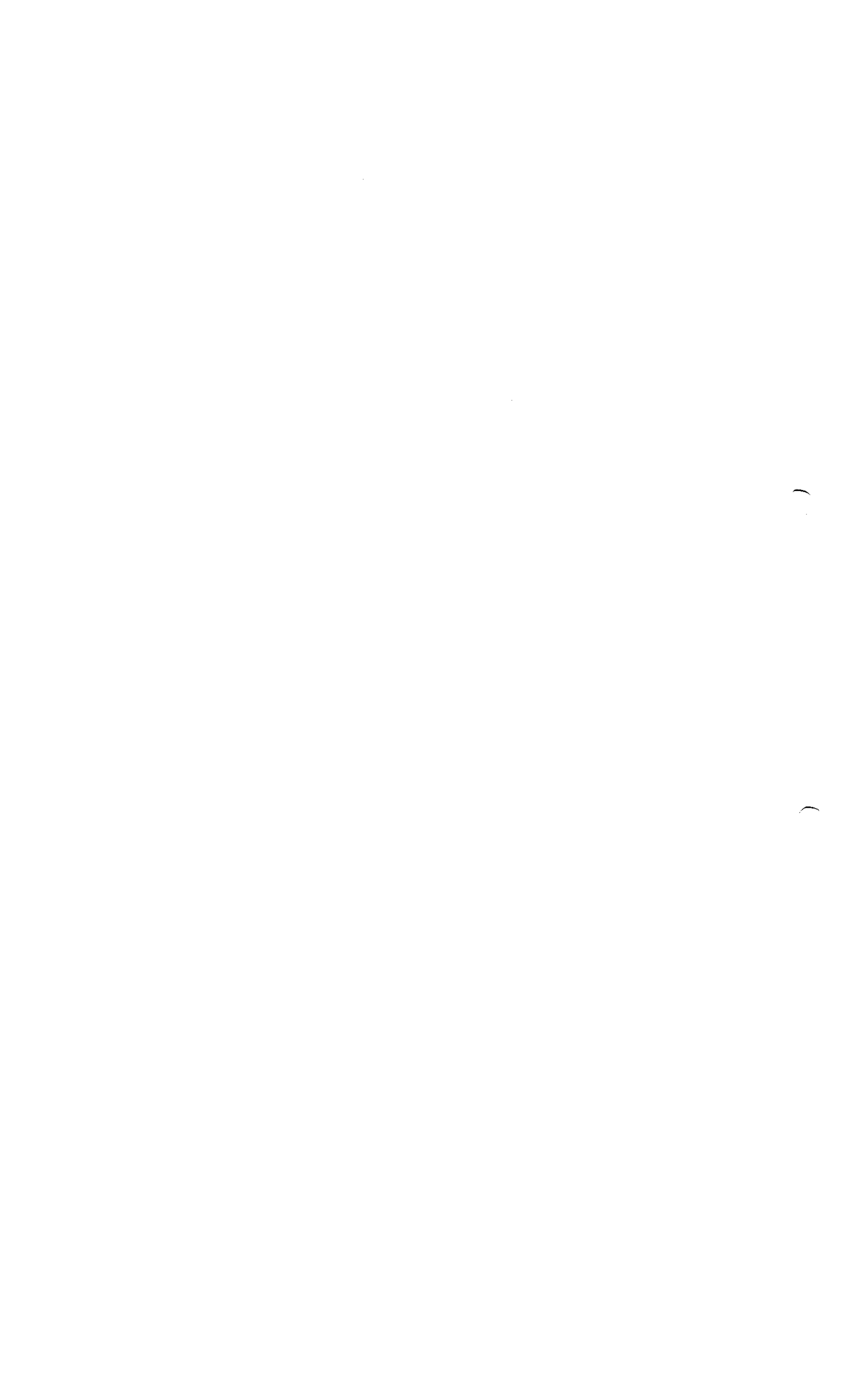
- Resultados fisicoquímicos

Los resultados fisicoquímicos y el título de floculación cumplen con las especificaciones y se mantienen estables durante el periodo de 18 meses del estudio de estabilidad, lo cual refleja la integridad de la proteína. No se observa ninguna tendencia.

Se observa una disminución en la distribución por tamaño molecular (% de monómeros) durante el almacenamiento a  $+5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ . Sin embargo, los resultados se mantienen dentro de los criterios de aceptación después de un almacenamiento de 18 meses; el límite inferior de confianza del valor predicho a los 18 meses corresponde al 60,7% para el lote FA254931 (que a los 18 meses es la más baja) y se mantiene por encima del criterio de aceptación de 50%.

- Resultados de seguridad

La prueba de esterilidad realizada para la prueba de liberación y al final del estudio para cada lote cumple con la especificación.





La irreversibilidad del toxoide tetánico realizada a los 9 o 12 y 18 meses cumple con la especificación, lo cual refleja la ausencia de reversión del toxoide tetánico a toxina.

Sobre la base de estos datos, la PTP empleada para la conjugación de polisacárido puede considerarse estable durante 18 meses a  $+5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 7.1.6 Conclusión

Aunque los resultados de la PTP muestran estabilidad durante un almacenamiento de 18 meses, se eligió una vida útil de 18 meses a  $+5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 7.2 Datos de estabilidad

Los resultados obtenidos para los 3 lotes se presentan en la Tabla 28, la Tabla 29 y la Tabla 30.



sanofi pasteur  
Granel de polisacárido conjugado de *Haemophilus* tipo b

Tabla 28: Resultados de estabilidad para la PTP almacenada a + 5 °C ± 3 °C: Lote FA246980

Pruebas	Criterios de aceptación	T0	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses	18 meses
Contenido de nitrógeno proteico	Para cálculo (mg/mL)	0,090	0,095	0,094	0,098	0,096	0,094
Contenido de nitrógeno total	Para cálculo (mg/mL)	0,108	NR*	NR	NR	NR	0,102
Proporción nitrógeno proteico/nitrógeno total	≥ 0,8	0,83	NR	NR	NR	NR	0,92
Índice DO <sub>280</sub> /DO <sub>260</sub>	≥ 1,3	1,94	NR	NR	NR	NR	1,95
Título de flocculación	Para cálculo (Lf/mL)	270	250	250	270	250	270
Pureza antigénica	> 1500 Lf/mg de nitrógeno proteico	3000	2632	2660	2784	2604	2872
Distribución del tamaño molecular	> 50% de monómero	71,2	69,6	69,4†	68,2‡	67,6	66,4
Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica	Sin crecimiento microbiano	Cumple	NR	NR	NR	NR	Cumple
Irreversibilidad del toxoide tetánico	Ausencia de síntomas tetánicos y un mínimo del 80 % de supervivencia.	NR	NR	NR	Cumple§	NR	Cumple
Medición de pH	Para información	8,20	8,21	8,25	8,13**	8,16	8,17

\* NR: No realizada

† Realizada a los 7 meses

‡ Realizada a los 10 meses

§ Realizada a los 12 meses

\*\* Realizada a los 11 meses

ROXANA MONTEMILONE  
DIRECTORA GENERAL  
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINGUEZ  
APODERADO  
SANOFI PASTEUR S.A.

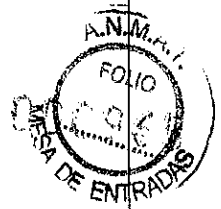




Tabla 29: Resultados de estabilidad para la PTP almacenada a + 5 °C ± 3 °C: Lote FA253589

Pruebas	Criterios de aceptación	T0	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses	18 meses
Contenido de nitrógeno proteico	Para cálculo (mg/mL)	0,106	0,097	0,120*	0,109	0,104	0,109
Contenido de nitrógeno total	Para cálculo (mg/mL)	0,118	NR†	NR	NR	NR	0,119
Proporción nitrógeno proteico / nitrógeno total	≥ 0,8	0,90	NR	NR	NR	NR	0,92
Índice DO <sub>200</sub> /DO <sub>260</sub>	≥ 1,3	1,88	NR	NR	NR	NR	1,90
Título de floculación	Para cálculo (Lf/mL)	270	250	270	270	300	270
Pureza antigénica	> 1500 Lf/mg de nitrógeno proteico	2547	2577	2250	2477	2885	2477
Distribución del tamaño molecular	> 50% de monómero	68,5	67,3	67,4	65,9	66,1	64,8
Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica	Sin crecimiento microbiano	Cumple	NR	NR	NR	NR	Cumple
Irreversibilidad del toxoide tetánico	Ausencia de síntomas tetánicos y un mínimo del 80 % de supervivencia.	NR	NR	NR	Cumple	NR	Cumple
Medición de pH	Para información	8,19	7,99	8,12	8,08	8,04	7,96

\* Realizada a los 7 meses

† NR: No realizada

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





sanofi pasteur  
Granel de polisacárido conjugado de *Haemophilus* tipo b

Tabla 30: Resultados de estabilidad para la PTP almacenada a + 5 °C ± 3 °C: Lote FA254931

Pruebas	Criterios de aceptación	T0	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses	18 meses
Contenido de nitrógeno proteico	Para cálculo (mg/mL)	0,122	0,120	0,101	0,126	0,123	0,125
Contenido de nitrógeno total	Para cálculo (mg/mL)	0,130	NR*	NR	NR	NR	0,136
Proporción nitrógeno proteico / nitrógeno total	≥ 0,8	0,94	NR	NR	NR	NR	0,92
Índice DO <sub>280</sub> /DO <sub>260</sub>	≥ 1,3	1,92	NR	NR	NR	NR	1,88
Título de floculación	Para cálculo (Lf/mL)	300	300	300	300	300	300
Pureza antigénica	> 1500 Lf/mg de nitrógeno proteico	2459	2500	2970	2381	2439	2400
Distribución por tamaño molecular	> 50% de monómero	65,5	65,4	64,1	63,6	63,0	61,1
Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica	Sin crecimiento microbiano	Cumple	NR	NR	NR	NR	Cumple
Irreversibilidad del toxoide tetánico	Ausencia de síntomas tetánicos y un mínimo del 80 % de supervivencia.	NR	NR	NR	Cumple	NR	Cumple
Medición de pH	Para información	8,01	8,11	8,03	8,06	8,00	8,07

NR: No realizada

ROXANA MONTEMLONE  
DIRECTORA GENERAL  
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINGUEZ  
APODERADO  
SANOFI PASTEUR S.A.

RA\_0302400

Información confidencial/proprietaria  
Página 36 de 36

