

sanofi pasteur
352 - Hexaxim

Pruebas	Criterios de aceptación	T0*	1 mes	3 meses	6 meses
FHA no adsorbida	Para información (µg/mL)§	<2,5	NP	<2,5 a los 4 meses	<2,5
Porcentaje de adsorción del toxoide tetánico	Para información (%)	27	50	47	33
Porcentaje de adsorción del toxoide diftérico	Para información (%)	55	65	68	77
Contenido de antígeno D	Tipo 1: 20 - 43 UD/dosis	28,8	27,6	25,1	21,4
	Tipo 2: 5 - 9 UD/dosis	6,0	6,7	6,9	6,1
	Tipo 3: 17 - 36 UD/dosis	25,7	26,5	26,5 a los 4 meses	25,0
Porcentaje de adsorción de la hepatitis B (ELISA)	Para información (%)	88	74	76	65
Potencia relativa <i>in vitro</i> de la hepatitis B (IVRP)	Para información (potencia relativa)	1,11	1,17	1,09	0,77
Inmunogenicidad contra hepatitis B	El límite superior de confianza (P = 0,95) de la potencia relativa estimada no es menor que 1,0	1,16	NP	0,93	1,25
		0,568	NP	0,539	0,765
		2,041	NP	1,705	2,034
Límite superior	Sin crecimiento microbiano.	Cumple	NP	NP	Cumple
Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica	La prueba CCIT es aceptable si no se detecta la presencia de colorante en el contenido de ninguno de los viales monodosis analizados	Cumple	NP	NP	Cumple

* Todos los resultados se obtienen en el T0 del producto llenado, excepto para las pruebas siguientes: potencia tetánica y diftérica, inmunogenicidad contra pertussis anti-FHA y anti-PT, inmunogenicidad contra haemophilus, PT y FHA no adsorbidos, e inmunogenicidad contra hepatitis B. Para estas pruebas, los resultados son los resultados de liberación del producto final a granel.

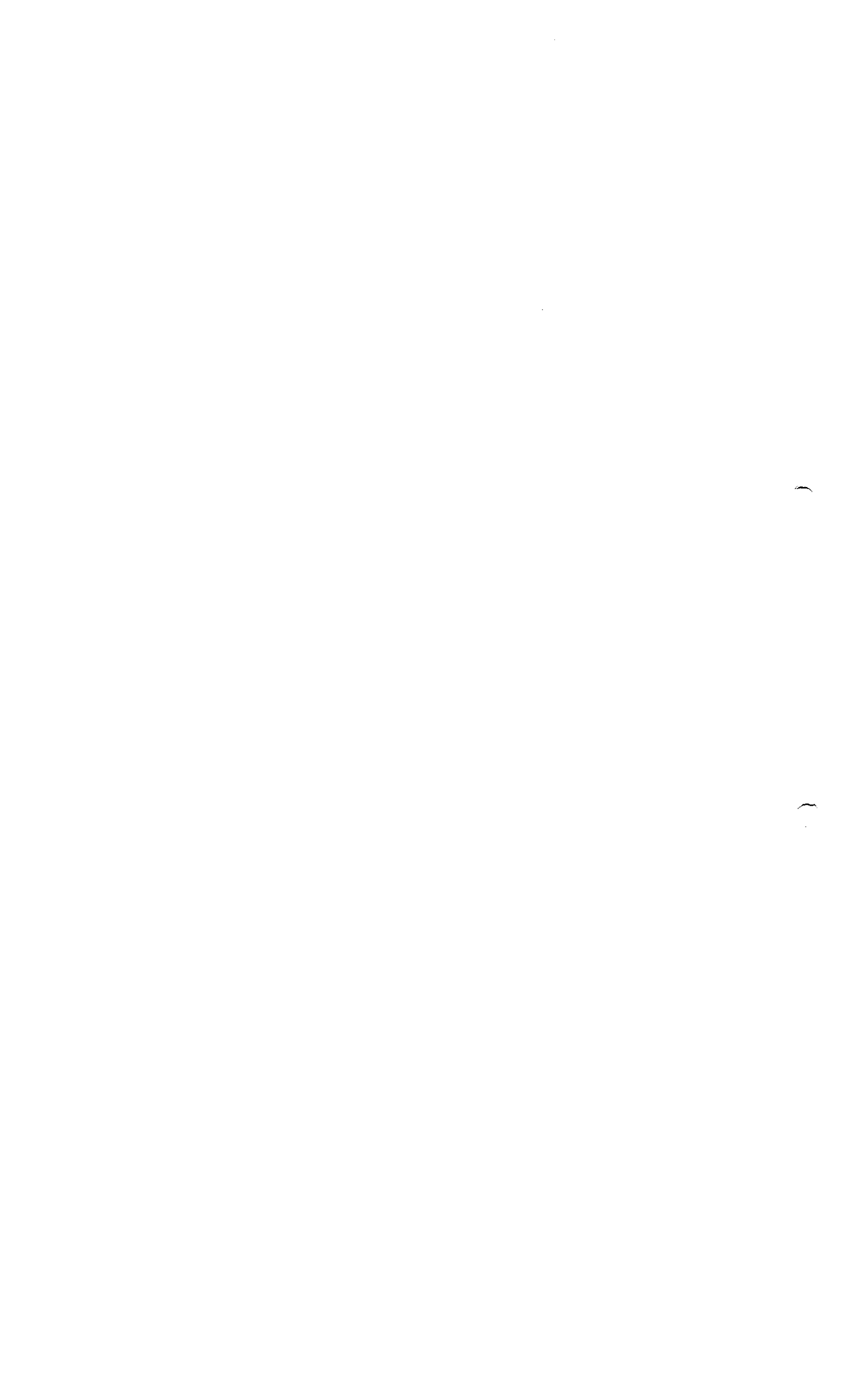
† No programada según el protocolo

RA_0303397

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
GERENTE
SANOFI PASTEUR S.A.





sanofi pasteur
352 - Hexaxim

‡ 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
§ Valor previsto: 2,5 µg/ml.



Información confidencial/proprietaria
Página 82 de 120

RA_0303397


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DOMINGUEZ
ACREDITADO
SANOFI PASTEUR S.A.

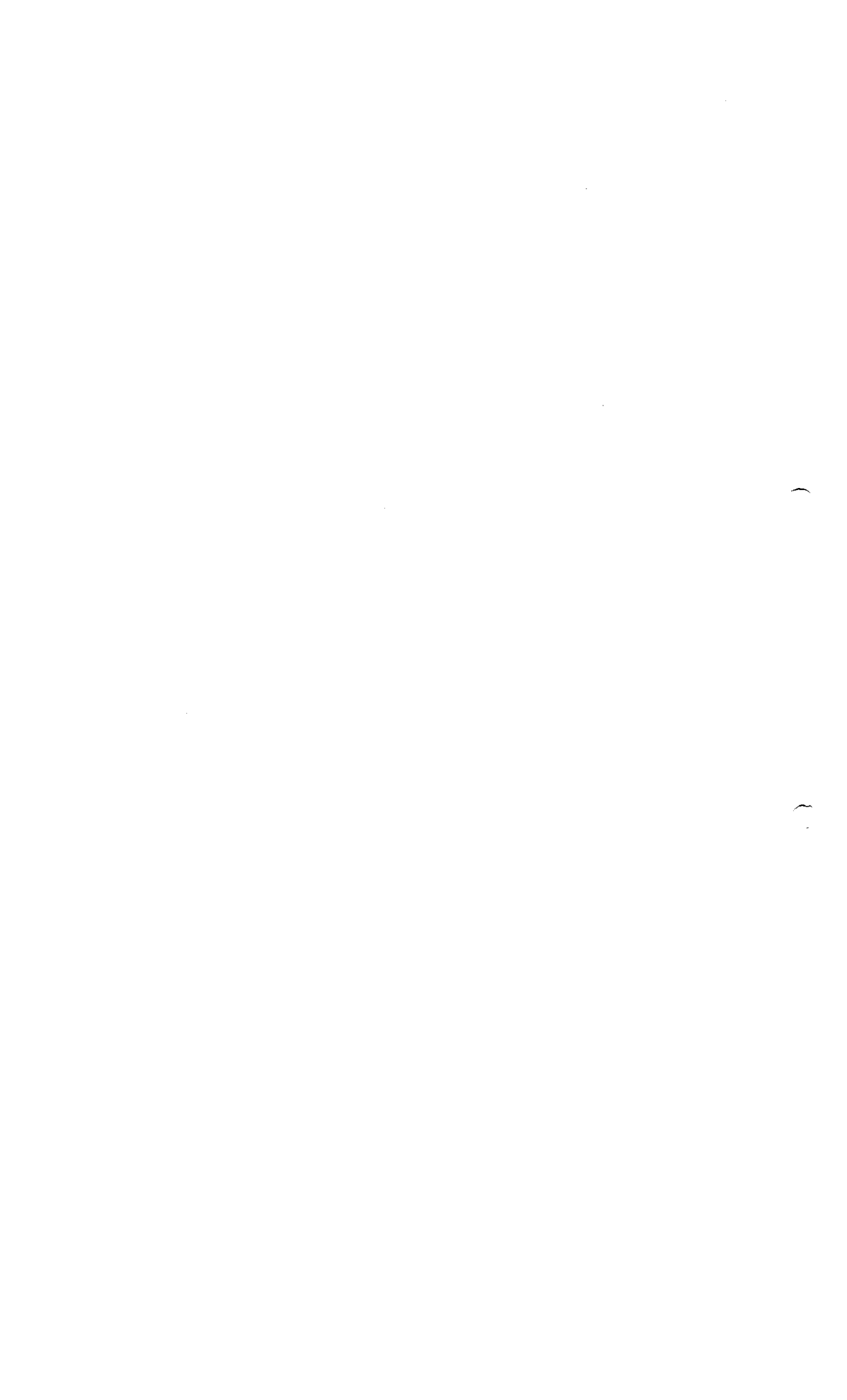


Tabla 21: Resultados del estudio de estabilidad del lote S4314 de producto llenado de Val de Reuil a +25°C ± 2°C

Pruebas	Criterios de aceptación	T0*	1 mes	3 meses	6 meses
Aspecto	Suspensión turbia y blanqueza	Cumple	Suspensión turbia y blanqueza con partículas blancas	Cumple	Cumple
Medición de pH	6,5 - 7,5	7,20	7,25	7,28	7,28
PRP no adsorbido	≥16 µg/mL	19,8	21,9	26,6	29,4
PRP despolimerizado	Para información (%)	12,3	27,7	61,3	78,7
Potencia diftérica	Actividad ≥ 30 UI/mL				
Actividad	El límite inferior de confianza (P=0,95) de la potencia estimada es ≥ 20 UI/mL	76	NP†	76	45
Límite inferior		57	NP	53	30
Límite superior		113	NP	115	67
Potencia tetánica	El límite inferior de confianza (P=0,95) de la potencia estimada es ≥ 40 UI/mL	705	NP	314	273
Actividad		485	NP	226	204
Límite inferior		1017	NP	432	359
Límite superior					
Inmunogenicidad contra pertussis anti-FHA	El título de anticuerpos anti-hemaglutinina filamentosos (FHA) obtenido para la vacuna no es significativamente (P = 0,95) inferior al de la vacuna de referencia	Cumple	NP	Prueba no válida.†	Cumple
Inmunogenicidad contra pertussis anti-PT	El título de anticuerpos anti-hemaglutinina filamentosos (FHA) obtenido para la vacuna no es significativamente (P = 0,95) inferior al de la vacuna de referencia	Cumple	NP	Prueba no válida.†	Cumple
Inmunogenicidad contra Haemophilus	Para información§	Cumple	NP	Cumple	Cumple
PT no adsorbido	Para información (µg/mL)**	<2,5	NP	<2,5	<2,5



ROXANA MONTEMILONE DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMÍNGUEZ COORDINADOR
SANOFI PASTEUR S.A.



Pruebas	Criterios de aceptación	T0*	1 mes	3 meses	6 meses
FHA no adsorbida	Para información (µg/mL)**	<2,5	NP	<2,5 a los 4 meses	<2,5 a los 10 meses
Porcentaje de adsorción del toxoide tetánico	Para información (%)	18	35	37	38
Porcentaje de adsorción del toxoide diftérico	Para información (%)	52	61	71	73
Contenido de antígeno D	Tipo 1: 20 - 43 UD/dosis	28,1	27,0	22,6	19,4
	Tipo 2: 5 - 9 UD/dosis	5,8	6,9	6,5	6,0
	Tipo 3: 17 - 36 UD/dosis	24,6	21,9 a los 2 meses	22,4 a los 4 meses	19,0
Porcentaje de adsorción de la hepatitis B (ELISA)	Para información (%)	90	75	71	71
Potencia relativa <i>in vitro</i> de la hepatitis B (IVRP)	Para información (potencia relativa)	1,45	1,50	1,16	0,96
Immunogenicidad contra hepatitis B	El límite superior de confianza (P = 0,95) de la potencia relativa estimada no es menor que 1,0	1,17 0,644 2,268	NP NP NP	1,37 0,820 2,450	0,96 0,554 1,689
Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica	Sin crecimiento microbiano.	Cumple	NP	NP	Cumple
Prueba de integridad	La prueba CCIT es aceptable si no se detecta la presencia de colorante en el contenido de ninguno de los viales monodosis analizados	Cumple	NP	NP	Cumple

† Todos los resultados se obtienen en el T0 del producto llenado, excepto para las pruebas siguientes: potencia tetánica y diftérica, inmunogenicidad contra pertussis anti-FHA y anti-PT, inmunogenicidad contra haemophilus, PT y FHA no adsorbidos, e inmunogenicidad contra hepatitis B. Para estas pruebas, los resultados son los resultados de liberación del producto final a granel.

‡ No programada según el protocolo

§ No se repiten las pruebas debido a la proximidad del siguiente momento de medición

** 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

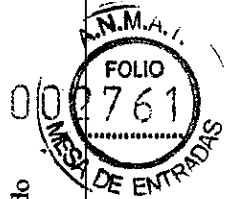
Valor previsto: 2,5 µg

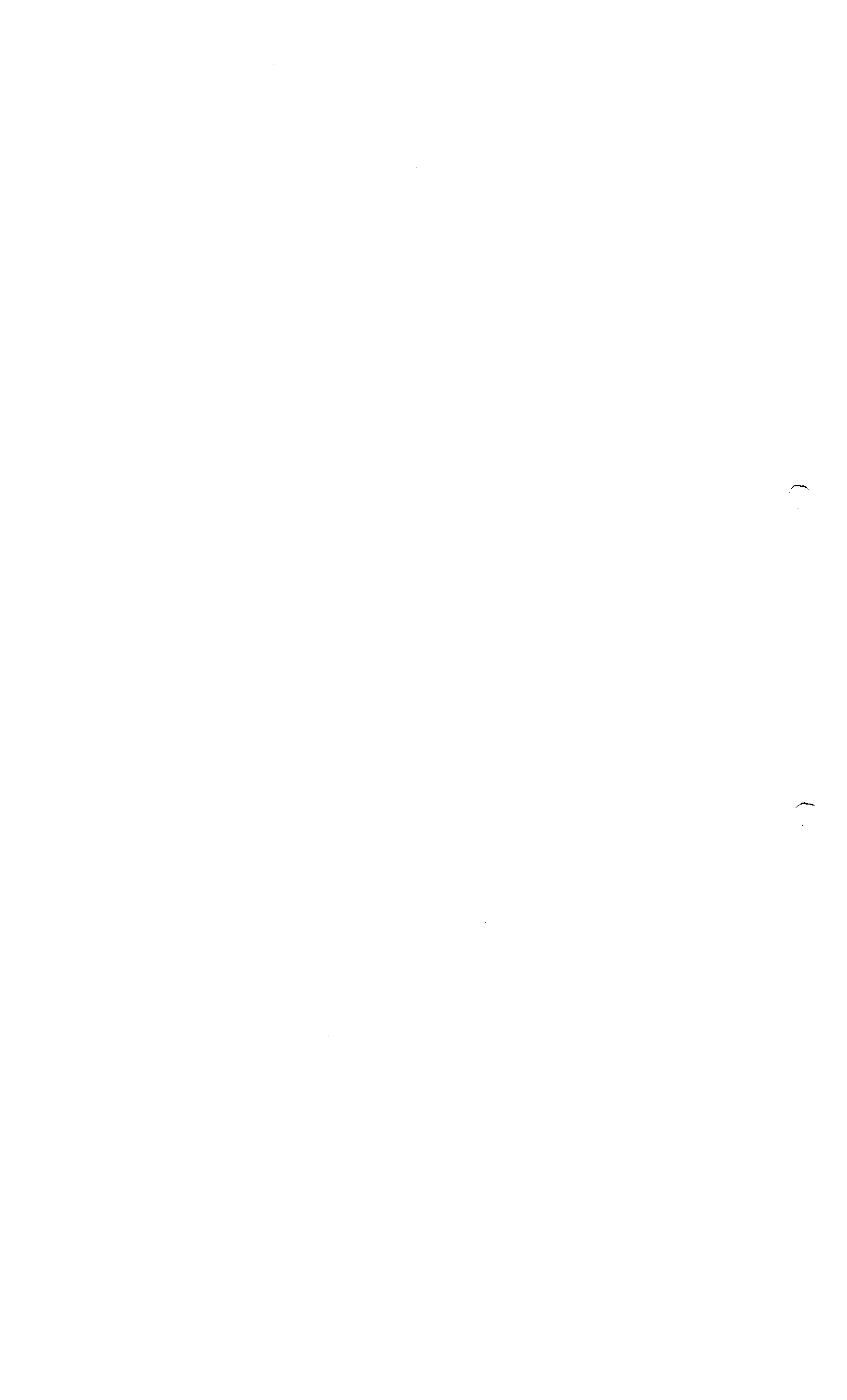
LUXANA MONTEVILLONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINGUEZ
RECEBADO
SANOFI PASTEUR S.A.

RA_0303397

Información confidencial/proprietaria
Página 84 de 120





2 Procedimientos analíticos

La lista de todos los procedimientos analíticos utilizados para los distintos estudios de estabilidad aplicados al producto medicinal de la vacuna combinada contra la difteria, el tétanos, la tos ferina acelular, la hepatitis B, la poliomielitis inactivada (trivalente concentrado) y *haemophilus influenzae* tipo b se presenta en la Tabla 22.


Tabla 22: Métodos de análisis utilizados en los estudios de estabilidad


Prueba	Referencia	Método de análisis		Número del estudio
		Método	Validación	
Aspecto	Ph. Eur. 2.9.20, edición actual. Inspección visual	/	/	1, 2, 3, 4 y 5
Medición de pH	Ph. Eur. 2.2.3, edición actual Método potenciométrico	/	/	1, 2, 3, 4 y 5
Contenido de formaldehído libre	Según la Ph. Eur. 2.4.18, edición actual Ensayo colorimétrico	Sección 3.2.P.5.2	Sección 3.2.P.5.3	1, 2, 3, 4 y 5
Volumen extraíble	Ph. Eur. 2.9.17, versión actual Volumen = masa/densidad	/	/	2, 3, 4 y 5
Contenido de aluminio	Según la Ph. Eur. 2.5.13, edición actual Ensayo de complejometría (EDTA)	Sección 3.2.P.5.2	Sección 3.2.P.5.3	1, 3 y 5
Medición de osmolalidad	Ph. Eur. 2.2.35, edición actual Método fisicoquímico	/	/	1, 2, 3, 4 y 5
PRP no adsorbido	Ph. Eur. 2.2.29, edición actual	Sección 3.2.P.5.2	Sección 3.2.P.5.3	1, 2, 3, 4 y 5
PRP despolimerizado	Cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD)	Sección 3.2.P.5.2	Sección 3.2.P.5.3	1, 2, 3, 4 y 5
Potencia diftérica	Ph. Eur. 2.7.6, edición actual Inyección de la vacuna en animales por vía intradérmica	/	/	1, 2, 3, 4 y 5



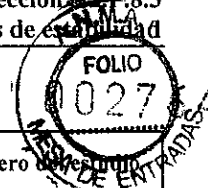


Prueba	Referencia	Método de análisis		Número de validación
		Método	Validación	
Potencia tetánica	Ph. Eur. 2.7.8, edición actual Inyección de la vacuna en animales por vía subcutánea	/	/	1, 2, 3, 4 y 5
Actividad de sensibilización a la histamina	Ph. Eur. 1356., edición actual Inyección de la vacuna en ratones por vía intraperitoneal seguida por la inyección de una solución base de histamina	Sección 3.2.P.5.2	Sección 3.2.P.5.3	1, 2, 3, 4 y 5
Inmunogenicidad de la pertussis	Ph. Eur. 2.7.16, edición actual Prueba de inmunogenicidad en ratones (análisis serológico: método de ELISA)	Sección 3.2.P.5.2	Sección 3.2.P.5.3	1, 2, 3, 4 y 5
Inmunogenicidad contra Haemophilus	Prueba de inmunogenicidad en ratones (análisis serológico: método de ELISA)	Sección 3.2.P.8.3	Sección 3.2.P.8.3	1, 2, 3, 4 y 5
PT no adsorbido	Según la Ph. Eur. 2.7.1, edición actual Método ELISA	Sección 3.2.P.8.3	Sección 3.2.P.8.3	1, 2, 3, 4 y 5
FHA no adsorbida	Según la Ph. Eur. 2.7.1, edición actual Método ELISA	Sección 3.2.P.8.3	Sección 3.2.P.8.3	1, 2, 3, 4 y 5
Porcentaje de adsorción del toxoide tetánico	Método de inmunoelectroforesis Rocket	Sección 3.2.P.8.3	Sección 3.2.P.8.3	1, 2, 3, 4 y 5
Porcentaje de adsorción del toxoide diftérico	Método de inmunoelectroforesis Rocket	Sección 3.2.P.5.2	Sección 3.2.P.5.3	1, 2, 3, 4 y 5
Ensayo de inmunogenicidad contra IPV en ratas	Según la Ph. Eur. 2.7.20, edición actual Ensayo in vivo en ratas	Sección 3.2.P.8.3	Sección 3.2.P.8.3	1, 3 y 5
Potencia de la poliomielitis en pollos	Ph. Eur. 2.7.20, edición actual Ensayo in vivo en pollos	/	/	2 y 4
Contenido de antígeno D	Ph. Eur. 2.7.1, edición actual Método ELISA	Sección 3.2.P.5.2	Sección 3.2.P.5.3	1, 2, 3, 4 y 5
Contenido de antígeno D no adsorbido*	Ph. Eur. 2.7.1, edición actual Método ELISA	Sección 3.2.P.5.2	Sección 3.2.P.5.3	3 y 5


 ROXANA MONTEMILONE
 DIRECTORA TÉCNICA
 SANOFI PASTEUR S.A.


 CHRISTIAN DOMINGUEZ
 ACUERDADO
 SANOFI PASTEUR S.A.





Prueba	Referencia	Método de análisis		Número de muestras de entrada
		Método	Validación	
Porcentaje de adsorción de la hepatitis B (ELISA)	Ph. Eur. 2.7.1, edición actual Método ELISA	Sección 3.2.P.5.2	Sección 3.2.P.5.3	1, 2, 3, 4 y 5
Potencia relativa <i>in vitro</i> de la hepatitis B (IVRP)	Ph. Eur. 2.7.15, edición actual Método ELISA	Sección 3.2.P.5.2	Sección 3.2.P.5.3	1, 2, 3, 4 y 5
Inmunogenicidad contra hepatitis B	Ph. Eur. 2.7.15, edición actual Método ELISA	/	/	1, 2, 3, 4 y 5
Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica	Ph. Eur. 2.6.1, edición actual Filtración por membrana	/	/	1, 2, 3, 4 y 5
Prueba de pirógenos	Ph. Eur. 2.6.8, edición actual Medición del aumento de la temperatura corporal en animales	/	/	2, 3, 4 y 5
Toxicidad específica para los componentes diftéricos y tetánicos	Según la Ph. Eur. 2067, edición actual. Toxicidad específica	Sección 3.2.P.8.3	Sección 3.2.P.8.3	3 y 5
Prueba de integridad	Prueba de integridad del cierre del envase con riboflavina 0,1% p/v	Sección 3.2.P.8.3	Sección 3.2.P.8.3	3 y 5

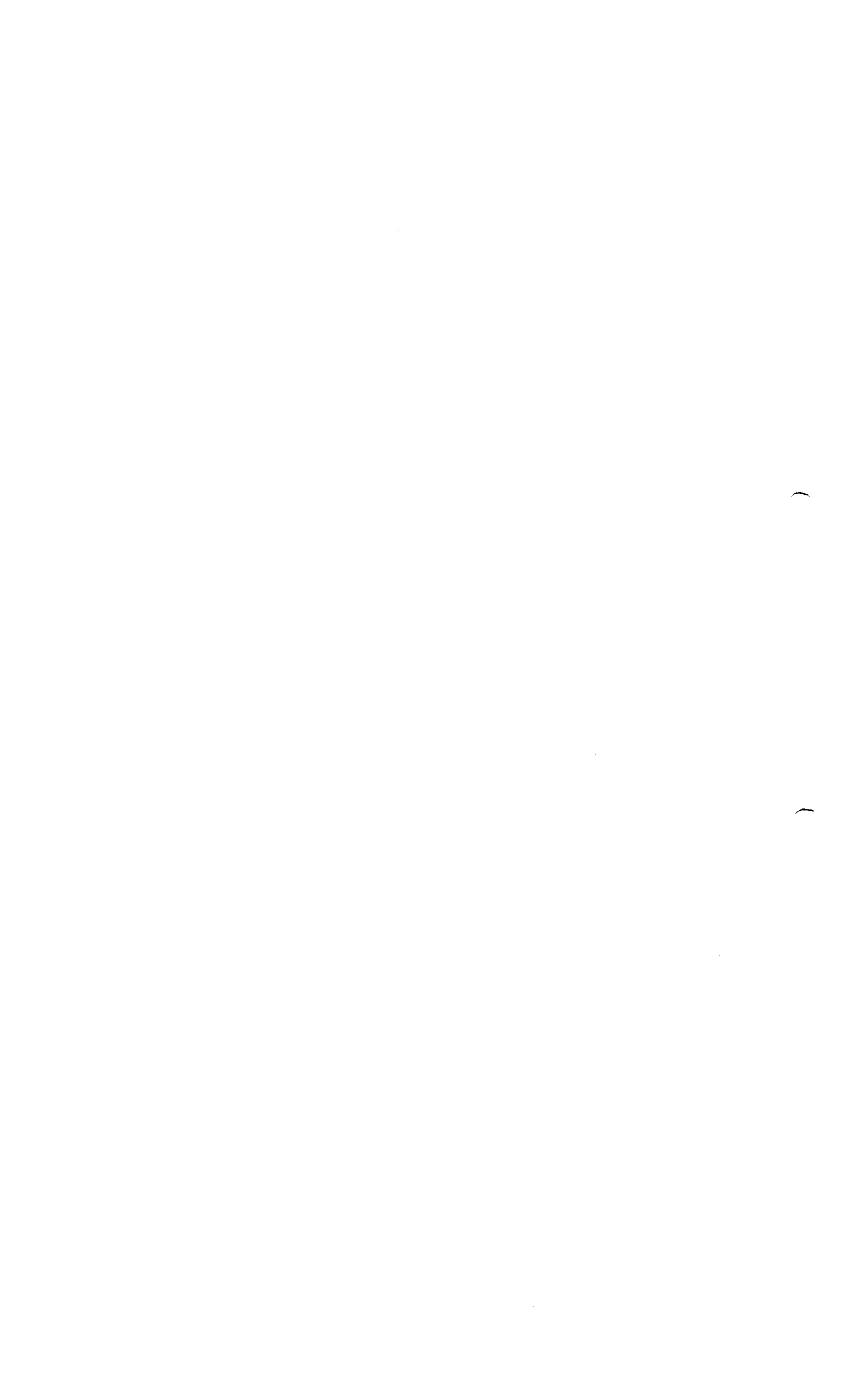
* La única diferencia entre la prueba de contenido de antígeno D y la prueba de antígeno D no adsorbido es la preparación de las muestras. Para la prueba de contenido de antígeno D no adsorbido, las muestras no se desorben, sino que se centrifugan. El análisis se realiza en el sobrenadante.

Los métodos analíticos son idénticos a los aplicados para la liberación del producto medicinal, excepto para las 7 pruebas adicionales que se enumeran a continuación, que solo se realizan durante los estudios de estabilidad. Los métodos utilizados para la liberación del producto medicinal se describen y validan en las secciones 3.2.P.5.2 Procedimientos analíticos y 3.2.P.5.3 Validación de los procedimientos analíticos, mientras que los métodos usados específicamente en los estudios de estabilidad se describen a continuación:

- Inmunogenicidad contra Haemophilus;
- PT no adsorbido;
- FHA no adsorbida;
- Porcentaje de adsorción del toxoide tetánico;
- Ensayo de inmunogenicidad contra IPV en ratas;
- Toxicidad específica de los componentes diftéricos y tetánicos;
- Prueba de integridad.


 ROXANA MONTEMILONE
 DIRECTORA TÉCNICA
 SANOFI PASTEUR S.A.


 CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
 LIBERADO
 SANOFI PASTEUR S.A.





2.1 Resumen de los procedimientos analíticos

2.1.1 Inmunogenicidad contra *Haemophilus*

2.1.1.1 Principio

Se inyecta por vía subcutánea a ratones hembra de 22-24 g $\frac{1}{4}$ de la dosis humana el día 0 (primovacunación) y el día 14 (refuerzo). El día 21 se extrae sangre a los ratones bajo anestesia.

Se titulan los anticuerpos anti-polisacárido de *haemophilus* tipo B en sueros individuales mediante el método ELISA.

2.1.1.2 Reactivos

- Antígeno de cobertura preparado mediante dilución de polisacárido de *haemophilus* de tipo b en agua desmineralizada ultrafiltrada;
- Referencia: agrupamiento de suero de ratones inmunizados (contra un lote de polisacárido PRP o una vacuna combinada que contenga PRP). Esta solución se titula en UE^a/mL en comparación con un agrupamiento definido de manera arbitraria previamente;
- Control interno: agrupamiento de suero de ratones inmunizados (contra un lote de polisacárido PRP o una vacuna combinada que contenga PRP). La inmunogenicidad contra *haemophilus* (título) se calcula en comparación con la referencia;
- Control negativo: agrupamiento de suero de ratones no inmunizados;
- Conjugado: anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa

2.1.1.3 Procedimiento operativo

2.1.1.3.1 Fase *in-vivo*: inoculación en animales

- 1) Se inyectan 0,5 mL por vía subcutánea a los ratones, en grupos de 8, el día 0 y el día 14 de una dilución de vacuna conjugada de polisacárido de *haemophilus* tipo b o una vacuna de control. La dosis es de 2,5 μ g de polisacárido/0,5 mL por ratón para ambos materiales;
- 2) Se extrae sangre de los ratones el día 21;
- 3) Se extrae sangre a un grupo adicional de 8 ratones no inyectados el día 21 para utilizarla como control negativo (ratones centinela);
- 4) Las muestras de sangre se recolectan individualmente antes de la centrifugación;
- 5) Tras la centrifugación, las muestras de suero se agrupan por grupo de producto y se almacenan a $\leq -20^{\circ}\text{C}$.

^a UE: Unidad de ELISA

