

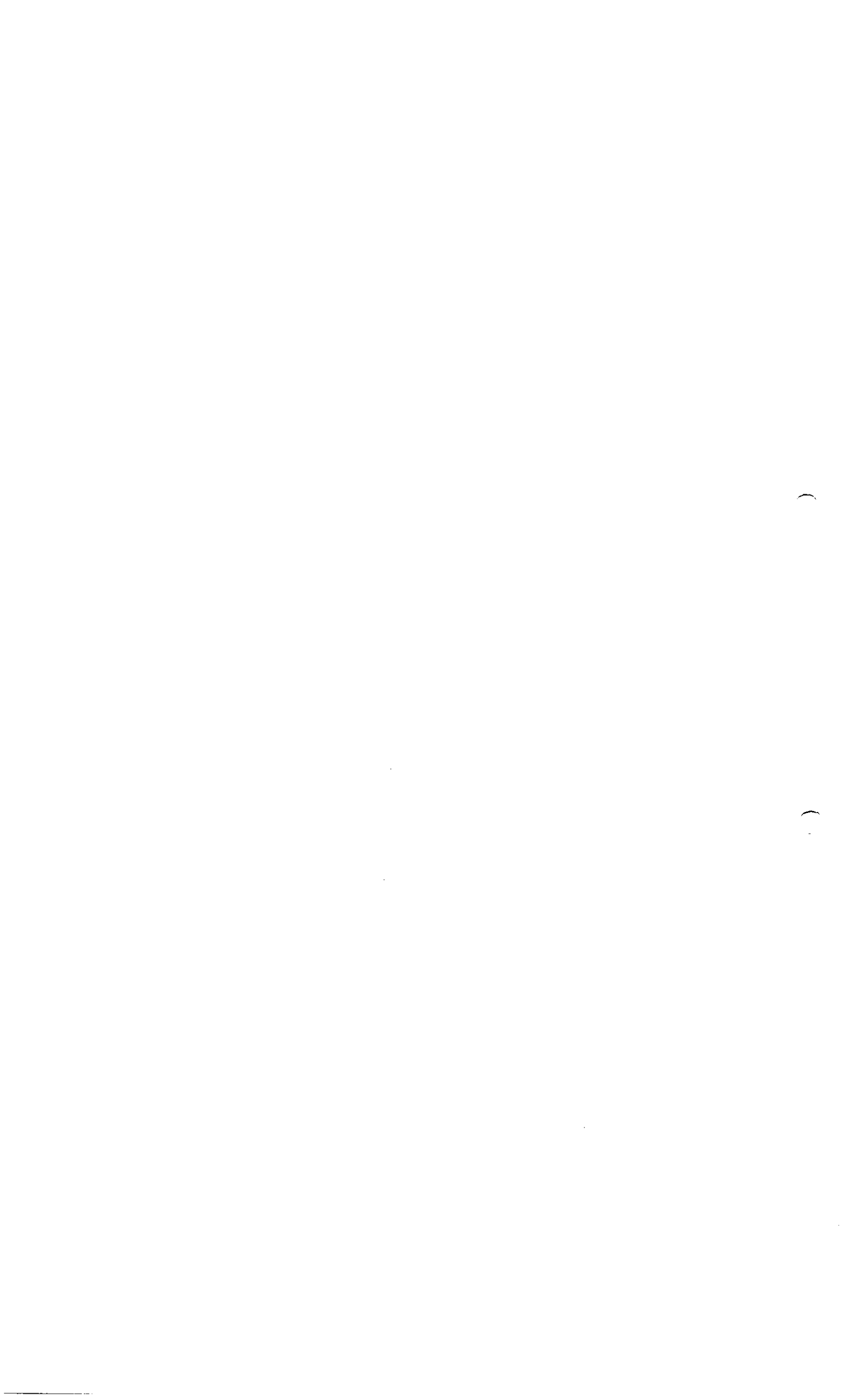


3.2.P.8.1

Resumen y Conclusiones de Estabilidad


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANGRE PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANGRE PASTEUR S.A.





Sección 3.2.P.8.1 - Resumen y conclusiones de estabilidad

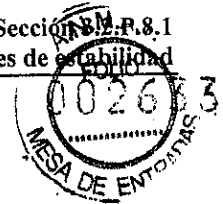
Índice

Lista de tablas	3
Lista de figuras	4
1 Introducción.....	5
2 Producto final a granel	7
2.1 Protocolo del estudio de estabilidad del producto final a granel (estudio 1).....	7
2.1.1 Lotes analizados	7
2.1.2 Pruebas y criterios de aceptación.....	7
2.2 Resultados de los estudios de estabilidad del producto final a granel	10
2.2.1 Estudio de estabilidad 1: producto final a granel de Marcy l'Etoile (+5°C ± 3°C durante 9 meses).....	10
3 Producto llenado.....	12
3.1 Producto llenado almacenado en jeringas monodosis (estudios 2 y 3).....	12
3.1.1 Protocolos de los estudios de estabilidad del producto llenado almacenado en jeringas monodosis	12
3.1.1.1 Lotes analizados	12
3.1.1.2 Pruebas y criterios de aceptación	13
3.1.2 Resultados de los estudios de estabilidad del producto llenado almacenado en jeringas monodosis	20
3.1.2.1 Estudio 2: producto llenado de Marcy l'Etoile realizado con formulación inicial.....	20
3.1.2.2 Estudio 3: producto llenado de Marcy l'Etoile realizado con formulación mejorada	21
3.1.2.3 Conclusión general para los estudios de estabilidad del producto llenado almacenado en jeringas monodosis.....	24
3.2 Producto llenado almacenado en viales monodosis.....	24
3.2.1 Protocolo de los estudios de estabilidad del producto llenado almacenado en viales monodosis	24
3.2.1.1 Lotes analizados	24
3.2.1.2 Pruebas y criterios de aceptación	25





3.2.2	Resultados de los estudios de estabilidad del producto llenado almacenado en viales monodosis	32
3.2.2.1	Estudio 4: producto llenado de Agnani realizado con formulación inicial	32
3.2.2.2	Estudio 5: producto llenado de Val de Reuil realizado con formulación mejorada.....	33
3.2.2.3	Conclusión general para los estudios de estabilidad del producto llenado almacenado en viales monodosis	36
4	Justificación de los criterios de aceptación de la vida útil.....	37
4.1	PRP despolimerizado	37
4.1.1	Metodología.....	37
4.1.2	Análisis estadístico	38
4.1.2.1	Modelo no lineal	39
4.1.2.2	Límites unilaterales superiores de 99%.....	39
4.1.3	Resultados.....	39
4.2	Porcentaje de adsorción de hepatitis B (ELISA)	40
4.2.1	Metodología.....	40
4.2.2	Análisis estadístico	41
4.2.2.1	Modelo no lineal	42
4.2.2.2	Límites unilaterales inferiores de 99%.....	42
4.2.3	Resultados.....	42
5	Conclusión general.....	44



Lista de tablas

Tabla 1: panorama de los estudios de estabilidad	6
Tabla 2: lotes analizados en el estudio de estabilidad del producto final a granel de Marcy l'Etoile (estudio 1).....	7
Tabla 3: pruebas de estabilidad y criterios de aceptación para el producto final a granel de Marcy l'Etoile (estudio 1)	8
Tabla 4: lotes analizados para el estudio de estabilidad realizado sobre el producto llenado de Marcy l'Etoile con formulación inicial (estudio de estabilidad 2).....	12
Tabla 5: lotes analizados para el estudio de estabilidad realizado sobre el producto llenado de Marcy l'Etoile con formulación mejorada (estudio de estabilidad 3).....	13
Tabla 6: pruebas de estabilidad y criterios de aceptación para el producto llenado de Marcy l'Etoile realizado con formulación inicial y mejorada (estudios de estabilidad 2 y 3).....	15
Tabla 7: lotes analizados para el estudio de estabilidad realizado sobre el producto llenado de Agnani con formulación inicial (estudio 4).....	24
Tabla 8: lotes analizados para el estudio de estabilidad realizado sobre el producto llenado de Val de Reuil con formulación optimizada (estudio 5).....	25
Tabla 9: prueba de estabilidad y criterios de aceptación para el producto llenado de Anagni y Val de Reuil, realizado respectivamente con formulación inicial y mejorada (estudios de estabilidad 4 y 5).....	27
Tabla 10: lotes utilizados para establecer los criterios de aceptación para el PRP despolimerizado	38
Tabla 11: valores de predicción y límite unilateral superior de 99% para el PRP despolimerizado al vencimiento de la vida útil.....	39
Tabla 12: lotes utilizados para determinar los criterios de aceptación para el porcentaje de adsorción de hepatitis B (ELISA).....	41
Tabla 13: valores de predicción y límite unilateral inferior de 99% para la adsorción de hepatitis B al vencimiento de la vida útil.....	42
Tabla 14: resumen de los datos de estabilidad de respaldo	44

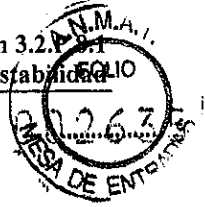




Lista de figuras

Figura 1: datos del PRP despolimerizado junto con la línea cinética y los límites unilaterales superiores de 99%.....40

Figura 2: datos del porcentaje de adsorción de hepatitis B en la formulación inicial junto con la línea cinética y el límite unilateral inferior de 99%43



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

1 Introducción

Esta sección presenta los estudios de estabilidad realizados en el producto final a granel (PFAG) elaborado en Marcy l'Etoile (MLE) y en el producto medicinal llenado en jeringas monodosis sin aguja en MLE y en viales monodosis en Val de Reuil (VDR) y Anagni.

Se han realizado cinco estudios de estabilidad para documentar y respaldar la vida útil del producto medicinal:

- Estudio 1: estudio realizado sobre la formulación mejorada de PFAG elaborado en MLE, almacenado a $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ en condiciones a largo plazo (9 meses);
- Estudio 2: estudio realizado sobre la formulación inicial de producto final llenado en jeringas monodosis en MLE, almacenado a $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ en condiciones a largo plazo (36 meses);
- Estudio 3: estudio realizado sobre la formulación mejorada de producto final llenado en jeringas monodosis en MLE, almacenado a $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ en condiciones a largo plazo (36 meses) y a $+25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ en condiciones aceleradas (6 meses);
- Estudio 4: estudio realizado sobre la formulación inicial de producto final llenado en viales monodosis en Anagni, almacenado a $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ en condiciones a largo plazo (36 meses);
- Estudio 5: estudio realizado sobre la formulación mejorada de producto final llenado en viales monodosis en VDR, almacenado a $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ en condiciones a largo plazo (36 meses) y a $+25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ en condiciones aceleradas (6 meses).

Los estudios de estabilidad 1, 2 y 4 han sido finalizados, mientras que los estudios de estabilidad 3 y 5 están aún en curso.

En la Tabla 1 se resumen los detalles de estos estudios de estabilidad:

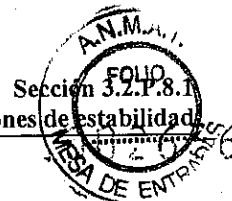


Tabla 1: panorama de los estudios de estabilidad

Estudio	Número de lote	Fecha de elaboración	Diseño del estudio de estabilidad		Estado	Objetivo
Estudio 1	FDV01398	4 de noviembre de 2009	+5 °C ± 3 °C Condiciones de almacenamiento a largo plazo (T0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 9 meses)		Terminado	Estudio de estabilidad para respaldar la vida útil del PFAG (9 meses a +5°C ± 3°C)
	FDV01416	18 de noviembre de 2009				
	FDV01420	2 de diciembre de 2009				
Estudio 2	S4009	7 de diciembre de 2005	+5 °C ± 3 °C Condiciones de almacenamiento a largo plazo (T0, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30 y 36 meses)		Terminado	Estudio de estabilidad para respaldar la vida útil del producto medicinal llenado en jeringas monodosis (36 meses a +5°C ± 3°C)
	S4106	24 de enero de 2006				
	S4107	30 de enero de 2006				
Estudio 3	FDNC0491	21 de abril de 2010	+5 °C ± 3 °C	+25°C ± 2°C	En curso	Estudio de estabilidad para respaldar la vida útil del producto medicinal llenado en jeringas monodosis (36 meses a +5°C ± 3°C)
	FDNC0504	22 de abril de 2010	Condiciones de almacenamiento a largo plazo (T0, 1, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30 y 36 meses)	Condiciones de almacenamiento aceleradas (T0, 1, 3 y 6 meses)		
	FDNC0505	22 de abril de 2010				
Estudio 4	S4114	20 de marzo de 2006	+5 °C ± 3 °C Condiciones de almacenamiento a largo plazo (T0, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30 y 36 meses)		Terminado	Estudio de estabilidad para respaldar la vida útil del producto medicinal llenado en viales monodosis (36 meses a +5°C ± 3°C)
	S4115	21 de marzo de 2006				
	S4116	22 de marzo de 2006				
Estudio 5	S4312	08 de febrero de 2010	+5 °C ± 3 °C	+25°C ± 2°C	En curso	Estudio de estabilidad para respaldar la vida útil del producto medicinal llenado en viales monodosis (36 meses a +5°C ± 3°C)
	S4313	09 de febrero de 2010	Condiciones de almacenamiento a largo plazo (T0, 1, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30 y 36 meses)	Condiciones de almacenamiento aceleradas (T0, 1, 3 y 6 meses)		
	S4314	10 de febrero de 2010				

Los resultados de estos estudios de estabilidad se presentan en la sección 3.2.P.8.3 Datos de estabilidad.



2 Producto final a granel

2.1 Protocolo del estudio de estabilidad del producto final a granel (estudio 1)

2.1.1 Lotes analizados

La información sobre los lotes de PFAG sometidos al estudio de estabilidad se resume en la Tabla 2.

Tabla 2: lotes analizados en el estudio de estabilidad del producto final a granel de Marcy l'Etoile (estudio 1)

Número de lote	Lugar de elaboración	Inicio del estudio	Escala de lote	Cierre del envase
FDV01398	Marcy l'Etoile	06 de noviembre de 2009	250 L	Tanque de acero inoxidable.*
FDV01416	Marcy l'Etoile	20 de noviembre de 2009	250 L	Tanque de acero inoxidable.
FDV01420	Marcy l'Etoile	04 de diciembre de 2009	250 L	Tanque de acero inoxidable.

* Tanques a escala reducida de la misma calidad y geometría que los utilizados en el PFAG a escala industrial.

2.1.2 Pruebas y criterios de aceptación

En este estudio, los parámetros de prueba monitoreados se corresponden con los utilizados para la liberación del producto final a granel, además de las pruebas de aspecto, pH y aluminio del perfil de aprobación del producto llenado. Los límites utilizados fueron los definidos en el momento en que se realizó el estudio. También se incluyeron en el estudio parámetros de prueba adicionales, que se aplicaron como parte del desarrollo general de la vacuna. Estos parámetros de prueba adicionales se especifican a continuación, así como la justificación para su inclusión.

- Inmunogenicidad contra Haemophilus

La monografía 2067 de la Ph. Eur. exige que se realice esta prueba durante el desarrollo de la vacuna para demostrar la respuesta inmunitaria a PRP.

- PT no adsorbido y FHA no adsorbida

Tal como lo exige la monografía 0153 de la Ph. Eur., estas pruebas se realizan durante el desarrollo de la vacuna para demostrar que los antígenos permanecen totalmente adsorbidos a lo largo del tiempo.

- Porcentaje de adsorción del toxoide tetánico (Rocket)



Tal como lo exige la monografía 0153 de la Ph. Eur., esta prueba se realiza durante el desarrollo de la vacuna para documentar la adsorción de los antígenos a lo largo del tiempo.

- Ensayo de inmunogenicidad contra IPV en ratas

Según la monografía 2067 de la Ph. Eur., la prueba de potencia se realiza durante el desarrollo de la vacuna para demostrar la respuesta inmunitaria a IPV. Asimismo, esta prueba se utilizó para respaldar su omisión y la utilización en su lugar de una prueba *in vitro*, como se describe en Ph. Eur. 2.7.20 "In vivo assay of poliomyelitis vaccine (inactivated)" (Valoración *in vivo* de la vacuna contra la poliomielitis, inactivada).

- Inmunogenicidad contra hepatitis B

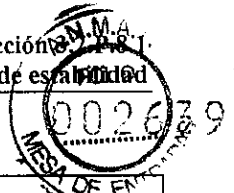
De conformidad con la monografía 2067 de la Ph. Eur. y Ph. Eur. 2.7.15, se ha implementado un método inmunoquímico para reducir las pruebas en animales y se han aplicado métodos tanto *in vivo* como *in vitro* durante el desarrollo del producto.

Todas las pruebas realizadas durante el estudio de estabilidad del PFAG, con los métodos y criterios de aceptación asociados a ellas, se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3: pruebas de estabilidad y criterios de aceptación para el producto final a granel de Marcy l'Etoile (estudio 1)

Prueba	Método de referencia	Criterios de aceptación	Frecuencia
Aspecto	Ph. Eur. 2.9.20, edición actual. Inspección visual	Suspensión turbia y blancuzca	T0, 3, 6 y 9 meses
Medición de pH	Ph. Eur. 2.2.3, edición actual Método potenciométrico	6,5-7,5	
Contenido de formaldehído libre	Según la Ph. Eur. 2.4.18, edición actual Ensayo colorimétrico	≤30 µg	
Contenido de aluminio	Según la Ph. Eur. 2.5.13, edición actual Ensayo de complejometría (EDTA)	0,80-1,60 mg/mL	
Medición de osmolalidad	Ph. Eur. 2.2.35, edición actual Método físicoquímico	300-400 mosmol/kg	
Fosfato de polirribosil ribitol (PRP) no adsorbido	Ph. Eur. 2.2.29, edición actual Cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD)	≥16 µg/mL	T0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 9 meses
PRP despolimerizado		Para información*	
Potencia diftérica	Ph. Eur. 2.7.6, edición actual Prueba de desafío intradérmica en cobayos - Inyección de la vacuna por vía intradérmica	Actividad ≥ 60 UI/mL Límite inferior de confianza (P=0,95) de la potencia estimada ≥ 40 UI/mL	T0, 3, 6 y 9 meses
Potencia tetánica	Ph. Eur. 2.7.8, edición actual Prueba de desafío en ratones - Inyección de la vacuna por vía subcutánea	Límite inferior de confianza (P=0,95) de la potencia estimada ≥ 80 UI/mL	





Prueba	Método de referencia	Criterios de aceptación	Frecuencia
Actividad de sensibilización a la histamina	Monografía 2067 de la Ph. Eur., edición actual Inyección de la vacuna en ratones por vía intraperitoneal seguida por inyección de una solución base de histamina	Supervivencia $\geq 95\%$	
Inmunogenicidad contra pertussis	Ph. Eur. 2.7.16, edición actual Prueba de inmunogenicidad en ratones (análisis serológico: método de ELISA)	Los títulos de anticuerpos anti-toxoide pertúsico (PTxd) y anti-hemaglutinina filamentosa (FHA) obtenidos para la vacuna no son significativamente ($P = 0,95$) inferiores a los de la vacuna de referencia	
Inmunogenicidad contra Haemophilus	Prueba de inmunogenicidad en ratones (análisis serológico: método de ELISA)	No menos del 50% de los ratones vacunados se han seroconvertido. Su título no es inferior a 4 veces el del suero de control agrupado	
PT no adsorbido	Según la Ph. Eur. 2.7.1, edición actual Método ELISA	Para información†	
FHA no adsorbida	Según la Ph. Eur. 2.7.1, edición actual Método ELISA	Para información†	
Porcentaje de adsorción del toxoide tetánico	Método de inmunolectroforesis Rocket	Para información*	
Porcentaje de adsorción del toxoide diftérico	Método de inmunolectroforesis Rocket	Para información*	
Ensayo de inmunogenicidad contra IPV en ratas	Según la Ph. Eur. 2.7.20, edición actual Ensayo <i>in vivo</i> en ratas	Para información‡	T0, 6 y 9 meses
Contenido de antígeno D	Ph. Eur. 2.7.1, edición actual Método ELISA	Tipo 1: 40-86 UD/mL Tipo 2: 10-18 UD/mL Tipo 3: 34-72 UD/mL	T0, 3, 6 y 9 meses
Porcentaje de adsorción de hepatitis B	Ph. Eur. 2.7.1, edición actual Método ELISA	Para información*	T0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 9 meses
Potencia relativa <i>in vitro</i> de la hepatitis B (IVRP)	Ph. Eur. 2.7.15, edición actual Método ELISA	Para información*	T0, 3, 6 y 9 meses
Inmunogenicidad contra hepatitis B	Ph. Eur. 2.7.15, edición actual Método ELISA	El límite superior de confianza ($P = 0,95$) de la potencia relativa estimada no es menor que 1,0	
Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica	Ph. Eur. 2.6.1, edición actual Filtración por membrana	No se observa crecimiento microbiano	T0, 6 y 9 meses

* Criterios de aceptación no establecidos al inicio del estudio

† Valor esperado: $\leq 2,5 \mu\text{g/mL}$

‡ Esta prueba se llevó a cabo para recopilar información que respaldara la omisión del ensayo *in vivo*. Por consiguiente, no se establecieron criterios de aceptación.





2.2 Resultados de los estudios de estabilidad del producto final a granel

Los resultados detallados se presentan en 3.2.P.8.3 Datos de estabilidad.

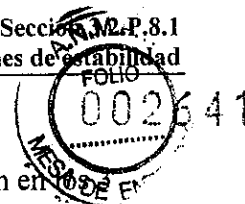
Para respaldar la vida útil de 9 meses, se proporcionan todos los datos completos.

2.2.1 Estudio de estabilidad 1: producto final a granel de Marcy l'Etoile (+5°C ± 3°C durante 9 meses)

El estudio de estabilidad 1 se llevó a cabo en tres lotes de PFAG elaborado con la formulación mejorada y se evaluaron los parámetros siguientes:

- Fisicoquímicos
 - El aspecto, la medición de pH, el contenido de aluminio y la medición de osmolalidad satisfacen los criterios de aceptación y permanecen estables a lo largo del tiempo;
 - En los 3 lotes se observó una tendencia a la disminución del contenido de formaldehído libre que puede explicarse por un consumo de formaldehído libre por parte de los aminoácidos esenciales a lo largo del tiempo. Esta baja concentración del contenido de formaldehído libre no tiene ningún efecto sobre la toxicidad específica de los componentes diftéricos y tetánicos (vea la sección 3.2.P.2.3 Desarrollo del proceso de elaboración). Los resultados cumplen con los criterios de aceptación a lo largo del tiempo;
 - En los 3 lotes se observó una tendencia al aumento del PRP no adsorbido, pero los resultados satisfacen los criterios de aceptación a lo largo del tiempo;
 - Como se esperaba para una vacuna líquida que contiene PRP-T, se observó una tendencia al aumento del PRP despolimerizado que no tiene ningún efecto sobre la inmunogenicidad contra haemophilus en los 3 lotes.
- Adsorción
 - El PT no adsorbido y la FHA no adsorbida cumplen con los valores esperados y son estables a lo largo del tiempo;
 - En cuanto al porcentaje de adsorción de los toxoides diftérico y tetánico por el método Rocket, se detectó un ligero aumento a lo largo del tiempo que no tiene ningún efecto sobre los resultados de la potencia. Los resultados de los 3 lotes concuerdan;
 - Los resultados de la adsorción del HBsAg muestran una tendencia a la disminución que no tiene ningún efecto sobre la inmunogenicidad contra hepatitis B, que cumple los criterios de aceptación y que permanece estable a lo largo del tiempo en los 3 lotes.
- Potencia e inmunogenicidad
 - Las potencias diftérica y tetánica, la inmunogenicidad (*in vivo*) contra pertussis, haemophilus y hepatitis B, y el contenido de antígeno D (*in vitro*) satisfacen los criterios de aceptación y permanecen estables a lo largo del tiempo;
 - Los resultados del ensayo de inmunogenicidad contra IPV en ratas concuerdan en los 3 lotes;






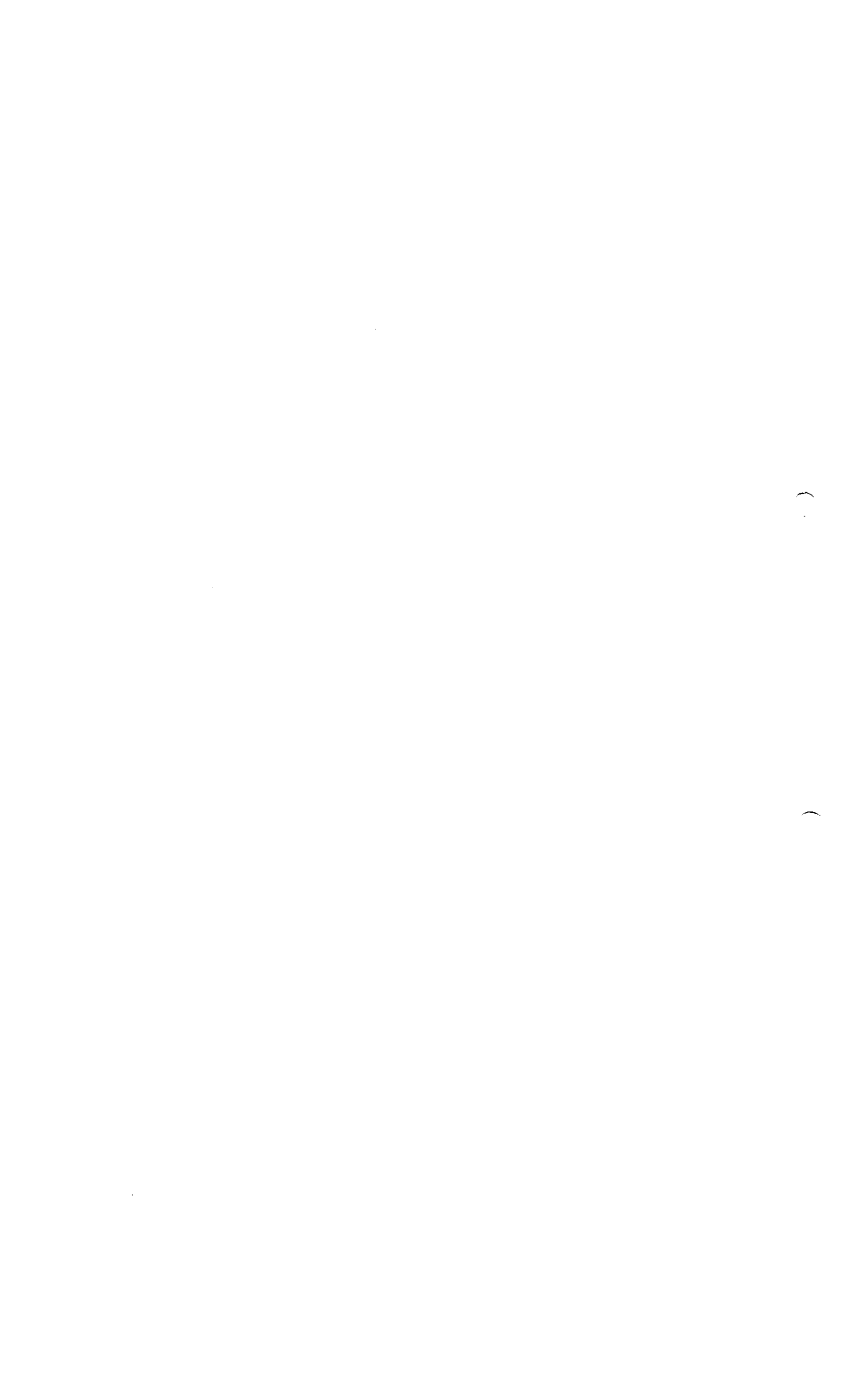
- Los resultados de la potencia relativa de la hepatitis B (*in vitro*) concuerdan en lotes.
- Seguridad
 - El producto permanece estéril a $+5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ durante 9 meses.
 - Los resultados de la actividad de sensibilización a la histamina cumplen con los criterios de aceptación a lo largo del tiempo;
- Conclusión

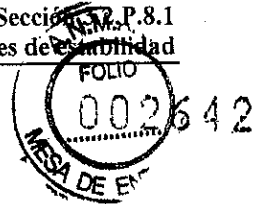
A $+5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ durante 9 meses, todos los resultados satisfacen los criterios de aceptación y confirman la calidad y la estabilidad del PFAG.

Por consiguiente, sanofi pasteur declara una vida útil de 9 meses para el PFAG almacenado a $+5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ en un tanque de acero inoxidable.


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DOMINGUEZ
SECRETARIO
SANOFI PASTEUR S.A.





3 Producto llenado

3.1 Producto llenado almacenado en jeringas monodosis (estudios 2 y 3)

3.1.1 Protocolos de los estudios de estabilidad del producto llenado almacenado en jeringas monodosis

3.1.1.1 Lotes analizados

La información sobre los lotes de producto final de MLE sometidos al estudio de estabilidad se resume en la Tabla 4 y la Tabla 5.

El estudio de estabilidad 2 se ha realizado sobre la formulación inicial, mientras que el estudio de estabilidad 3 se ha llevado a cabo sobre la formulación mejorada.

Tabla 4: lotes analizados para el estudio de estabilidad realizado sobre el producto llenado de Marcy l'Etoile con formulación inicial (estudio de estabilidad 2)

Producto llenado					Producto final a granel correspondiente
Número de lote	Lugar de elaboración	Inicio del estudio	Tamaño del lote	Cierre del envase	Número de lote
S4009	Marcy l'Etoile	07 de diciembre de 2005	138 456 unidades	Jeringa de vidrio monodosis sin aguja con tapón-émbolo y capuchón	FDNC0005
S4106	Marcy l'Etoile	24 de enero de 2006	137 880 unidades	Jeringa de vidrio monodosis sin aguja con tapón-émbolo y capuchón	FDNC0006
S4107	Marcy l'Etoile	30 de enero de 2006	138 654 unidades	Jeringa de vidrio monodosis sin aguja con tapón-émbolo y capuchón	FDNC0007



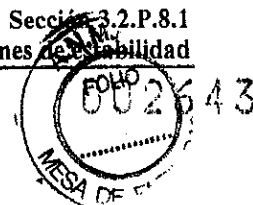


Tabla 5: lotes analizados para el estudio de estabilidad realizado sobre el producto llenado de Marcy l'Etoile con formulación mejorada (estudio de estabilidad 3)

Producto llenado					Producto final a granel correspondiente
Número de lote	Lugar de elaboración	Inicio del estudio	Tamaño del lote	Cierre del envase	Número de lote
FDNC0491	Marcy l'Etoile	07 de mayo de 2010	28 115 unidades	Jeringa de vidrio monodosis sin aguja con tapón-émbolo y capuchón	FDV01398
FDNC0504	Marcy l'Etoile	07 de mayo de 2010	30 548 unidades	Jeringa de vidrio monodosis sin aguja con tapón-émbolo y capuchón	FDV01416
FDNC0505	Marcy l'Etoile	07 de mayo de 2010	33 846 unidades	Jeringa de vidrio monodosis sin aguja con tapón-émbolo y capuchón	FDV01420

3.1.1.2 Pruebas y criterios de aceptación

Para los estudios en condiciones normales de almacenamiento recomendados, los parámetros monitoreados son los correspondientes al perfil de aprobación del producto llenado (excepto las pruebas de identidad que no son indicadoras de la estabilidad), además del contenido de formaldehído libre, la medición de osmolalidad, la actividad de sensibilización a la histamina, el PRP no adsorbido y el PRP despolimerizado, así como las pruebas de potencia, inmunogenicidad y adsorción del perfil de aprobación del producto final a granel descrito en la sección 3.2.P.5.1 Especificaciones. Los límites fueron los definidos en el momento en que se realizó el estudio.

Los demás parámetros evaluados durante los estudios de estabilidad se incluyeron como información complementaria, como se detalla a continuación:

- Prueba de integridad

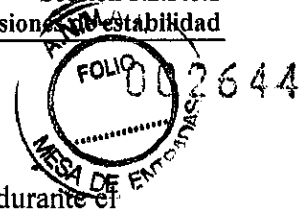
Se trata de una prueba indicadora de la estabilidad que permite evaluar la capacidad del sistema de cierre del envase para proteger y garantizar la eficacia y esterilidad durante la vida útil del producto medicinal estéril.

- Inmunogenicidad contra Haemophilus

La monografía 2067 de la Ph. Eur. exige que se realice esta prueba durante el desarrollo de la vacuna para demostrar la respuesta inmunitaria a PRP.

- PT y FHA no adsorbidos

Tal como lo exige la monografía 0153 de la Ph. Eur., estas pruebas se realizan durante el desarrollo de la vacuna para demostrar que los antígenos permanecen totalmente adsorbidos a lo largo del tiempo.



- **Porcentaje de adsorción del toxoide tetánico (Rocket)**
Tal como lo exige la monografía 0153 de la Ph. Eur., esta prueba se realiza durante el desarrollo de la vacuna para documentar la adsorción de los antígenos a lo largo del tiempo.
- **Potencia de la poliomiелitis en pollos y ensayo de inmunogenicidad contra IPV en ratas**
La prueba de potencia de la poliomiелitis en pollos se lleva a cabo en la formulación inicial. Este método ha sido sustituido en la formulación mejorada por el ensayo de inmunogenicidad contra IPV en ratas.
Según la monografía 2067 de la Ph. Eur., la prueba de potencia se realiza durante el desarrollo de la vacuna para demostrar la respuesta inmunitaria a IPV. Asimismo, esta prueba se utilizó para respaldar su omisión y la utilización en su lugar de una prueba *in vitro*, como se describe en Ph. Eur. 2.7.20 "*In vivo* assay of poliomyelitis vaccine (inactivated)" (Valoración *in vivo* de la vacuna contra la poliomiелitis, inactivada).
- **Contenido de antígeno D no adsorbido**
Tal como lo exige la monografía 0153 de la Ph. Eur., esta prueba se realiza durante el desarrollo de la vacuna para documentar la adsorción de los antígenos a lo largo del tiempo.
- **Inmunogenicidad contra hepatitis B**
De conformidad con la monografía 2067 de la Ph. Eur. y Ph. Eur. 2.7.15, se ha implementado un método inmunoquímico para reducir las pruebas en animales y se han aplicado métodos tanto *in vivo* como *in vitro* durante el desarrollo del producto.
- **Toxicidad específica de los componentes diftéricos y tetánicos**
Esta prueba se realiza durante el desarrollo del producto de conformidad con la monografía 2067 de la Ph. Eur.

Todas las pruebas realizadas durante los estudios de estabilidad del producto final de MLE, con los métodos y criterios de aceptación asociados a ellas, se resumen en la Tabla 6 para la formulación inicial y la mejorada.

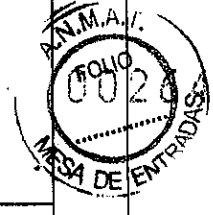

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
ENCARGADO
SANOFI PASTEUR S.A.



Tabla 6: pruebas de estabilidad y criterios de aceptación para el producto llenado de Marcy l'Etoile realizado con formulación inicial y mejorada (estudios de estabilidad 2 y 3)

Prueba	Método de referencia	Criterios de aceptación		Frecuencia	
		Formulación inicial (estudio 2)	Formulación mejorada (estudio 3)	Formulación inicial (estudio 2)	Formulación mejorada (estudio 3)
Aspecto	Ph. Eur. 2.9.20, edición actual. Inspección visual	Suspensión turbia y blancazca	Suspensión turbia y blancazca	+5 °C ± 3 °C	+5 °C ± 3 °C
Medición de pH	Ph. Eur. 2.2.3, edición actual. Método potenciométrico	6,5-8,0	6,5-7,5	T0, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30 y 36 meses	T0, 1, 3 y 6 meses
Contenido de formaldehído libre	Según la Ph. Eur. 2.4.18, edición actual. Ensayo colorimétrico	≤30 µg	≤30 µg	T0, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30 y 36 meses	/
Volumen extraíble	Ph. Eur. 2.9.17, versión actual. Volumen = masa/densidad	Al menos el volumen nominal	Al menos el volumen nominal	T0 y 36 meses	T0 y 36 meses
Contenido de aluminio	Según la Ph. Eur. 2.5.13, edición actual. Ensayo de complejometría (EDTA)	/	0,40-0,80 mg/dosis	/	T0 y 36 meses
Medición de osmolaridad	Ph. Eur. 2.2.35, edición actual. Método fisicoquímico	250-450 mosmol/kg	300-400 mosmol/kg	T0, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30 y 36 meses	T0, 1, 3 y 6 meses
Fosfato de polirribosil ribitol (PRP) no adsorbido	Ph. Eur. 2.2.29, edición actual. Cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD)	≥16 µg/mL	≥16 µg/mL	T0, 1, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30 y 36 meses	T0, 1, 3 y 6 meses
PRP despolimerizado		Para información*	Para información†		

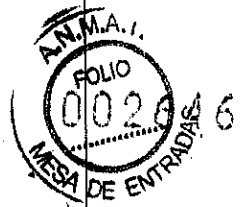


RA_0303395

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

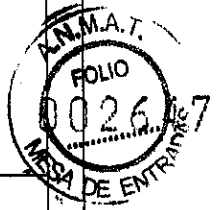


Prueba	Método de referencia	Criterios de aceptación		Frecuencia	
		Formulación inicial (estudio 2)	Formulación mejorada (estudio 3)	Formulación inicial (estudio 2)	Formulación mejorada (estudio 3)
Potencia diftérica	Ph. Eur. 2.7.6, edición actual Prueba de desafío intradérmica en cobayos - Inyección de la vacuna por vía intradérmica	Actividad ≥ 30 UI/dosis Límite inferior de confianza ($P=0,95$) de la potencia estimada ≥ 20 UI/dosis	Actividad ≥ 30 UI/dosis Límite inferior de confianza ($P=0,95$) de la potencia estimada ≥ 20 UI/dosis	+5 °C \pm 3 °C T0, 6, 12, 18, 24, 30 y 36 meses	+25°C \pm 2°C T0, 3 y 6 meses
Potencia tetánica	Ph. Eur. 2.7.8, edición actual Prueba de desafío en ratones - Inyección de la vacuna por vía subcutánea	Límite inferior de confianza ($P=0,95$) de la potencia estimada ≥ 40 UI/dosis	Límite inferior de confianza ($P=0,95$) de la potencia estimada ≥ 40 UI/dosis	T0, 6, 12, 18, 24, 30 y 36 meses	T0, 3 y 6 meses
Actividad de sensibilización a la histamina	Monografía 2067 de la Ph. Eur., edición actual Inyección de la vacuna en ratones por vía intraperitoneal seguida por inyección de una solución base de histamina	Supervivencia $\geq 95\%$	Supervivencia $\geq 95\%$	T0, 12, 24 y 36 meses	/
Inmunogenicidad contra pertussis	Ph. Eur. 2.7.16, edición actual Prueba de inmunogenicidad en ratones (análisis serológico: método de ELISA)	Los títulos de anticuerpos anti-toxide pertústico (PTxd) y anti-hemaglutinina filamentososa (FHA) obtenidos para la vacuna no son significativamente inferiores a los ($P = 0,95$) de la vacuna de referencia	Los títulos de anticuerpos anti-toxide pertústico (PTxd) y anti-hemaglutinina filamentososa (FHA) obtenidos para la vacuna no son significativamente inferiores a los ($P = 0,95$) de la vacuna de referencia	T0, 6, 12, 18, 24, 30 y 36 meses	T0, 3 y 6 meses





Prueba	Método de referencia	Criterios de aceptación		Frecuencia	
		Formulación inicial (estudio 2)	Formulación mejorada (estudio 3)	Formulación inicial (estudio 2)	Formulación mejorada (estudio 3)
Immunogenicidad contra Haemophilus	Prueba de inmunogenicidad en ratones vacunados se han seroconvertido. Su título no es inferior a 4 veces el del suero de control agrupado	No menos del 50% de los ratones vacunados se han seroconvertido. Su título no es inferior a 4 veces el del suero de control agrupado	Para información ‡	+5 °C ± 3 °C	+25°C ± 2°C
PT no adsorbido	Según la Ph. Eur. 2.7.1, edición actual Método ELISA	Para información §	Para información **	T36 meses	T0, 6, 12, 24, 30 y 36 meses
FHA no adsorbida	Según la Ph. Eur. 2.7.1, edición actual Método ELISA	Para información §	Para información **		
Porcentaje de adsorción del toxoide tetánico	Método de inmunoelectroforesis Rocket	Para información ††	Para información ††	T0, 6, 12, 18, 24, 30 y 36 meses	T0, 1, 3 y 6 meses
Porcentaje de adsorción del toxoide diftérico	Método de inmunoelectroforesis Rocket	Para información *	Para información *	T0, 6, 12, 18, 24, 30 y 36 meses	T0, 1, 3 y 6 meses
Potencia de la poliomicelitis en pollos	Ph. Eur. 2.7.20, edición actual Ensayo <i>in vivo</i> en pollos	Tipo 1 ≥ 2 Tipo 2 ≥ 2 Tipo 3 ≥ 2	/	T0, 6, 12, 18, 24, 30 y 36 meses	/
Ensayo de inmunogenicidad contra IPV en ratas	Según la Ph. Eur. 2.7.20, edición actual Ensayo <i>in vivo</i> en ratas	/	Para información †††	/	/
Contenido de antígeno D	Ph. Eur. 2.7.1, edición actual Método ELISA	Tipo 1: 20-43 UD/dosis Tipo 2: 5-9 UD/dosis Tipo 3: 17-36 UD/dosis	Tipo 1: 20-43 UD/dosis Tipo 2: 5-9 UD/dosis Tipo 3: 17-36 UD/dosis	T0, 6, 12, 18, 24, 30 y 36 meses	T0, 1, 3 y 6 meses



sanofi pasteur
352 - Hexaxim

Prueba	Método de referencia	Criterios de aceptación			Frecuencia	
		Formulación inicial (estudio 2)	Formulación mejorada (estudio 3)	Formulación inicial (estudio 2)	Formulación mejorada (estudio 3)	
Contenido de antígeno D no adsorbido	Ph. Eur. 2.7.1, edición actual Método ELISA	/	Para información ^{††}	+5 °C ± 3 °C	+25°C ± 2°C	
Porcentaje de adsorción de hepatitis B	Ph. Eur. 2.7.1, edición actual Método ELISA	Para información [*]	Para información [†]	T0, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30 y 36 meses	T0, 1, 3 y 6 meses	
Potencia relativa <i>in vitro</i> de la hepatitis B (IVRP)	Ph. Eur. 2.7.15, edición actual Método ELISA	Para información [*]	Para información [*]	T0, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30 y 36 meses	T0, 3 y 6 meses	
Inmunogenicidad contra hepatitis B	Ph. Eur. 2.7.15, edición actual Método ELISA	El límite superior de confianza ($P = 0,95$) de la potencia relativa estimada no es menor que 1,0	El límite superior de confianza ($P = 0,95$) de la potencia relativa estimada no es menor que 1,0	T0, 12, 24 y 36 meses	T0, 3 y 6 meses	
Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica	Ph. Eur. 2.6.1, edición actual Filtración por membrana	No se observa crecimiento microbiano	No se observa crecimiento microbiano	T0 y 36 meses	T0 y 6 meses	
Prueba de pirógenos	Ph. Eur. 2.6.8, edición actual Medición del aumento de la temperatura corporal en animales	Cumple el criterio de la Ph. Eur.	Cumple el criterio de la Ph. Eur.		/	
Toxicidad específica de los componentes diftéricos y tetánicos	Según la Ph. Eur. 2067, edición actual. Toxicidad específica	/	No deben producirse reacciones tóxicas ni muerte. Todos los animales deben tener un aspecto sano durante el periodo de observación y su peso no debe ser menor al final de la prueba que en el momento en que se administró la inyección			



RA_0303395

ROXANA MONTMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
ALDERADO
SANOFI PASTEUR S.A.

Prueba	Método de referencia	Criterios de aceptación		Frecuencia	
		Formulación inicial (estudio 2)	Formulación mejorada (estudio 3)	Formulación inicial (estudio 2)	Formulación mejorada (estudio 3)
Prueba de integridad	Prueba de integridad del cierre del envase con riboflavina 0,1% p/v	/	No se detecta la presencia de colorante en el contenido de ninguna de las jeringas monodosis analizadas	+5 °C ± 3 °C	+25°C ± 2°C T0, 12, 24 y 36 meses T0 y 6 meses

- * Criterios de aceptación no establecidos al inicio del estudio
- † Criterios de aceptación definidos para los futuros lotes implicados en posteriores estudios de estabilidad y justificados en el párrafo 4
- ‡ Resultados esperados: no menos del 50% de los ratones vacunados se han seroconvertido. Su título no es inferior a 4 veces el del suero de control agrupado.
- § Esta prueba se realizó con fines informativos para observar una adsorción de antígeno máxima.
- ** Valor esperado: $\leq 2,5 \mu\text{g/mL}$
- †† Prueba utilizada para documentar la adsorción pero no utilizada para el producto comercializado
- ‡‡ Esta prueba se llevó a cabo para recopilar información para respaldar la omisión del ensayo *in vivo*. (cambio a la prueba *in vitro*). Por consiguiente, no se establecieron criterios de aceptación.

ROXANA MONTMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
GERENTE
SANOFI PASTEUR S.A.





3.1.2 Resultados de los estudios de estabilidad del producto llenado almacenado en jeringas monodosis

Los resultados detallados se presentan en 3.2.P.8.3 Datos de estabilidad.

Para respaldar la vida útil de 36 meses, se proporcionan datos completos sobre la estabilidad en la formulación inicial y los datos disponibles sobre la estabilidad en la formulación mejorada.

3.1.2.1 Estudio 2: producto llenado de Marcy l'Étoile realizado con formulación inicial

Se ha finalizado el estudio de estabilidad a largo plazo en lotes de formulación inicial almacenados durante 36 meses a $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.

El estudio de estabilidad 2 se llevó a cabo en tres lotes de PF elaborado con la formulación inicial y se evaluaron los parámetros siguientes:

- Físicoquímicos
 - En cuanto al aspecto, todos los lotes satisfacen en todos los momentos de medición los criterios de aceptación, excepto el lote S4107 a los 12 meses. De hecho, se observó una partícula blanca en una jeringa de este lote a los 12 meses. Se realizaron ensayos complementarios como la identificación de partículas y la inspección visual. La identificación de partículas mostró la presencia de fosfato de zinc, tungsteno y sílice, y no se observó ningún elemento visible durante la inspección visual de 100 jeringas ni en ninguno de los momentos de medición siguientes. Este resultado puntual no está relacionado con la estabilidad del producto;
 - La medición de pH, el contenido de formaldehído libre, la medición de osmolalidad y el volumen extraíble satisfacen los criterios de aceptación y permanecen estables a lo largo del tiempo;
 - En los 3 lotes se observó una tendencia al aumento del PRP no adsorbido, pero los resultados satisfacen los criterios de aceptación a lo largo del tiempo;
 - Como se esperaba para una vacuna líquida que contiene PRP-T, se observó una tendencia al aumento del PRP despolimerizado que no tiene ningún efecto sobre la inmunogenicidad contra haemophilus en los 3 lotes. Esta evolución se ha modelizado (vea el párrafo 4).
- Adsorción
 - Los resultados del porcentaje de adsorción del toxoide tetánico por el método Rocket concuerdan en los 3 lotes;
 - Para el porcentaje de adsorción del toxoide diftérico por el método Rocket, se detectó un aumento significativo a lo largo del tiempo en los 3 lotes, que no tiene ningún efecto sobre los resultados de la potencia. Además, no se observó ninguna tendencia en la otra presentación (estudio 4);
 - El PT no adsorbido y la FHA no adsorbida cumplen con los valores esperados y permanecen estables a lo largo del tiempo;


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
ALBERADO
SANOFI PASTEUR S.A.



- Los resultados de la absorción del HBsAg muestran una tendencia a la disminución, pero no tiene ningún efecto en la inmunogenicidad contra hepatitis B, que cumple los criterios de aceptación y permanece estable a lo largo del tiempo en los 3 lotes. Se ha determinado un modelo no lineal para establecer unos criterios de aceptación de vida útil. El criterio de aceptación al final de la vida útil se define con respecto a los datos clínicos y de estabilidad en la formulación inicial. (vea el párrafo 4).
- Potencia e inmunogenicidad
 - La potencia diftérica y tetánica, y la inmunogenicidad (*in vivo*) contra pertussis, haemophilus y hepatitis B satisfacen los criterios de aceptación y permanecen estables a lo largo del tiempo;
 - Los resultados de la potencia relativa de la hepatitis B (*in vitro*) concuerdan en los 3 lotes;
 - Para la potencia de la poliomielitis en pollos y para el contenido de antígeno D, se cumplen los criterios de aceptación para los 3 serotipos. Para el tipo 2, la disminución observada de la potencia de la poliomielitis en pollos podría explicarse por la variabilidad de la prueba *in vivo*. Como el contenido de antígeno D permanece estable y se ha demostrado que el contenido de antígeno D permite detectar lotes de potencia atenuada (vea 3.2.P.5.6 Justificación de las especificaciones), los resultados se consideran aceptables.
- Seguridad
 - El producto permanece estéril a $+5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ durante 36 meses;
 - Los resultados de la prueba de pirógenos y de sensibilización a la histamina cumplen los criterios de aceptación a lo largo del tiempo.
- Conclusión

A $+5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ durante 36 meses, todos los resultados satisfacen los criterios de aceptación y confirman la calidad y la estabilidad del producto a lo largo de su vida útil de 36 meses.

3.1.2.2 Estudio 3: producto llenado de Marcy l'Etoile realizado con formulación mejorada

El estudio de estabilidad 3 se lleva a cabo en 3 lotes de producto final de MLE elaborado con formulación mejorada en condiciones normales (36 meses a $+5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$) y en condiciones aceleradas (6 meses a $+25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$)

3.1.2.2.1 Estudio 3: estudio de estabilidad a largo plazo

El estudio de estabilidad 3 controlado con las condiciones de almacenamiento normales (36 meses a $+5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$) se evalúa según los parámetros siguientes:

- Físicoquímicos
 - El aspecto, la medición de pH, el contenido de formaldehído libre, el contenido de aluminio y la medición de osmolalidad satisfacen los criterios de aceptación;
 - Los resultados para el PRP no adsorbido satisfacen los criterios de aceptación;

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
ALBERGADO
SANOFI PASTEUR S.A.

