

Hasta ahora se han llevado a cabo dos tipos de pruebas de potencia para esta vacuna:

- Pruebas *in vitro*: determinación del contenido de antígeno D mediante ELISA;
- Pruebas *in vivo*: determinación de la potencia del antígeno mediante pruebas de inmunogenicidad en pollos para la formulación inicial y en ratas para la formulación mejorada.

La estrategia de omisión para las vacunas antipoliomielíticas se describe en la Ph. Eur. (6ª edición, 2.7.20) y recomienda evaluar:

- Un producto a granel/lote final representativo del método de producción actual;
- 2 lotes de potencia atenuada preparados, por ejemplo, calentando la vacuna o mezclándola con una vacuna sometida a tratamiento térmico; los títulos previstos de los lotes de potencia atenuada deben ser aproximadamente la mitad de los del producto a granel /lote final representativo.

Los criterios de aceptación se detallan en la monografía 2.7.20 de la Ph. Eur. como sigue: "La omisión de la valoración *in vivo* es aceptable si el producto a granel/lote final representativo satisface las valoraciones *in vivo* e *in vitro* y los lotes de potencia atenuada no la satisfacen. Si un lote de potencia atenuada no satisface la valoración del antígeno D pero satisface la valoración *in vivo*, esta última puede repetirse".

Por consiguiente, la estrategia propuesta tiene como objetivo demostrar que la validación *in vitro* es fiable, sensible y al menos tan discriminatoria como la validación *in vivo* para detectar lotes de potencia atenuada, como se indica en Ph. Eur. 2.7.15: "Realizar una determinación inmunoquímica del contenido de antígeno, validándose los criterios de aceptación frente al ensayo *in vivo*".

2.1.12.2.2 Principio

Se utilizaron tres lotes de vacuna Hexaxim para preparar las formulaciones experimentales.

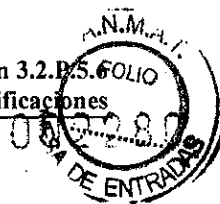
Estas formulaciones experimentales contienen vacunas intactas o las mismas vacunas sometidas previamente a tratamiento térmico para degradar o modificar la estructura del antígeno D, como se define a continuación:

- Vacuna intacta: vacuna no sometida a ningún tratamiento y representativa del producto comercializado;
- Vacuna modificada un 50%: formulación experimental elaborada con una mezcla (1:1) (v/v) de vacuna intacta y vacuna degradada mediante calor (60 minutos a +56°C).

Estas dos formulaciones experimentales se sometieron a pruebas de potencia *in vivo* e *in vitro*:

- **Contenido de antígeno D:** determinación del título de antígeno D para cada serotipo mediante ELISA;
- **Antigenicidad de la poliomiélitis en ratas:** detección de anticuerpos neutralizantes en los sueros de ratas vacunadas con distintas dosis de vacuna y, a continuación, cálculo de la potencia relativa de la vacuna con respecto a la referencia interna.





Cada muestra se analizó en 3 pruebas *in vitro* e *in vivo* independientes.

Para cada prueba y cada lote de vacuna, los resultados obtenidos en la vacuna modificada [VM] se compararon con los obtenidos en la vacuna intacta [VI] para los 3 tipos de poliovirus (comparación de las medias) tras comprobar la homogeneidad de las varianzas.

Los resultados de la potencia se analizaron basándose en la metodología estadística descrita a continuación y calculando la proporción entre la formulación de la [VI] y la [VM]. La proporción teórica es 2.

2.1.12.2.3 Producto y condiciones operativas

2.1.12.2.3.1 Productos Hexaxim

Para el estudio se utilizaron muestras de los lotes clínicos de Hexaxim en fase III siguientes (formulación mejorada) de la vacuna Hexaxim en la etapa de granel final: FDV01398, FDV01416 y FDV01420.

Vacuna intacta (VI)

La vacuna intacta es la vacuna Hexaxim sin ningún tipo de degradación y con un contenido de antígeno D conforme a los criterios de aceptación indicados anteriormente (apartado 2.1.12.1).

Vacuna degradada (VD)

La vacuna degradada se obtiene del modo siguiente: cada producto final a granel se calentó durante 60 minutos al baño maría a +56°C para desnaturalizar completamente la estructura del antígeno D (transformación del antígeno D en antígeno C). A continuación, la VD se almacenó a una temperatura de +5°C ± 3°C.

Vacuna modificada (VM)

La vacuna modificada es una mezcla 1:1 (v/v) de la vacuna intacta y la vacuna degradada (antígeno D transformado en antígeno C) para obtener una vacuna que contiene 50% de antígeno D y 50% de antígeno C. La VM resultante se almacenó a una temperatura de +5°C ± 3°C.

2.1.12.2.3.2 Procedimiento de prueba

Para cada método (*in vivo* e *in vitro*) y para cada lote, se analizaron ambas formulaciones (VI y VM) el mismo día y en la misma serie. Las pruebas se realizaron 3 veces en 3 series independientes (es decir, en condiciones de precisión intermedia: días diferentes y/o operadores diferentes).

2.1.12.2.4 Resultados

Puesto que los datos siguen una distribución logarítmica normal, todos los cálculos se realizan en logaritmos.

El método utilizado para analizar los resultados consiste en:

- Calcular la media y los intervalos de confianza del 95% del contenido de antígeno D para cada condición operativa y cada lote;





- Calcular la proporción entre la vacuna intacta (VI) y la vacuna degradada un 50% (VM):
Proporción [VI] / [VM] = valor de potencia para [VI] / valor de potencia para [VM]

La proporción teórica es igual a 2.

El procesamiento estadístico se realizó con SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA - V8).

2.1.12.2.4.1 Prueba de potencia *in vitro*: determinación del contenido de antígeno D mediante ELISA

El resultado de la prueba de potencia *in vitro* es el contenido de antígeno D expresado en UD/mL. Los resultados se presentan en la Tabla 5.


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

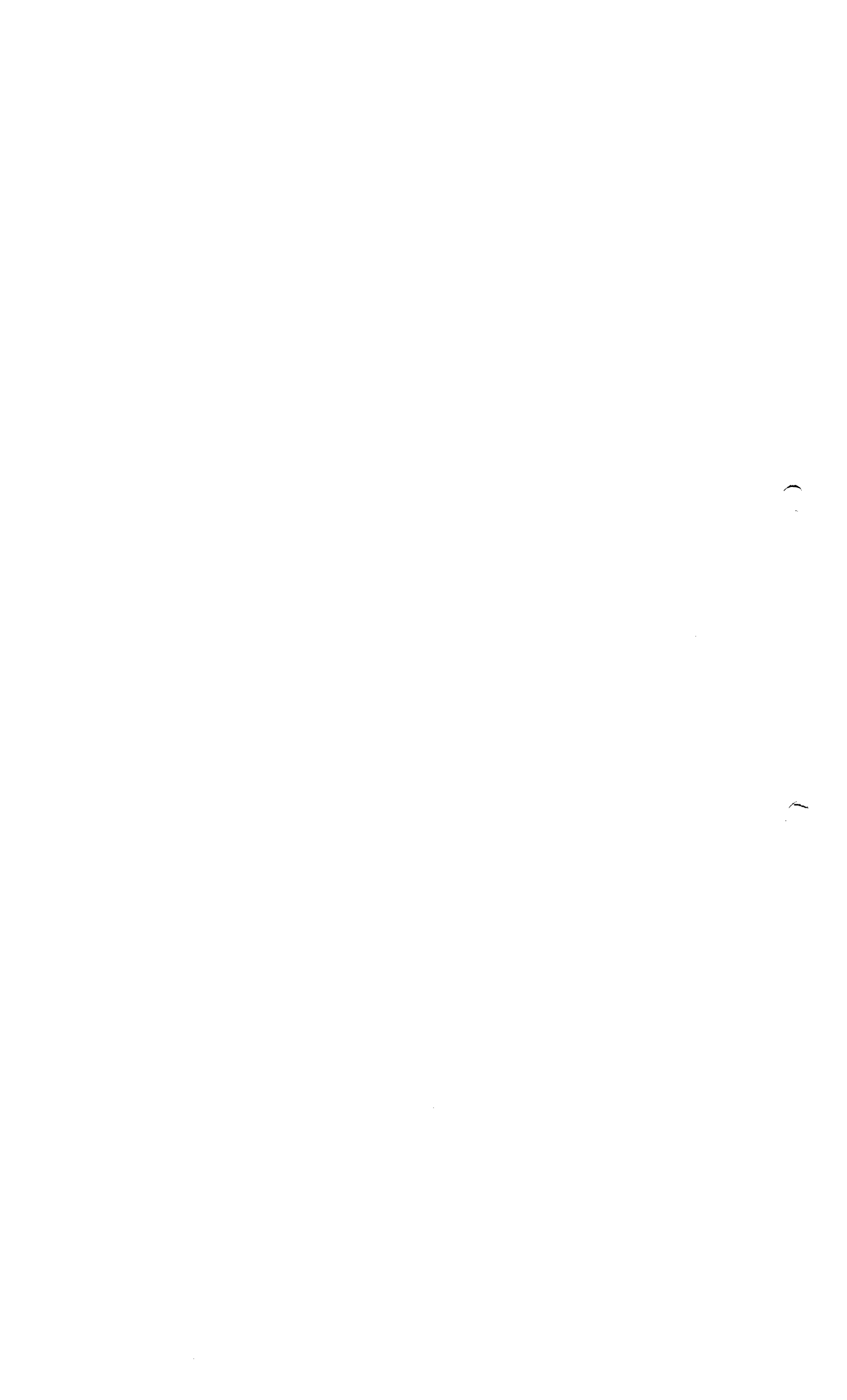

CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
GERENTE
SANOFI PASTEUR S.A.





Tabla 5: Resultados del contenido de antígeno D

| Lote FDV01398 | | | |
|---------------|--------|-----------------------|---------------------------------|
| Serotipos | Series | Vacuna intacta (= VI) | Vacuna modificada un 50% (= VM) |
| Tipo 1 | 1 | 50,6 | 25,1 |
| | 2 | 54,1 | 27,3 |
| | 3 | 52,7 | 25,1 |
| Tipo 2 | 1 | 12,5 | 6,1 |
| | 2 | 13,1 | 6,7 |
| | 3 | 12,4 | 6,0 |
| Tipo 3 | 1 | 46,8 | 22,9 |
| | 2 | 50,0 | 23,8 |
| | 3 | 47,2 | 22,3 |
| Lote FDV01416 | | | |
| Serotipos | Series | Vacuna intacta (= VI) | Vacuna modificada un 50% (= VM) |
| Tipo 1 | 1 | 53,3 | 27,1 |
| | 2 | 56,6 | 28,9 |
| | 3 | 48,2 | 24,0 |
| Tipo 2 | 1 | 13,1 | 6,5 |
| | 2 | 13,8 | 6,8 |
| | 3 | 14,3 | 7,0 |
| Tipo 3 | 1 | 49,6 | 23,6 |
| | 2 | 53,9 | 25,4 |
| | 3 | 50,1 | 23,9 |
| Lote FDV01420 | | | |
| Serotipos | Series | Vacuna intacta (= VI) | Vacuna modificada un 50% (= VM) |
| Tipo 1 | 1 | 47,2 | 24,4 |
| | 2 | 54,1 | 26,3 |
| | 3 | 50,5 | 25,3 |
| Tipo 2 | 1 | 13,1 | 7,0 |
| | 2 | 13,8 | 7,2 |
| | 3 | 13,1 | 6,9 |
| Tipo 3 | 1 | 46,0 | 22,4 |
| | 2 | 48,0 | 22,9 |
| | 3 | 45,3 | 22,1 |





2.1.12.2.4.2 Prueba de potencia *in vivo*: determinación de la inmunogenicidad contra la poliomielitis en ratas

Los datos sin procesar de la prueba de potencia *in vivo* se expresan como actividad relativa sin unidad. Los resultados se presentan en la Tabla 6.


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
GERENTE
SANOFI PASTEUR S.A.

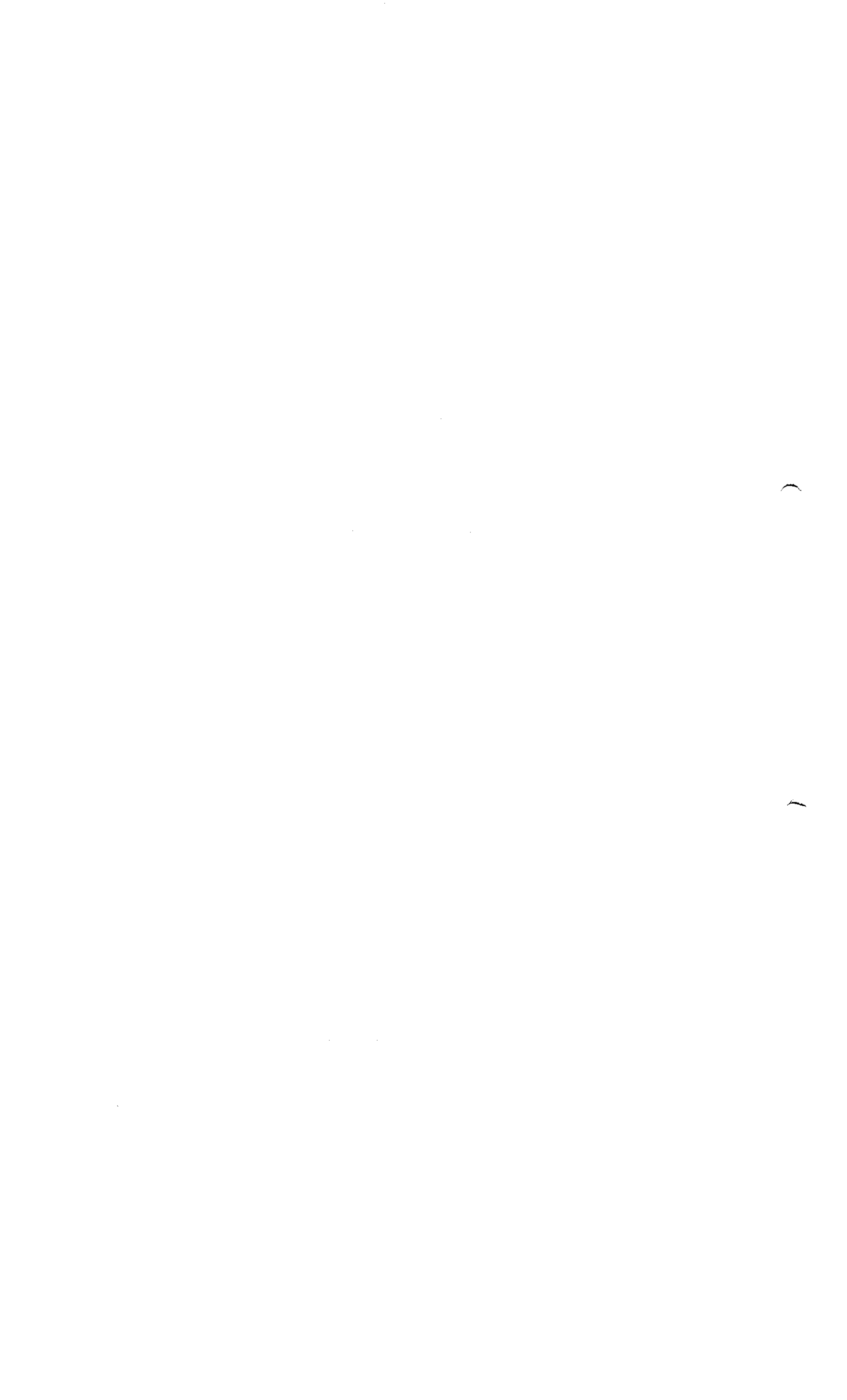




Tabla 6: Resultados de la actividad relativa obtenidos en la prueba *in vivo* de la poliomielitis

| Lote FDV01398 | | | |
|---------------|--------|----------------------------------|---------------------------------|
| Serotipos | Series | Vacuna intacta (= VI) | Vacuna modificada un 50% (= VM) |
| Tipo 1 | 1 | 1,8 | 1,7 |
| | 2 | 1,1 | 1,1 |
| | 3 | 1,3 | 1,2 |
| Tipo 2 | 1 | 2,1 | 3,2 |
| | 2 | 1,2 | 1,6 |
| | 3 | 0,8 | 0,7 |
| Tipo 3 | 1 | 1,7 | No válido (no linealidad) |
| | 2 | 0,7 | 0,5 |
| | 3 | No válido (no linealidad) | No válido (no linealidad) |
| Lote FDV01416 | | | |
| Serotipos | Series | Vacuna intacta (= VI) | Vacuna modificada un 50% (= VM) |
| Tipo 1 | 1 | 0,8 | 0,8 |
| | 2 | 1,6 | 0,9 |
| | 3 | 0,7 | 0,5 |
| Tipo 2 | 1 | 1,1 | 1,1 |
| | 2 | No válido (fuera del IC del 95%) | No válido (no paralelismo) |
| | 3 | 1,1 | 0,5 |
| Tipo 3 | 1 | 0,6 | 0,8 |
| | 2 | No válido (no linealidad) | No válido (no linealidad) |
| | 3 | 0,6 | 0,6 |
| Lote FDV01420 | | | |
| Serotipos | Series | Vacuna intacta (= VI) | Vacuna modificada un 50% (= VM) |
| Tipo 1 | 1 | 0,8 | 1 |
| | 2 | 0,6 | 0,6 |
| | 3 | 1,8 | 1,0 |
| Tipo 2 | 1 | 0,4 | 0,5 |
| | 2 | 1,4 | 1,6 |
| | 3 | No válido (no paralelismo) | 1,0 |
| Tipo 3 | 1 | 0,5 | 0,5 |
| | 2 | 0,5 | 0,3 |
| | 3 | 0,7 | 0,6 |

