



2.2 Pruebas y criterios de aceptación

Las pruebas indicadoras de estabilidad para el principio activo PTxd purificado adsorbido, con los métodos relacionados y los criterios de aceptación, se resumen en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3: Pruebas indicadoras de estabilidad y criterios de aceptación para el PTxd adsorbido purificado

Prueba	Método de referencia	Criterios de aceptación
Contenido de aluminio	Ph. Eur. 2.5.13, edición actual	0,6 – 1,4 mg Al/mg de proteínas
Medición de pH	Ph. Eur. 2.2.3, edición actual	6,2 – 8,2
Identificación del toxoide pertúsico	Ph. Eur. 2.7.1, edición actual	Positiva
Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica	Ph. Eur. 2.6.1, edición actual	Sin crecimiento microbiano
Antigenicidad: toxoide pertúsico no adsorbido	Ph. Eur. 2.7.1, edición actual	Para información (µg/mL)
Inmunogenicidad contra el toxoide pertúsico en ratones	Ph. Eur. 1356, edición actual	La media del título anti-PT (UE/mL) se incluye en el intervalo de tolerancia estadístico [256 – 1929]
Irreversibilidad del toxoide pertúsico	Ph. Eur. 1356, edición actual	≥95% de vida

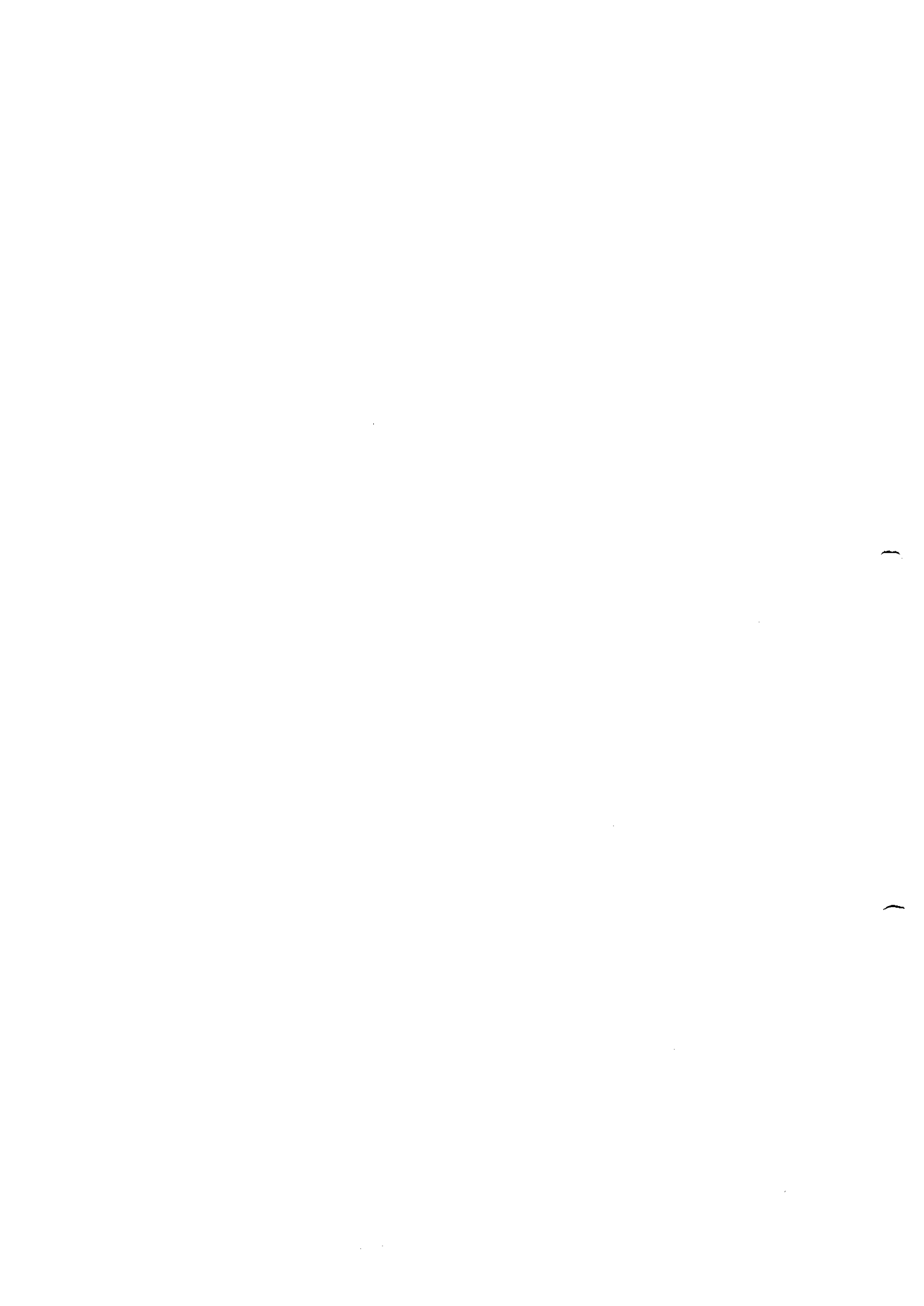
La prueba del contenido de aluminio se lleva a cabo en el momento de la liberación del PTxd purificado adsorbido. Se seleccionó esta prueba para el estudio de estabilidad como un indicador de estabilidad con el fin de determinar la cantidad del portador. El método de prueba y los criterios de aceptación siguen siendo idénticos a los que se aplicaron para la liberación.

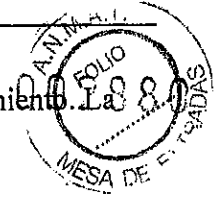
La medición del pH es una prueba de liberación que se le aplica al PTxd purificado adsorbido. Se seleccionó esta prueba para el estudio de estabilidad como un indicador de estabilidad para darle seguimiento a la degradación fisicoquímica. El método de prueba y los criterios de aceptación siguen siendo idénticos a los que se aplican para la liberación.

La prueba de esterilidad bacteriana y fúngica es una prueba de liberación que se le aplica al PTxd purificado adsorbido. Esta prueba es un indicador de estabilidad y se eligió para el estudio de estabilidad para darle seguimiento a la degradación microbiana. El método de prueba y los criterios de aceptación siguen siendo idénticos a los que se aplican para la liberación.

La prueba del PTxd no adsorbido se lleva a cabo en el momento de la liberación del intermedio de PTxd en solución. Esta prueba se eligió para el estudio de estabilidad para evaluar la desorción del PTxd. El método de prueba (ELISA) y los criterios de aceptación siguen siendo idénticos a los que se aplican para la liberación del intermedio de PTxd en solución.

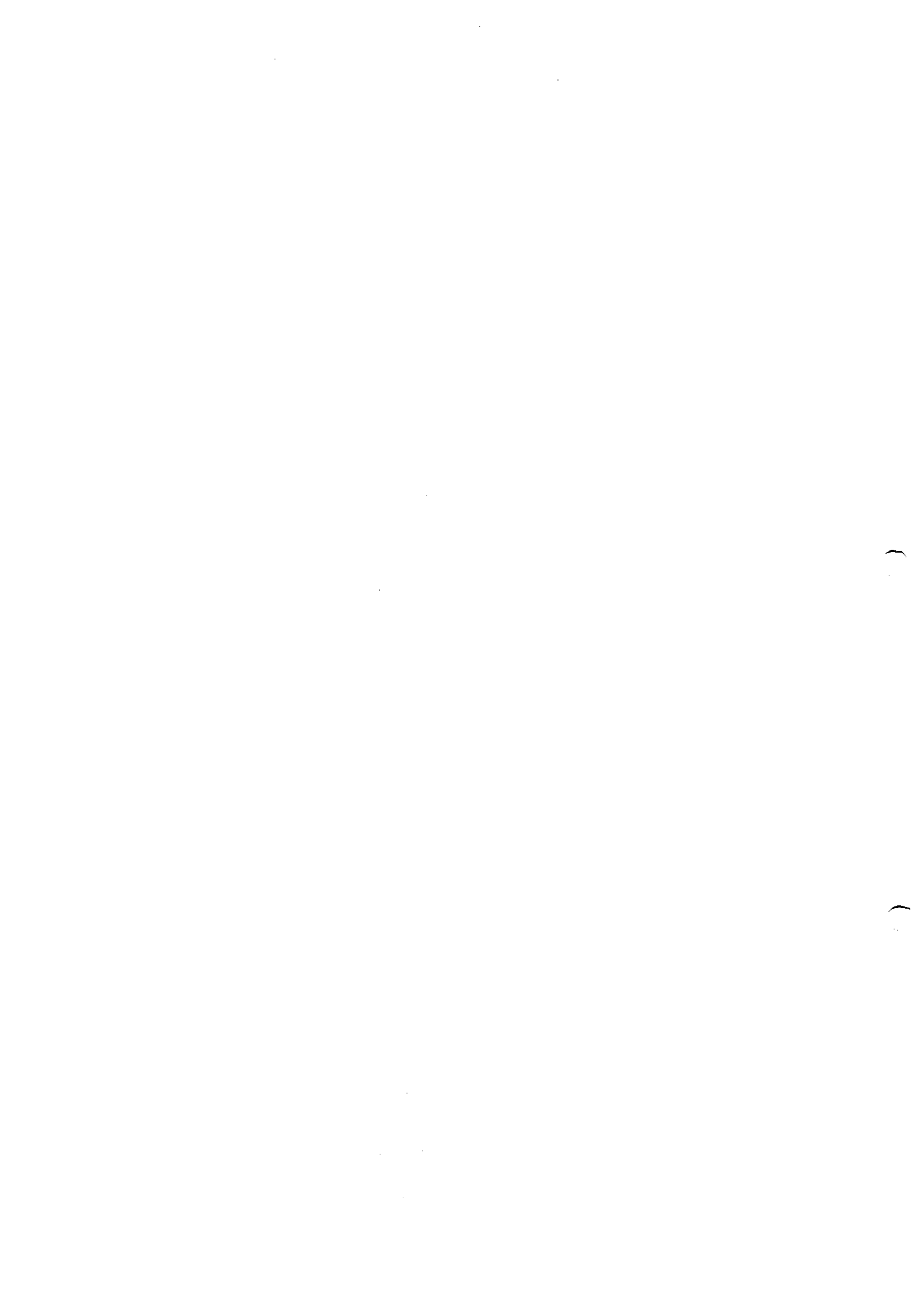
La prueba de inmunogenicidad se lleva a cabo en el momento de la liberación del producto final a granel y también se realiza una prueba de no reversibilidad en el momento de la liberación del PTxd purificado en solución. Se seleccionaron estas pruebas para el estudio de estabilidad con el

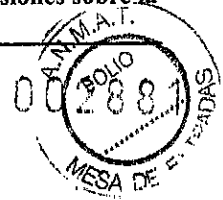




fin de evaluar la potencia y la estabilidad biológica del producto durante el almacenamiento. La prueba de inmunogenicidad se lleva a cabo a una concentración final de:

- Proteínas = 50 µg/mL
- Gel de aluminio = 0,6 g gel Al/mL.





2.3 Calendario de pruebas para el estudio de estabilidad

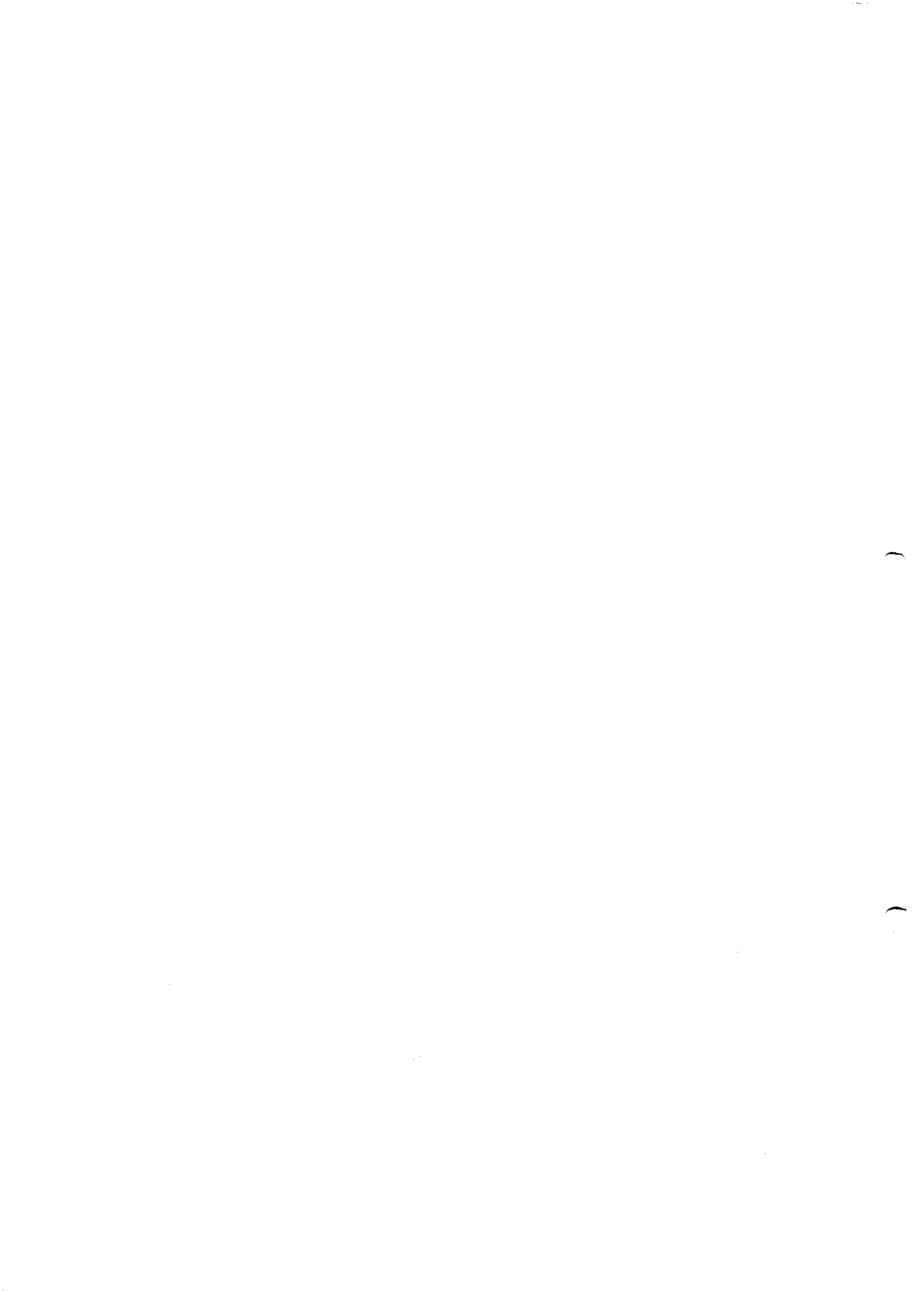
El calendario de las pruebas para condiciones a largo plazo ($+5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$) se presenta en la Tabla 4:

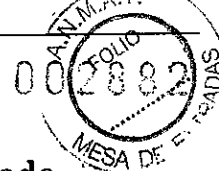
Tabla 4: Frecuencia de las pruebas para el estudio de estabilidad

Prueba	Condiciones de almacenamiento: $+5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$								
	Puntos de medición de la estabilidad (meses)								
	T0	3	6	9	12	18	24	36	48
Contenido de aluminio	X*	X	X	X	X	X	X	X	X
Medición de pH	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Identificación del toxoide pertúsico	X	NR†	NR	NR	NR	NR	NR	NR	X
Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica	X	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	X
Antigenicidad: toxoide pertúsico no adsorbido	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Inmunogenicidad del toxoide pertúsico en ratones	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Irreversibilidad del toxoide pertúsico	X	X	X	X	X	X	X	X	X

* la prueba se realiza en este momento de medición según el protocolo

† No realizada, según lo planeado en el protocolo del estudio





3 Resultados de los estudios de estabilidad del PTxd purificado adsorbido

A continuación se presenta un resumen sobre el estudio de estabilidad. Los resultados detallados se presentan en 3.2.S.7.3 Datos de estabilidad.

- **Parámetros fisicoquímicos y pureza**

Los resultados sobre las pruebas de contenido de aluminio y de identificación del toxoide pertúsico cumplen con los criterios de aceptación y permanecen estables durante 48 meses de almacenamiento a $+5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$.

Se observan algunas fluctuaciones en la medición de pH, con algunos resultados fuera de especificación en diferentes momentos de medición de manera aleatoria. Estos resultados se pueden explicar con el tampón utilizado para la elaboración (tampón de carbonato 0,1 HM con un pH 9,6), el cual es muy sensible a los intercambios de aire. Es probable que la agitación y la cámara de aire de los viales generen intercambios de aire que produzcan esta fluctuación del pH. Los matraces se analizaron de manera aleatoria en diferentes momentos de medición. Pueden existir resultados fuera de especificación o resultados diferentes para los mismos momentos o para los siguientes momentos: repeticiones de las pruebas que cumplen, repeticiones de las pruebas fuera de especificación, siguientes puntos de medición que cumplen.

Se llevó a cabo una investigación para encontrar medidas correctivas con el fin de evitar estos resultados y limitar los intercambios de aire. Antes de medir el pH, el laboratorio de control de calidad ya no agita la muestra del granel que se analizará. La homogeneización necesaria para las otras pruebas se lleva a cabo después de la medición del pH. Esta medida correctiva se aplica desde abril de 2003.

Además, en la producción se ha decidido reducir lo más posible la cámara de aire del vial de vidrio.

Se generó un incumplimiento general para explicar esto y se llegó a la conclusión de que estos resultados son aceptables y que no tienen efecto sobre la calidad del producto.

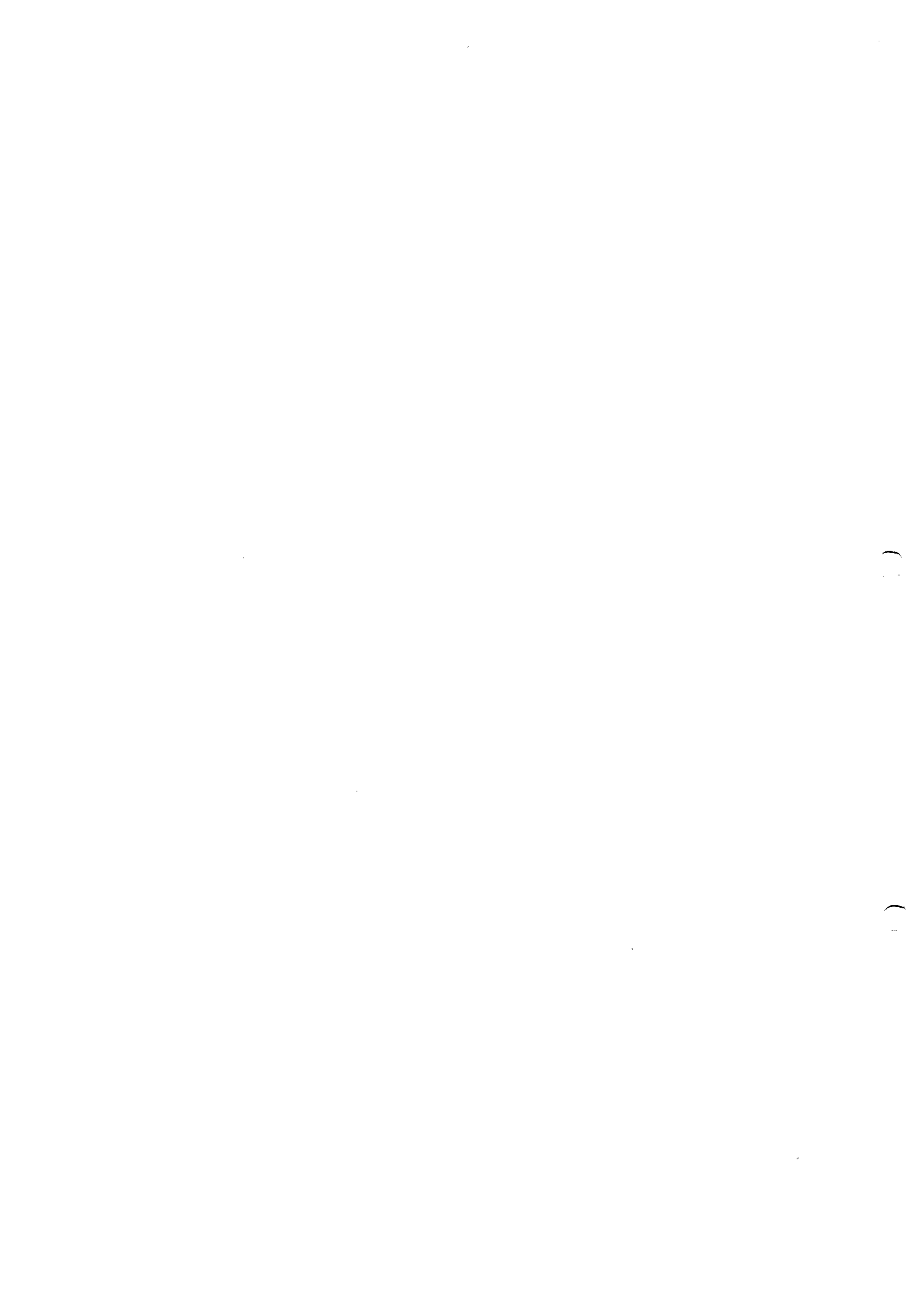
El análisis estadístico reveló un aumento significativo en la medición del pH sólo para el lote FA109873 cuando la vacuna se almacena durante 48 meses a $+5\text{ °C}$. Este aumento se puede explicar mediante las fluctuaciones de la medición y no se considera significativo.

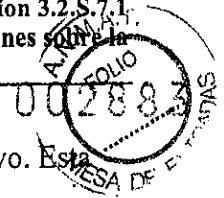
- **Actividad**

Los resultados de la prueba de no reversibilidad cumplen con los criterios de aceptación de 48 meses de almacenamiento a $+5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$.

La adsorción del toxoide pertúsico no se altera durante 48 meses a $+5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$. El resultado obtenido para el lote FA109870 durante 36 meses a $+5\text{ °C}$ ($7\text{ }\mu\text{g/mL}$) se incluye en la variabilidad del método.

El análisis estadístico revela un importante aumento en la inmunogenicidad contra el toxoide pertúsico en ratones. Sin embargo, los resultados siguen cumpliendo y se encuentran dentro del intervalo de comparación. Los resultados del granel de toxoide pertúsico se consideran aceptables.





Los resultados observados se pueden explicar mediante la variabilidad del método in vivo. Esta tendencia se considera no significativa.

Se informó la existencia de tres pruebas no válidas (respuesta en ratones < 80 %) para la inmunogenicidad contra el toxoide pertúsico en ratones para el lote FA109870 a los tres y nueve meses, y para el lote FA109874 a los tres meses. No se han repetido las pruebas debido a la proximidad de los siguientes puntos de medición, los cuales cumplen con los criterios de aceptación.

Los parámetros de actividad se mantienen durante 48 meses a $+ 5^{\circ} \text{C} \pm 3^{\circ} \text{C}$.

- **Seguridad**

El producto permanece estéril después del almacenamiento a $+ 5^{\circ} \text{C} \pm 3^{\circ} \text{C}$ durante 48 meses.

- **Conclusión**

Los resultados permiten llegar a la conclusión de que el PTxd purificado adsorbido es estable durante 48 meses cuando se almacena a $+ 5^{\circ} \text{C} \pm 3^{\circ} \text{C}$ en viales de vidrio. Sin embargo, la cámara de aire del vial se debe reducir lo más posible para evitar la variación del pH.

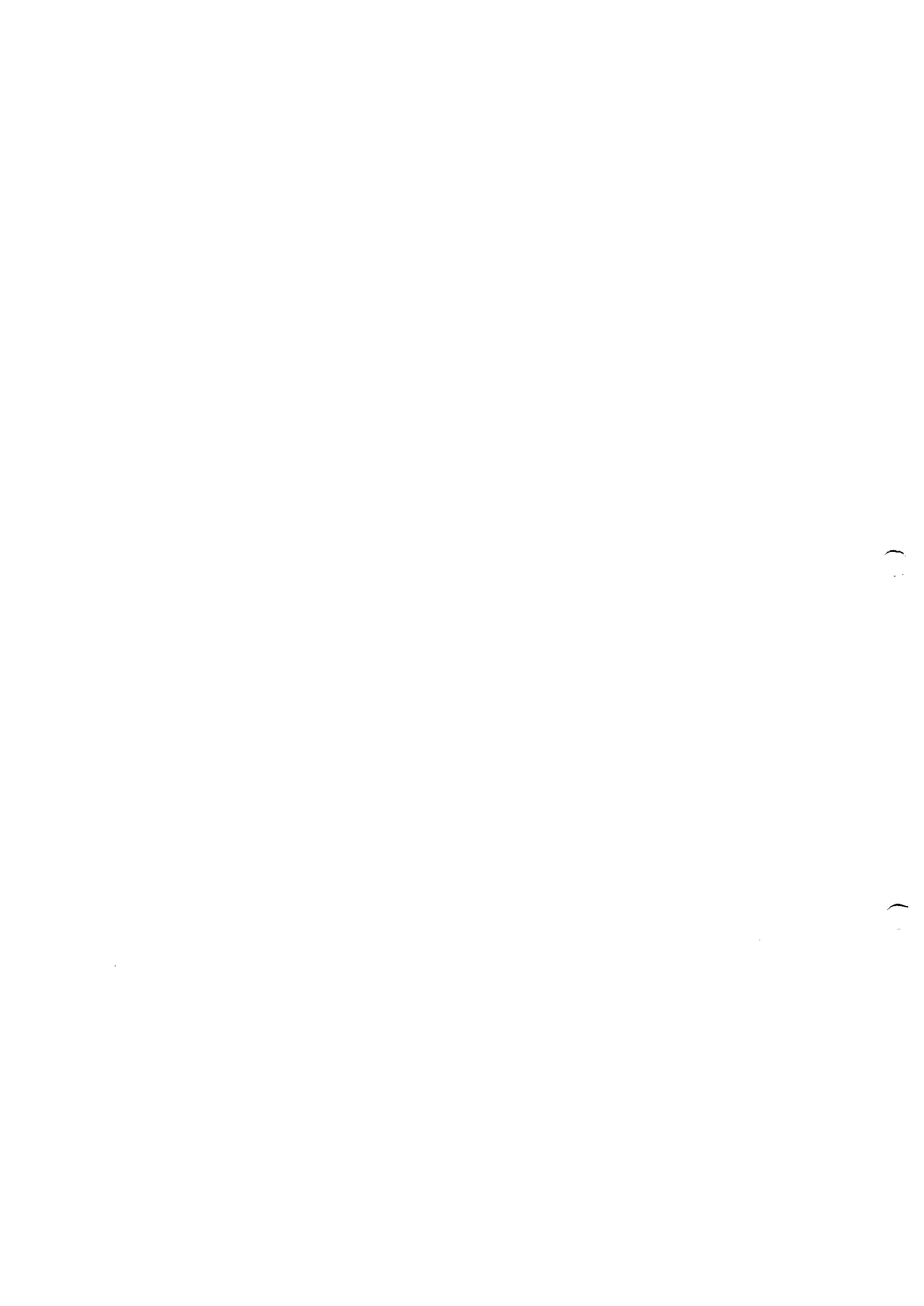
4 Conclusión

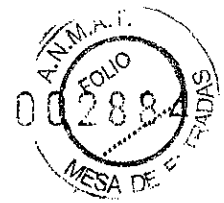
Con base en los resultados obtenidos en condiciones normales, se puede establecer una vida útil de 48 meses para el PTxd purificado adsorbido almacenado en viales de vidrio.

Las condiciones de almacenamiento se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5: Resumen de las condiciones de almacenamiento


Producto almacenado	Envase y sello del cierre	Vida útil	Condiciones de almacenamiento
PTxd purificado adsorbido	Matraces de vidrio de 10 litros y de 1 litro (tipo I) sellados con tapones de polipropileno	48 meses	$+5^{\circ} \text{C} \pm 3^{\circ} \text{C}$




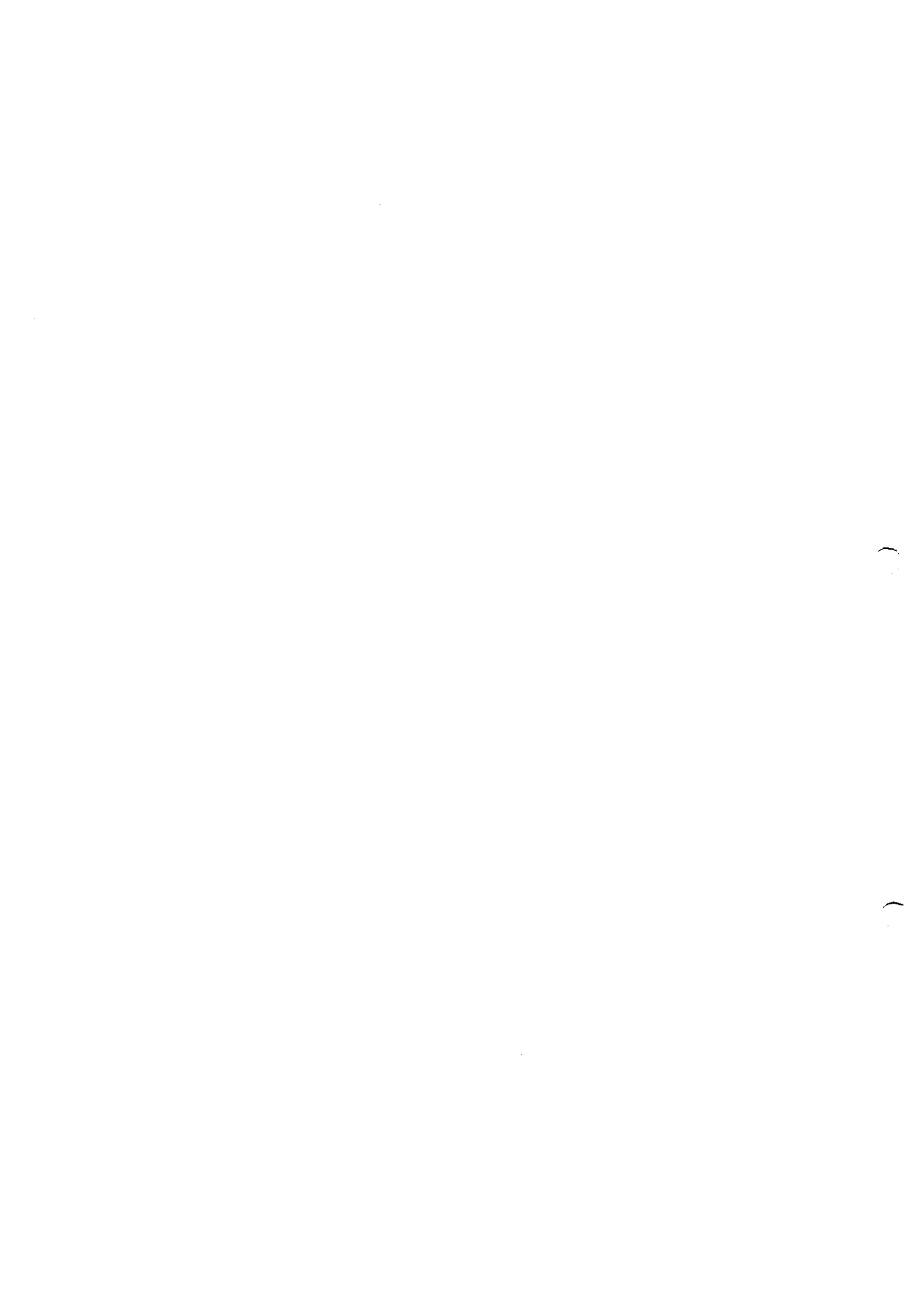


3.2.S.7.2

Protocolo de Estabilidad Posterior a la Aprobación y Compromiso de Estabilidad - PTxd


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DOMINGUEZ
GERENTE
SANOFI PASTEUR S.A.

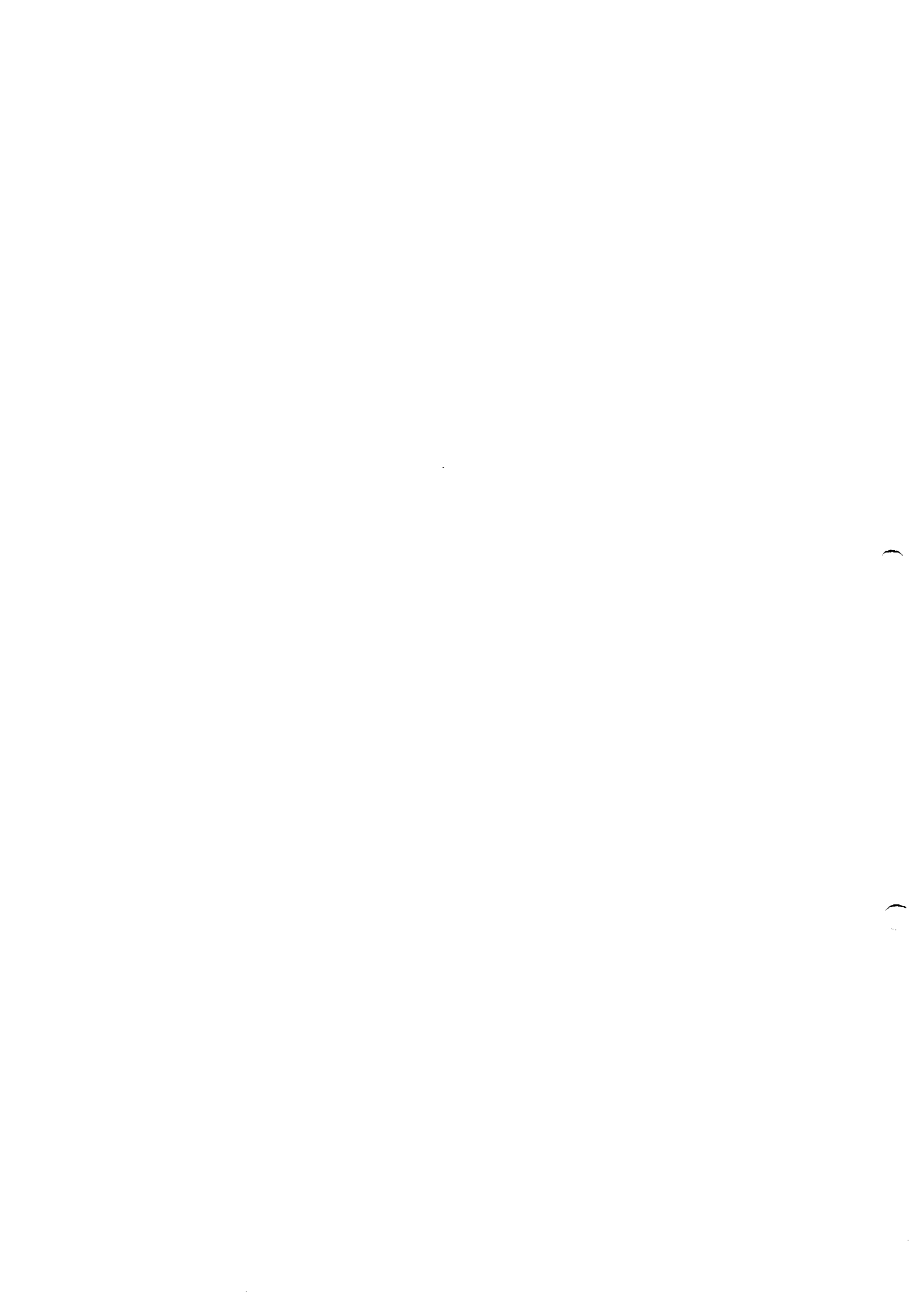




Sección 3.2.S.7.2 Protocolo de estabilidad y compromiso de estabilidad después de la aprobación

Lista de abreviaturas: vea 2.3 Resumen general de calidad, Introducción.

Los resultados de los estudios de estabilidad descritos en 3.2.S.7.1: Resumen y conclusiones de estabilidad y en 3.2.S.7.3: Datos de estabilidad confirman la vida útil del PTxd purificado adsorbido. Como los estudios se han completado, no se proponen estudios después de la aprobación.




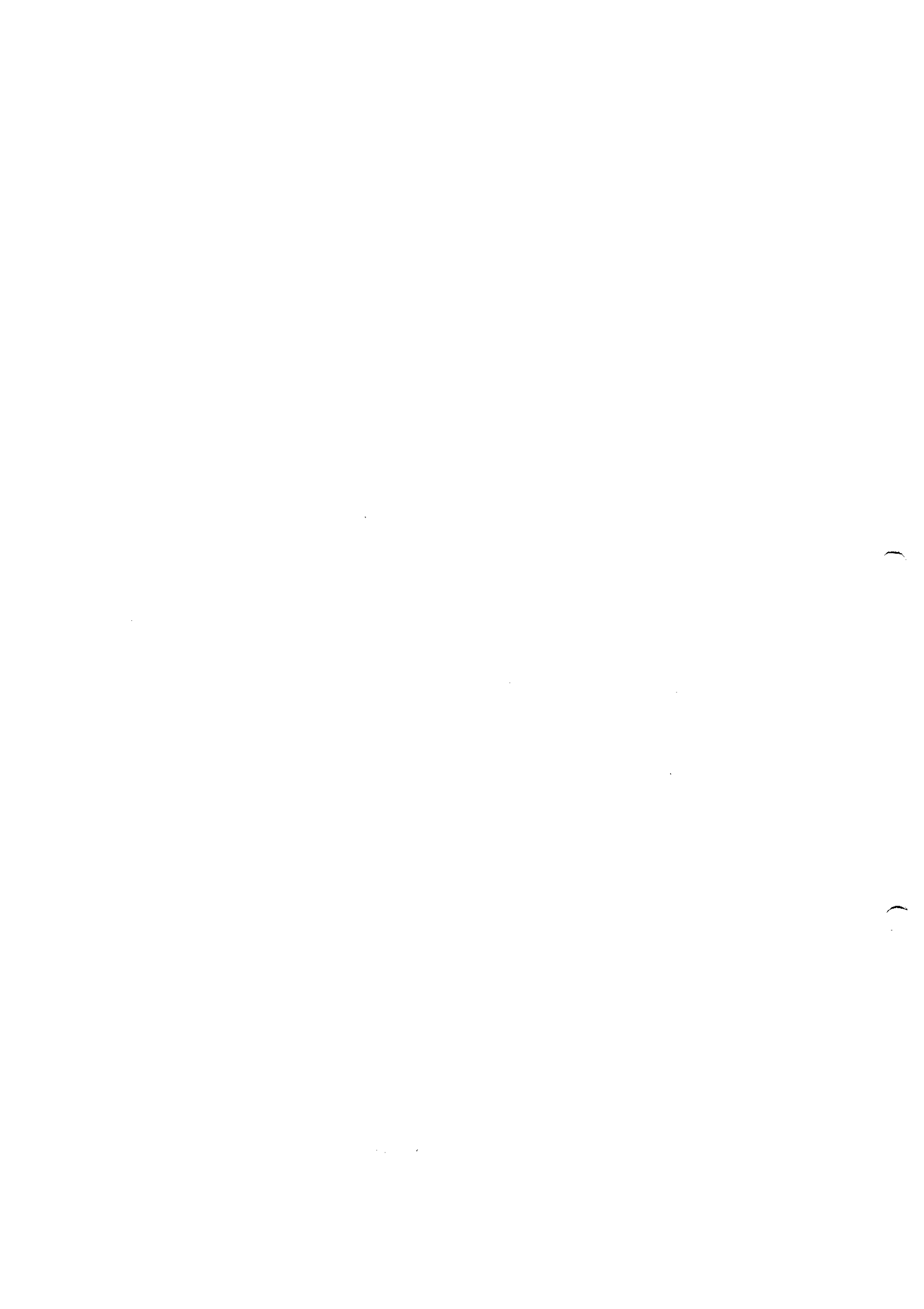


3.2.S.7.3

Datos de Estabilidad - PTxd


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANGRE PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DOMINGUEZ
GERENTE
SANGRE PASTEUR S.A.



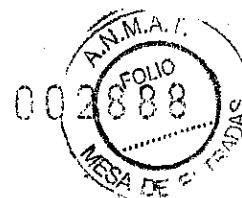


Sección 3.2.S.7.3 Datos de estabilidad

Índice

1	Procedimientos analíticos	3
1.1	Inmunogenicidad contra la tos ferina en ratones	3
1.1.1	Principio.....	3
1.1.2	Muestras.....	4
1.1.3	Procedimiento	4
1.1.4	Validez: criterios de conformidad	5
2	Resultados del toxoide pertúsico purificado adsorbido.....	6





Lista de tablas

Tabla 1: Métodos de prueba utilizados para los estudios de estabilidad del PTxd purificado adsorbido3

Tabla 2: Resultados del estudio de estabilidad del lote FA109869 de PTxd purificado adsorbido a + 5 °C ± 3 °C7

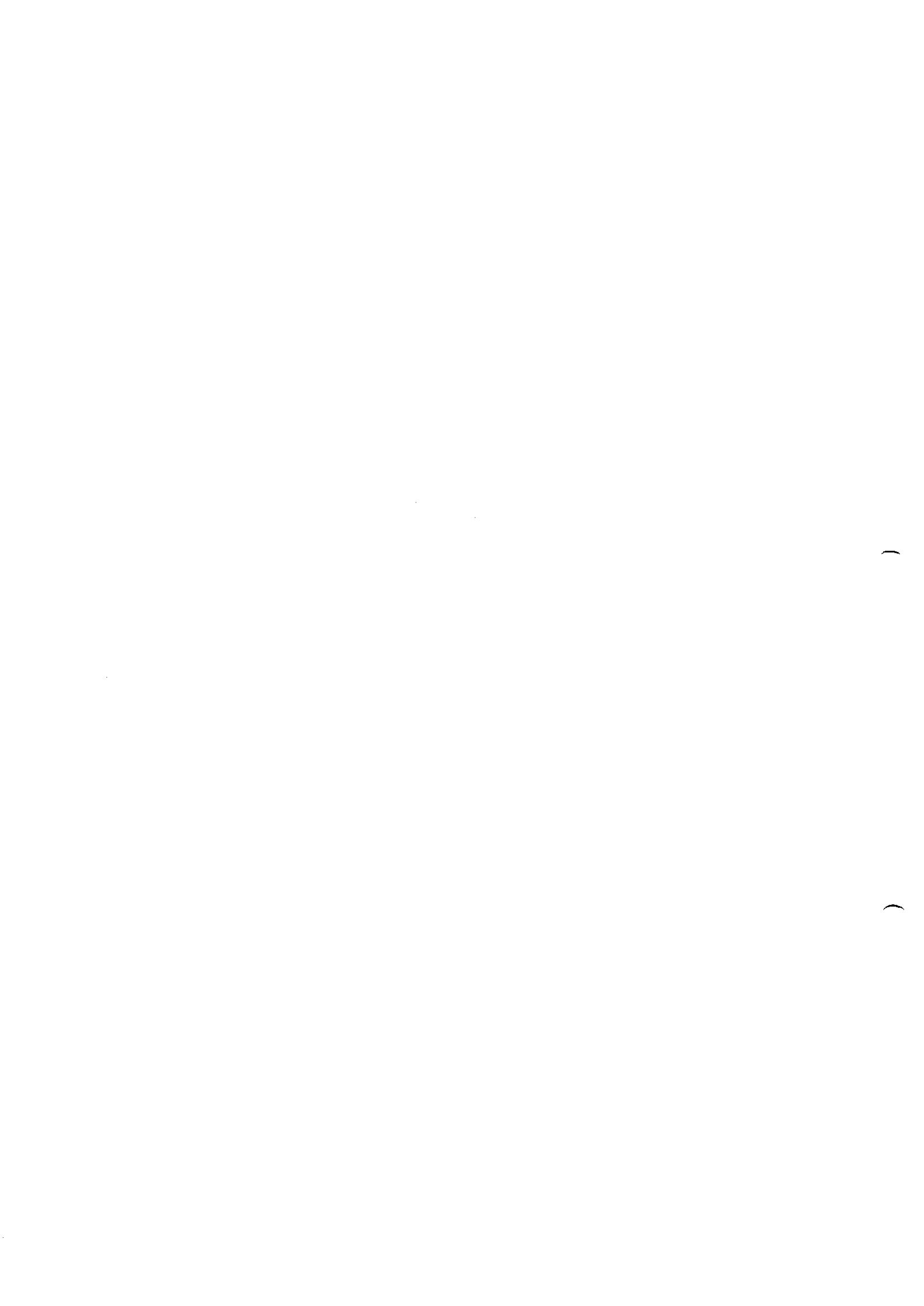
Tabla 3: Resultados del estudio de estabilidad del lote FA109870 de PTxd purificado adsorbido a + 5 °C ± 3 °C8

Tabla 4: Resultados del estudio de estabilidad del lote FA109871 de PTxd purificado adsorbido a + 5 °C ± 3 °C9

Tabla 5: Resultados del estudio de estabilidad del lote FA109872 de PTxd purificado adsorbido a + 5 °C ± 3 °C10

Tabla 6: Resultados del estudio de estabilidad del lote FA109873 de PTxd purificado adsorbido a + 5 °C ± 3 °C11

Tabla 7: Resultados del estudio de estabilidad del lote FA109874 de PTxd purificado adsorbido a + 5 °C ± 3 °C12



Lista de abreviaturas: vea 2.3 Resumen general de calidad, Introducción:



1 Procedimientos analíticos

La tabla 1 proporciona la lista de procedimientos analíticos utilizados para los estudios de estabilidad del principio activo toxoide pertúsico purificado adsorbido (PTxd).

Tabla 1: Métodos de prueba utilizados para los estudios de estabilidad del PTxd purificado adsorbido

Prueba	Referencia	Criterios de aceptación
Contenido de aluminio	Ph. Eur. 2.5.13, edición actual	0,6 a 1,4 mg Al/mg de proteínas
Medición de pH	Ph. Eur. 2.2.3, edición actual	6,2 a 8,2
Identificación del toxoide pertúsico	Ph. Eur. 2.7.1, edición actual	Positivo
Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica	Ph. Eur. 2.6.1, edición actual	No se observa crecimiento microbiano
Antigenicidad: toxoide pertúsico no adsorbido	Ph. Eur. 2.7.1, edición actual	Para información (µg/mL)
Inmunogenicidad contra el toxoide pertúsico en ratones	Ph. Eur. 1356, edición actual	El promedio del título anti-PT se incluye en el intervalo de tolerancia estadístico [256 – 1929]
Irreversibilidad del toxoide pertúsico	Ph. Eur. 1356, edición actual	≥95 % de vida

Los métodos analíticos y los criterios de aceptación son idénticos a los aplicados a la liberación de los intermedios o del principio activo y se describen respectivamente en las secciones 3.2.S.2.4 Pasos críticos e intermedios y 3.2.S.4.2 Procedimientos analíticos, excepto para la inmunogenicidad contra tos ferina en ratones.

1.1 Inmunogenicidad contra la tos ferina en ratones

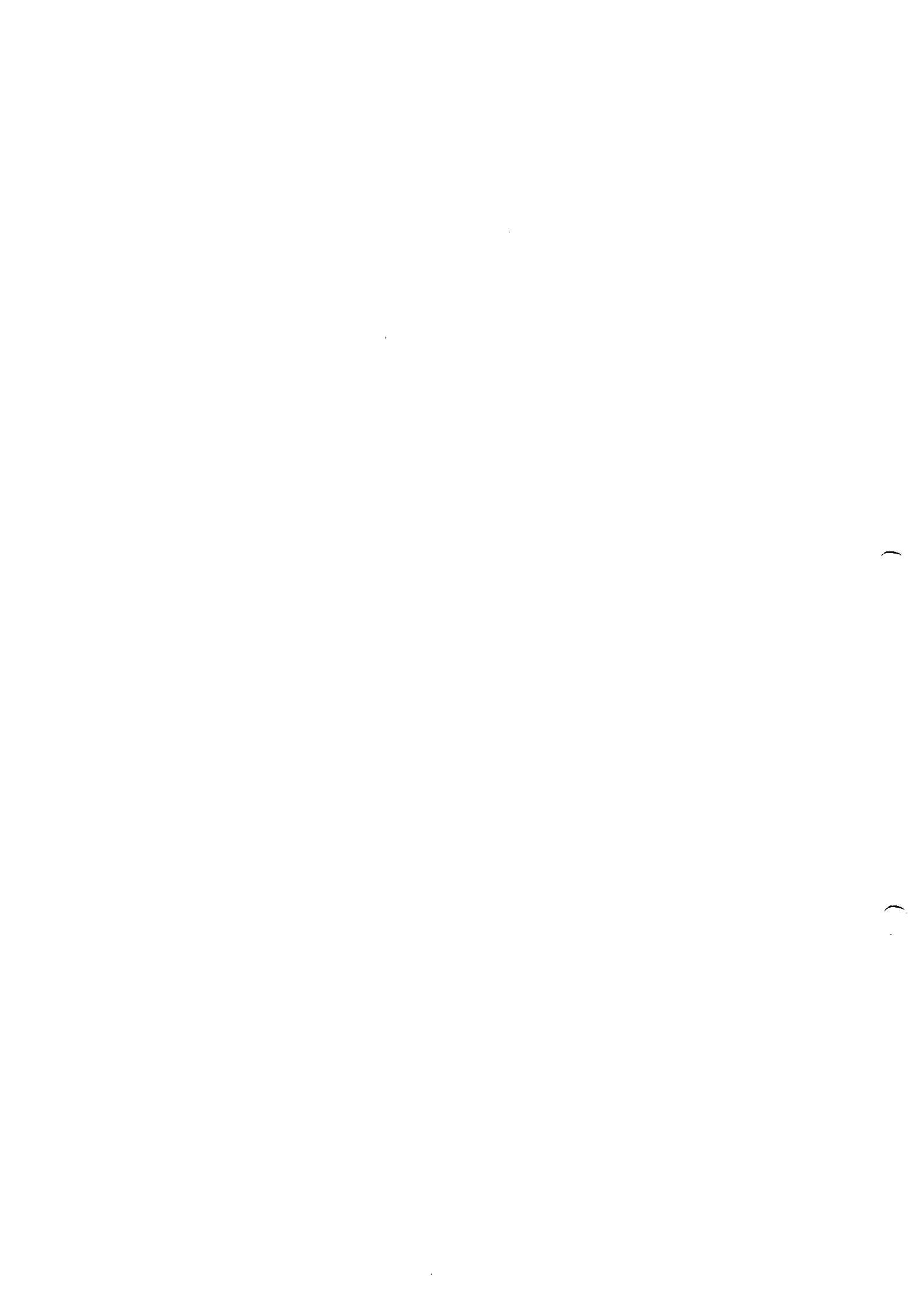
Esta prueba se realiza de acuerdo con la monografía n.º 1356 de la Ph. Eur. "*Pertussis vaccine - acellular, component, adsorbed*".

La prueba de inmunogenicidad contra la tos ferina se resume a continuación.

Esta prueba se realiza para evaluar la respuesta de anticuerpos contra la toxina pertúsica (PT) y contra la FHA tras la inmunización de ratones con una vacuna contra la tos ferina, acelular, de dos componentes. Cuatro semanas después de la inmunización con 1/5 de una dosis humana, se les extrae sangre a los ratones y se titulan los anticuerpos contra PT y FHA mediante el método de ELISA.

1.1.1 Principio

La prueba se divide en tres etapas:





- Inmunización de los ratones por vía intraperitoneal con 1/5 de una dosis humana diluida en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Cuatro semanas después, se les extrae sangre a los ratones y el suero de estos se almacena antes de analizarlo.
- Se realiza la titulación de los anticuerpos contra la toxina antipertúsica (anti-PT) presente en el suero de ratón según lo establecido en la Ph. Eur. 2.7.1 (Métodos inmunoquímicos) y en la Ph. Eur. 5.3.1.1 (Método estadístico).
- Se realiza la titulación de los anticuerpos anti-FHA presentes en el suero de ratón conforme a lo establecido en la Ph. Eur. 2.7.1 (Métodos inmunoquímicos) y en la Ph. Eur. 5.3.1.1 (Método estadístico).

El método de ELISA implica la reacción entre los anticuerpos del suero de ratón y el antígeno contra la toxina pertúsica o el antígeno contra FHA que recubre los pocillos de microtitulación. La cantidad de anticuerpos ligados se determina mediante una reacción posterior de IgG antirratón conjugada con fosfatasa alcalina, seguida de una reacción cromogénica con sustrato de fosfatasa alcalina. La intensidad del color desarrollado es proporcional a la concentración de los anticuerpos.

1.1.2 Muestras

Etapa de inmunización

- Vacuna de referencia: 0,5 mL de la vacuna de referencia diluida 1/5 en tampón de PBS.
- Grupo de control negativo (PBS): 0,5 mL de tampón de PBS.
- Grupos de prueba: 1/5 de una dosis humana diluida en tampón de PBS.

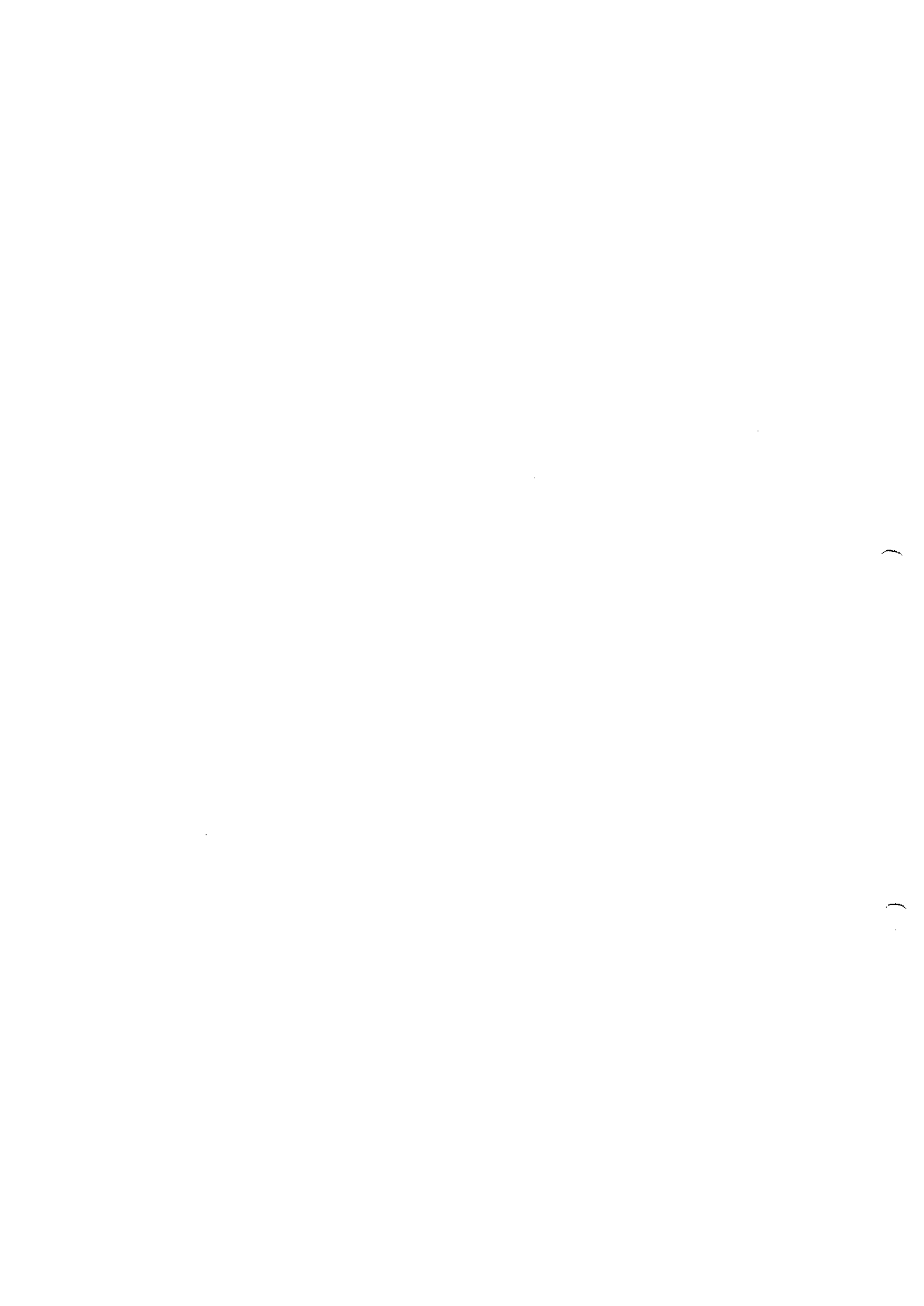
Titulación mediante ELISA

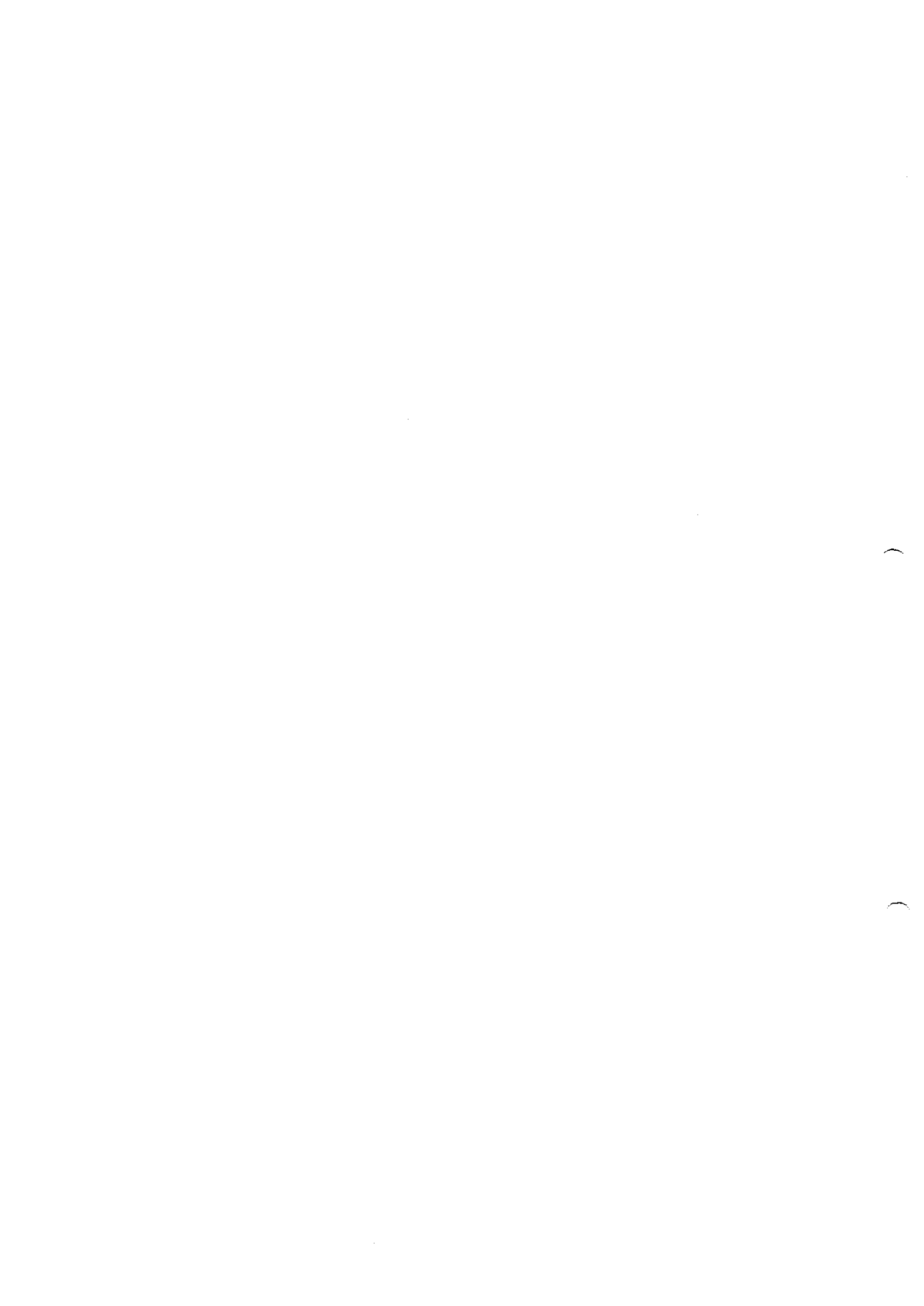
- Estándar de calibración (estándar de antisuero de ratón).
- Control positivo interno: antisueros de ratón agrupados (anticuerpos anti-PT y anti-FHA).
- Sueros de ratones individuales de la vacuna de referencia.
- Sueros de ratones individuales del grupo de control negativo.
- Sueros de ratones individuales de los grupos de prueba.

1.1.3 Procedimiento

Después de la reacción cromogénica con sustrato de fosfatasa alcalina, se registra la absorbancia de cada pocillo a 405 nm y a 620 nm. La absorbancia de la curva del antisuero de ratón de referencia se grafica como función de la concentración anti-PT (o de la concentración anti-FHA) usando un programa de regresión lineal/logarítmica.

Los valores de absorbancia y las diluciones correspondientes de las muestras se ingresan para que el programa calcule automáticamente las concentraciones.







2 Resultados del toxoide pertúsico purificado adsorbido

Los datos de estabilidad de seis lotes de PTxd purificado adsorbido se presentan de la tabla 2 a la tabla 7.



sanofi pasteur
Vacuna contra la tos ferina, acelular, de dos componentes (FHA-PTxd)

Tabla 2: Resultados del estudio de estabilidad del lote FA109869 de PTxd purificado adsorbido a + 5 °C ± 3 °C

Prueba	Criterios de aceptación	T0	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses	18 meses	24 meses	36 meses	48 meses
Contenido de aluminio	De 0,6 a 1,4 mg Al/mg de proteínas	1,05	0,99 A los 4 meses	1,07	1,05	1,04	1,19	1,11	1,08	1,04
Medición de pH	De 6,2 a 8,2	6,7	6,9 A los 4 meses	8,5 sin agitación Proximidad de no repetición de prueba de nueve meses	7,1	8,6 ----- 6,9 ----- 8,6	6,8	7,1	7,5	7,1
Identificación del toxoide pertúsico	Positivo	Positivo	NR*	NR	NR	NR	NR	NR	NR	Positivo
Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica	No se observa crecimiento microbiano	Cumple	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	Cumple
Antigenicidad: toxoide pertúsico no adsorbido	Para información (µg/mL)	<2,5	<2,5 A los 4 meses	<2,5	<2,5 A los 10 meses	<2,5 A los 14 meses	<2,5	<2,5	<2,5 A los 38 meses	<2,5
Immunogenicidad contra el toxoide pertúsico en ratones	[256-1929] UE/mL muestras	1039	1070	921	885	621	963	980	961	1784
Límite inferior		844	800	620	295	442	579	590	706	1256
Límite superior		1280	1430 A los 4 meses	1368	2657	873	1602	1629	1309 A los 37 meses	2532 A los 49 meses
Inversibilidad del toxoide pertúsico	≥95 % de vida	Cumple	Cumple A los 4 meses	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple A los 49 meses



* NR: No realizado tal como se planificó en el protocolo de estabilidad

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

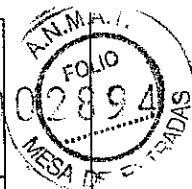


sanofi pasteur
Vacuna contra la tos ferina, acellular, de dos componentes (FHA-PTxd)

Tabla 3: Resultados del estudio de estabilidad del lote FA109870 de PTxd purificado adsorbido a + 5 °C ± 3 °C

Prueba	Criterios de aceptación	T0	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses	18 meses	24 meses	36 meses	48 meses
Contenido de aluminio	De 0,6 a 1,4 mg Al/mg de proteínas	1,05	1,03	1,09	1,03	0,98	1,09	1,03	1,03	1,13
Medición de pH	De 6,2 a 8,2	7,0	7,5	6,9	7,1	7,1	8,5 6,9 6,9	6,9	7,1	8,6 Prueba 2: 7,1 Prueba 3: 8,6
Identificación del toxoide pertúsico	Positivo	Positivo	NR*	NR	NR	NR	NR	NR	NR	Positivo
Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica	No se observa crecimiento microbiano	Cumple	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	Cumple
Antigenicidad: toxoide pertúsico no adsorbido	Para información (µg/mL)	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	7 A los 37 meses	<2,5
Immunogenicidad contra el toxoide pertúsico en ratones	[256-1929] UE/mL muestras	578	No válida	997	No válida	575	1003	743	781	1310
Límite inferior		426	/	547	/	322	559	405	516	1041
Límite superior		785	/	1816	/	1027	1801	1364	1181 A los 37 meses	1647
Irreversibilidad del toxoide pertúsico	≥95 % de vida	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple A los 49 meses

* NR: No realizado tal como se planificó en el protocolo de estabilidad



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

