

2 Farmacodinamia primaria

Tabla 1: Potencia diftérica en cobayos

Tipo de estudio	Especies/cepa	Artículo de prueba	Calendario de administración	Dosis	Resultados o hallazgos destacables	Artículo de prueba: Hexaxim	
						Ubicación	Sección
Potencia diftérica	Cobayos Dunkin-Hartley	IND09014 FDV01398 FDV01416 FDV01420	D0: Inmunización D28: Desafío con toxina diftérica D30: Observación de los lugares de inyección de la toxina diftérica	1,0 mL, cada grupo recibe una de las cuatro diluciones	El criterio de aceptación basado en la evaluación estadística de la respuesta inmunitaria es que la actividad no debe ser inferior a 30 UI por cada dosis humana única de 0,5 mL y que el límite inferior de confianza ($p = 0,95$) no debe ser inferior a 20 UI de toxoide diftérico por dosis, en comparación con el estándar de referencia de la difteria. Todos los lotes cumplían este criterio.	3.2.P.5.2 Procedimientos analíticos	

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.

RED_00059252

Información confidencial/propietaria
Página 4 de 14





Tipo de estudio	Especies/cepa Sexo y Número/Grupo	Artículo de prueba Artículo de control	Calendario de administración Vía de administración	Dosis Dosis desafío	Resultados o hallazgos destacables		Ubicación	
					Lote de producto final a granel	Potencia estimada UI/ml	Sección	Comentarios
	Hembras o machos 8 animales/grupo inmunizado (1 grupo por dilución por vacuna) 5 animales/grupo de control no inmunizado	Referencia internacional que es una vacuna antidiférica adsorbida (EDQM)	Subcutáneo/a	Subcutáneo/a Desde 0,0512 Lf/ 0,2 mL hasta 0,00005 Lf/ 0,2 mL para los grupos inmunizados Desde 80, 10 ⁻⁶ Lf/ 0,2 mL hasta 5, 10 ⁻⁶ Lf/ 0,2 mL para los animales de control	IND09014	41 (28-58)		
					FDV01398	42 (34-52)		
					FDV01416	57 (43-82)		
					FDV01420	76 (57-113)		

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANO FI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANO FI PASTEUR S.A.

RED_00059252

Información confidencial/proprietaria
Página 5 de 14





Tabla 2: Potencia tetánica en ratones

Artículo de prueba: Hexaxim						
Tipo de estudio	Especies/cepa	Artículo de prueba	Calendario de administración	Dosis	Resultados o hallazgos destacables	Ubicación
						Sección
Potencia tetánica	Ratones OFI	IND09014 FDV01398 FDV01416 FDV01420	D0: Inmunización D28: Desafío con toxina tetánica D28-D32: Observación de los animales	0,5 mL, cada grupo recibe una de las siguientes diluciones: 10 UI/mL, 5 UI/mL, 2,5 UI/mL y 1,25 UI/mL.	El límite inferior de confianza (P = 0,95) no debe ser inferior a 40 UI de toxoide tetánico por dosis, en comparación con el estándar de referencia del tétanos. Todos los lotes cumplen este criterio.	3.2.P.5.2 Procedimientos analíticos
	Sexo y Número/Grupo	Artículo de control	Vía de administración	Dosis desafío	Lote de producto final a granel	Potencia estimada UI/dosis
	Hembras 16 animales/grupo inmunizado (1 grupo por dilución por vacuna) 5 animales/grupo de control no inmunizado	Referencia internacional que es una vacuna antitetánica adsorbida (EDQM)	Subcutáneo/a	Subcutáneo/a Toxina tetánica 50 dosis paraizantes 50 (50PD50)	IND09014 FDV01398 FDV01416 FDV01420	893 (584-1243) 556 (280-853) 584 (413-795) 705 (784-1017)

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.

RED_00059252

Información confidencial/propietaria
Página 6 de 14

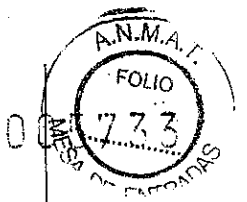




Tabla 3: Inmunogenicidad contra tos ferina en ratones

Tipo de estudio	Especies/cepa	Artículo de prueba	Calendario de administración	Dosis	Resultados o hallazgos destacables	Ubicación	
						Sección	
Inmunogenicidad contra <i>B. pertussis</i>	Ratones Swiss	IND09014 FDV01398 FDV01416 FDV01420	D0: Inmunización D28: Recolección de sueros para titulación de anticuerpos por ELISA	0,5 mL, cada grupo recibe 5 µg de PTxd y FHA (1/5 de la dosis humana)	Los títulos de anticuerpos anti-PTxd y anti-FHA inducidos por la vacuna de prueba no son significativamente inferiores al 5 % de los de la vacuna de referencia.	3.2.P.5.2 Procedimientos analíticos	
	Sexo y Número/Grupo Hembras 10 animales/grupo inmunizado (1 grupo por dilución por vacuna) 10 animales/grupo de control no inmunizado	Artículo de control Lote de Hexaxim	Vía de administración Intraperitoneal	Dosis desafío No se aplica	Lote de producto final a granel IND09014 FDV01398 FDV01416 FDV01420	Potencia PTxd FHA Conforme Conforme Conforme Conforme	Comentarios

ROKANA MONTEMLONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.

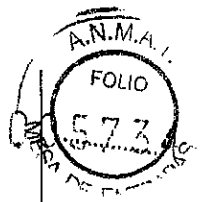




Tabla 4: Actividad de la vacuna contra tos ferina sobre el desafío bacteriano en ratones

Tipo de estudio		Especies/cepa	Artículo de prueba	Calendario de administración	Dosis	Resultados o hallazgos destacables	Ubicación	
							Sección	
Actividad de la vacuna contra la tos ferina sobre el desafío bacteriano		Ratones Balb/c	Lotes clínicos de fase III: S4312 S4313 S4314	D-22: Inmunización D-8: Inmunización D0: Desafío D0, D5, D8 y D12: Extracción de muestras pulmonares y recuento de UFC	0,125 mL, cada grupo recibe ¼ de la dosis humana de las vacunas	Entre el D0 y el D5 después del desafío, los recuentos de UFC (unidades formadoras de colonias) en los pulmones han mostrado un ligero descenso en los tres grupos de vacuna comparados con los ratones no inmunizados. Las UFC en los pulmones disminuyeron aún más entre D5 y D8 y se habían reducido drásticamente en alrededor de cuatro veces entre D8 y D12. No hubo diferencias significativas entre las vacunas de prueba y la vacuna de referencia. Además, este estudio en animales ha mostrado que los tres lotes de Hexaxim eran concordantes entre sí.	N/A*	
		Sexo y Número/Grupo Hembras 20 animales/grupo inmunizado 20 animales/grupo de control no inmunizado	Artículo de control Tetravac/Tetaxim (sanofi pasteur)	Vía de administración Subcutáneo/a	Dosis desafío Intranasal Dosis para desafío dependiente de la cepa bacteriana (i. e., 5,10 ⁵ bacterias para la cepa bacteriana 18 323 por cada 50 µL)		Comentarios	

* Únicamente para fines de caracterización.

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.

RED_00059252

Información confidencial/proprietaria
Página 8 de 14



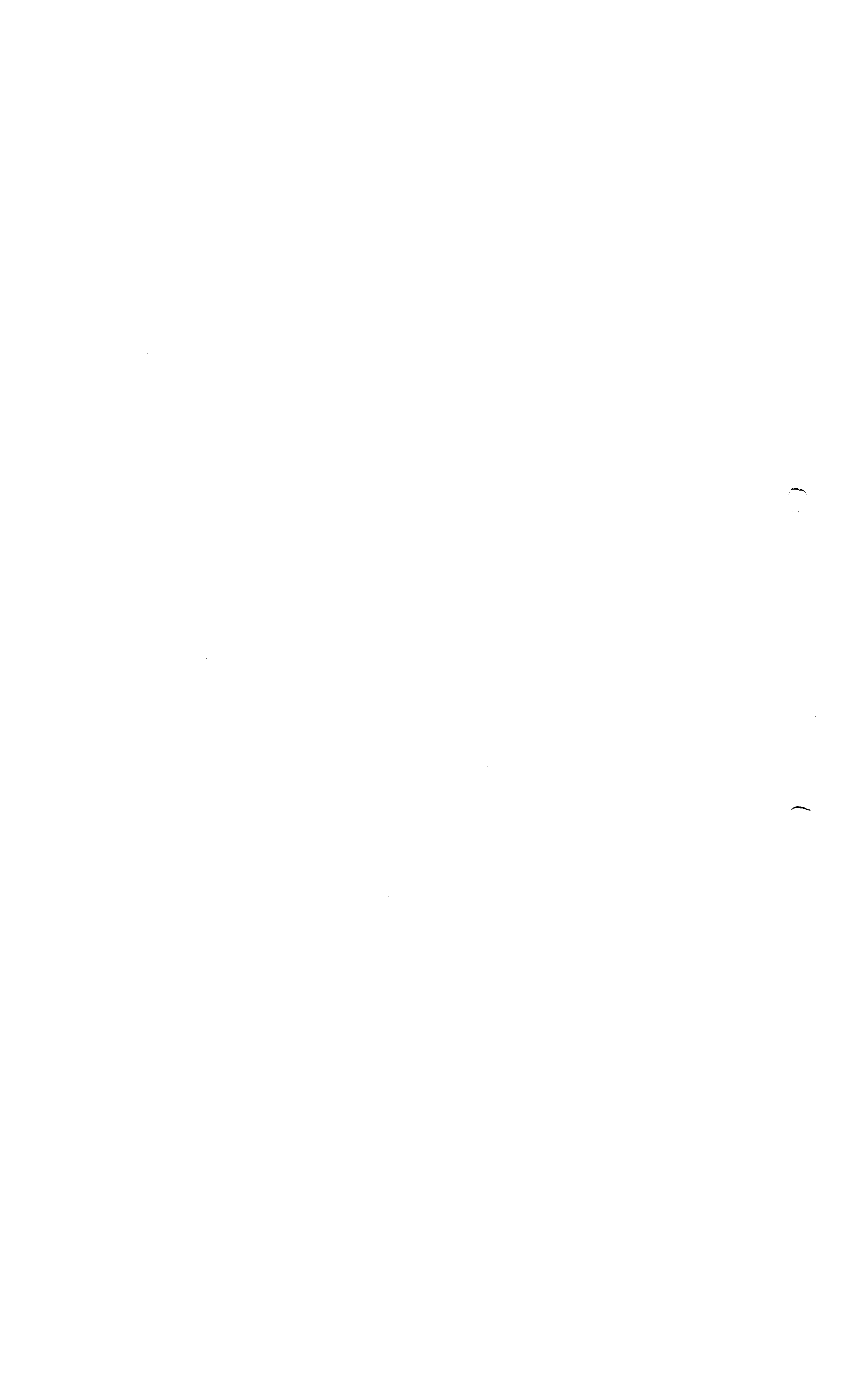


Tabla 5: Inmunogenicidad contra poliomielitis en ratas

Tipo de estudio	Especies/cepa	Artículo de prueba	Calendario de administración	Dosis	Artículo de prueba: Hexaxim		Comentarios
					Resultados o hallazgos destacables	Ubicación	
Inmunogenicidad contra la poliomielitis	Ratas Wistar	IND09014 FDV01398 FDV01416 FDV01420	D0: Inmunización D21: Recolección de sueros para titulación de anticuerpos neutralizantes.	0,5 mL, cada grupo recibe una de las siguientes diluciones: 2 dosis humanas y dilución doble en serie de HD a 1/16 HD.	No se consideró que la potencia de la IPV en unidades de protección/dosis fuera significativamente inferior que la de la vacuna de referencia.	3.2.P.8.3 Datos de estabilidad	
	Sexo y Número/Grupo	Artículo de control	Vía de administración	Dosis desafío	Lote de producto final a granel	Potencia relativa estimada	
	Hembras 10 animales/grupo inmunizado (1 grupo por dilución por vacuna) 5 animales/grupo de control no inmunizado	Pediaceel	Intramuscular	No se aplica	IND09014	Tipo 1: 1,3 Tipo 2: 0,9 Tipo 3: 1,2	
					FDV01398	Tipo 1: 0,7 Tipo 2: 0,6 Tipo 3: 1,9	
					FDV01416	Tipo 1: 0,5 Tipo 2: 0,5 Tipo 3: 1,6	
					FDV01420	Tipo 1: 0,6 Tipo 2: 1,2 Tipo 3: 3,1	

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.

RED_00059252

Información confidencial/propietaria
Página 9 de 14

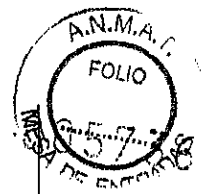




Tabla 6: Inmunogenicidad contra *Haemophilus* en ratones

Tipo de estudio	Especies/cepa	Artículo de prueba	Calendario de administración	Dosis	Artículo de prueba: Hexaxim	
					Resultados o hallazgos destacables	Ubicación
Inmunogenicidad contra <i>Haemophilus</i>	Ratones OF1	IND09014 FDV01398 FDV01416 FDV01420	D0-D14: Inmunizaciones D21: Recolección de sueros para titulación de anticuerpos por ELISA	0,5 ml., cada grupo recibe ¼ de la vacuna de prueba y la vacuna de referencia.	No menos de la mitad de los ratones vacunados presentan una titulación no inferior a cuatro veces la del suero de control agrupado. Todos los lotes cumplieran este criterio.	3.2.P.8.3 Datos de estabilidad
	Sexo y Número/Grupo Hembras 8 animales/grupo inmunizado (1 grupo por dilución por vacuna) 8 animales/grupo de control no inmunizado	Artículo de control Vacuna conjugada contra <i>Haemophilus</i> Act HIB® (10 µg/mL), sanofi pasteur	Vía de administración Subcutáneo/a	Dosis desafío No se aplica	Potencia	Lote de producto final a granel IND09014 FDV01398 FDV01416 FDV01420

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.

RED_00059252

Información confidencial/propietaria
Página 10 de 14





Tabla 7: Potencia de hepatitis B en ratones

		Artículo de prueba: Hexaxim				Ubicación	
Tipo de estudio		Artículo de prueba	Calendario de administración	Dosis	Resultados o hallazgos destacables	Sección	
Potencia de hepatitis B	Especies/cepa	IND09014 FDV01398 FDV01416 FDV01420	D0: Inmunización D42: Recolección de sueros para titulación de anticuerpos por ELISA	1 mL, cada grupo recibe una de las diluciones de la vacuna que varían entre 1/40 de la dosis humana y 1/2560 de la dosis humana.	El criterio de aceptación es que el límite fiducial superior (P= 0,95) no es menor que 1,0. Todos los lotes cumplan este criterio.	3.2.P.8.3 Datos de estabilidad	
	Sexo y Número/Grupo	Hembras 12 animales/grupo inmunizado (1 grupo por dilución por vacuna) 5 animales/grupo de control no inmunizado	Vía de administración	Dosis desafío		Lote de producto final a granel	Comentarios
		Artículo de control	Intraperitoneal	No se aplica	IND09014 FDV01398 FDV01416 FDV01420	Potencia estimada 1,461 (0,723 - 3,390) 1,210 (0,628 - 2,561) 1,164 (0,658 - 2,041) 1,171 (0,644 - 2,268)	

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.

RED_00059252

Información confidencial/proprietaria
Página 11 de 14

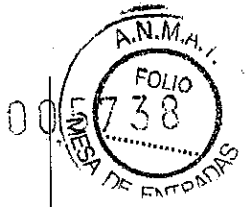
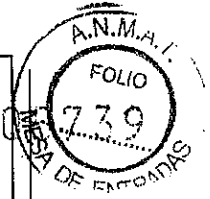




Tabla 8: Estudio de interferencia antigénica entre HBsAg y PRP-T

Tipo de estudio	Especies/cepa	Artículo de prueba		Esquema y vía de administración	Dosis	Resultados o hallazgos destacables	Ubicación		
		Antígeno	Lote				Sección		
Farmacodinamia primaria: Inmunogenicidad de los antígenos de la hepatitis B y de <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b dentro de Hexaxim	Ratones/NMRI	HBsAg	L033	3 administraciones con un intervalo de 3 semanas	Se ensayó la inmunogenicidad del HBsAg y del PRP-T solos, combinados o asociados con los demás antígenos de Hexaxim. Cada animal recibe 1/10 de una dosis humana de todas las mezclas definidas.	<p>Efecto del adyuvante: El hidróxido de aluminio incrementó significativamente la respuesta de la IgG anti-HBsAg (principalmente IgG1) y no tuvo efecto negativo alguno sobre la respuesta anti-PRP en la formulación hexavalente.</p> <p>Interferencia inmunitaria entre valencias: No se observaron interacciones negativas importantes sobre las respuestas inmunitarias entre HBsAg y PRP-T cuando se mezclaron con los demás componentes de la vacuna hexavalente.</p> <p>Polarización de las respuestas: Th1(IgG2a) frente a Th2 (IgG1) Como era de esperar, la adición de hidróxido de aluminio aumentó fuertemente las titulaciones de IgG1 anti-HBsAg. El PRP-T incrementó los niveles de IgG2a anti-HBsAg dando lugar a una respuesta Th1/Th2 bien equilibrada para la hepatitis B en la formulación hexavalente. La adición de HBsAg al PRP-T solo o mezclado con D, T, aP, IPV no tuvo una influencia significativa sobre la polarización de la respuesta anti-PRP.</p>	F.IM.TAN002.Ms 4.2.1.1 Farmacodinamia primaria	Comentarios	
		PRPT	FA148249						
		PDT	FA174025						
		PTT	FA124561						
		PTXd	FA139378						
		FHA	FA133657						
		IPV	FA198822						Vía de administración Intramuscular
									Adyuvante y artículo de control Adyuvante: Hidróxido de aluminio Al(OH) ₃ (proveedor Superfos) lote FA203168
									Sexo y Número/Grupo Hembra 10 animales/grupo



ROXANA MONTEMLONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

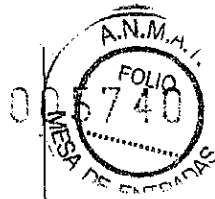
CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.

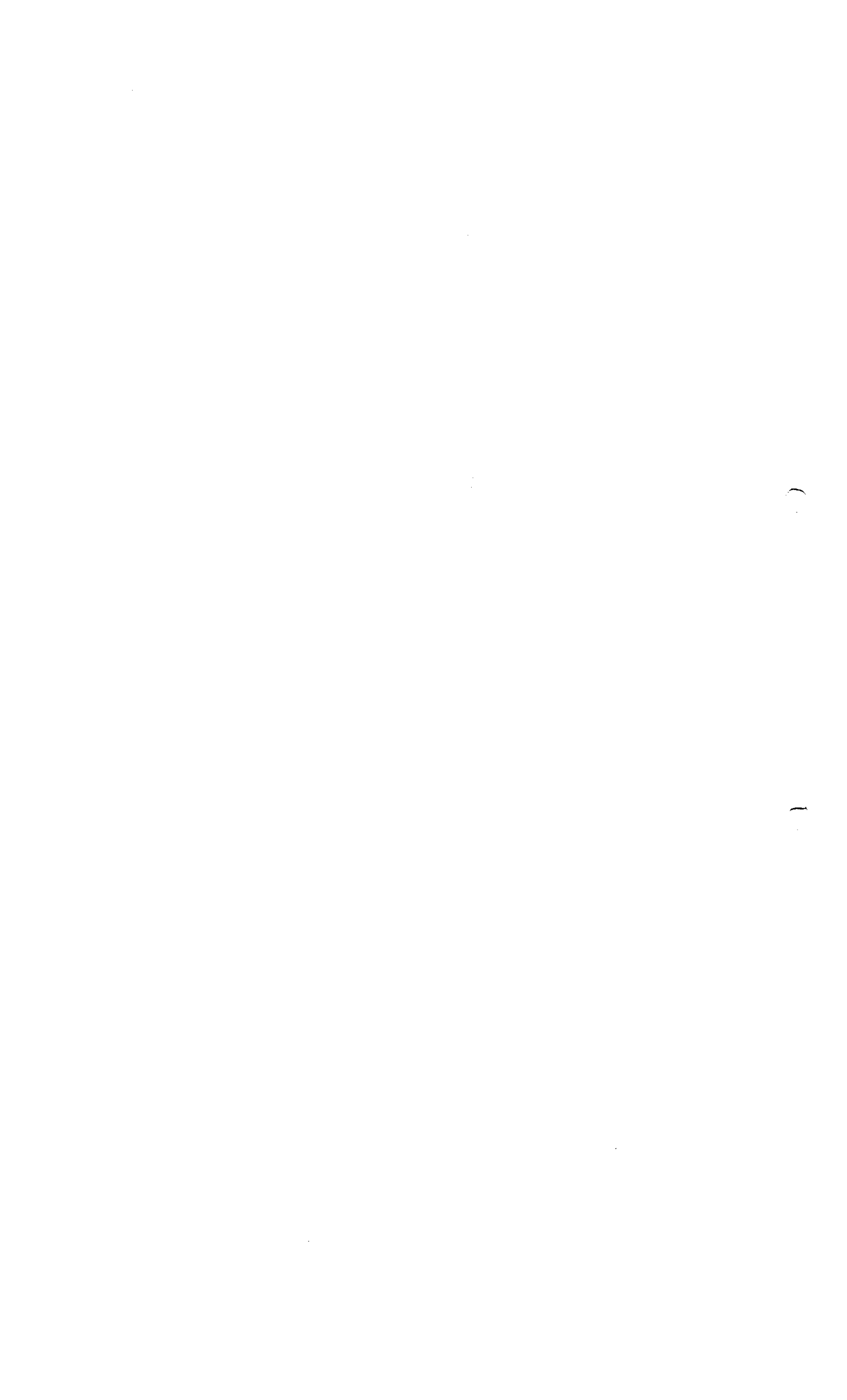


Tipo de estudio	Especies/cepa	Artículo de prueba	Esquema y vía de administración	Dosis	Resultados o hallazgos destacables	Ubicación	
						Sección	
					<p>Persistencia de la respuesta con el tiempo (memoria)</p> <p>Se indujeron respuestas robustas de IgG anti-HBsAg que alcanzaron una meseta en la semana 8 y permanecieron estables a lo largo de un período de 16 semanas.</p> <p>Las respuestas anti-PRP alcanzaron su máximo en las semanas 6 a 8 y disminuyeron de forma significativamente menos rápida cuando se formuló el PRP-T en las vacunas hexavalentes o se inyectó simultáneamente con HBsAg en comparación con la administración de PRP-T solo.</p>		

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.







3 Farmacodinamia secundaria

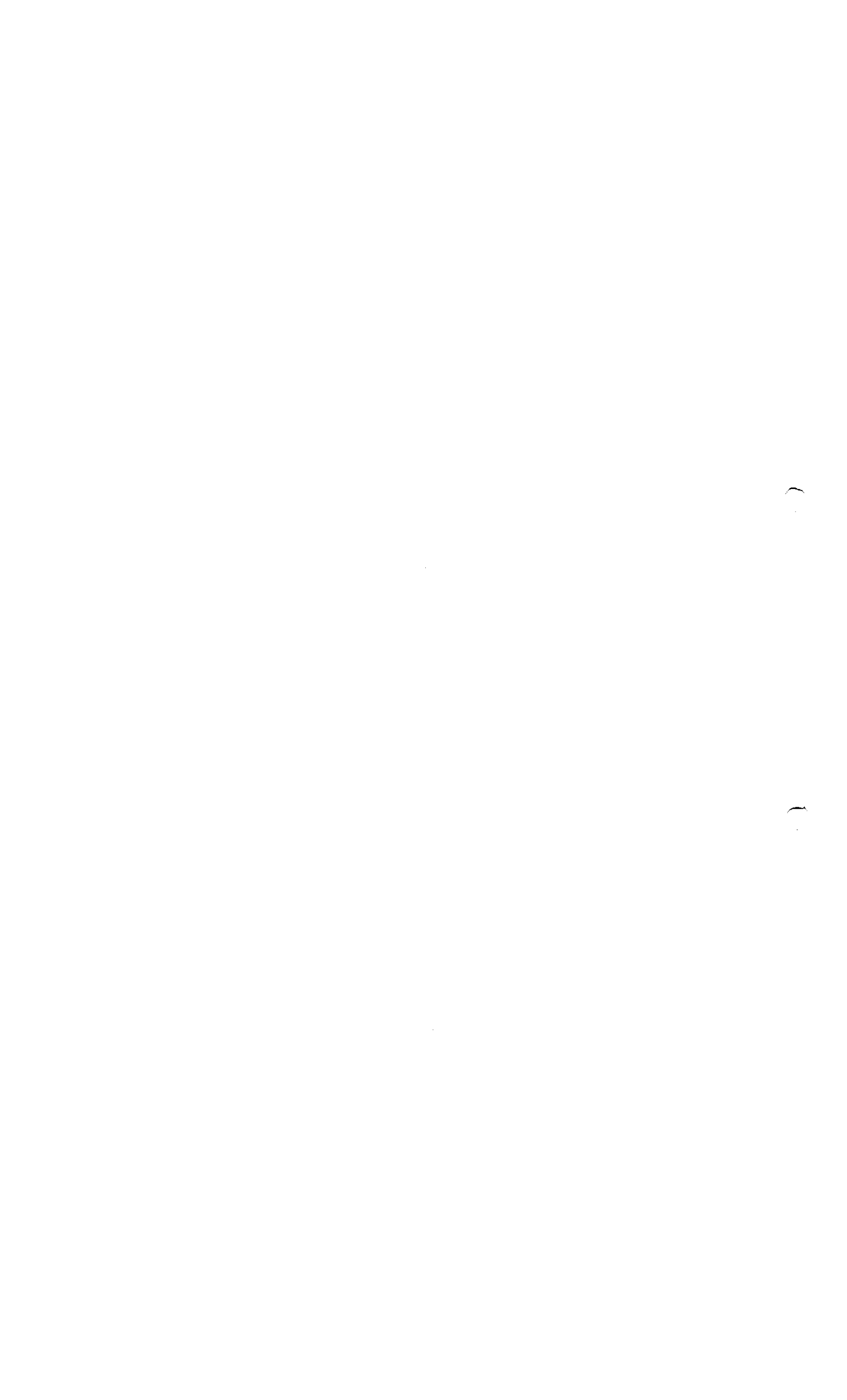
No se llevaron a cabo estudios de farmacodinamia secundaria ya que no se identificaron riesgos específicos con la vacuna candidata ("Nota guía sobre pruebas farmacológicas preclínicas y de toxicidad de vacunas" de la EMA [CPMP/SWP/465/95]).

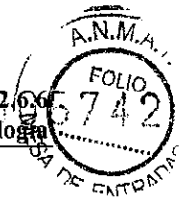
4 Farmacología de seguridad

No se llevaron a cabo estudios de farmacología de seguridad ya que no se identificaron riesgos cardiotoxicos, respiratorios ni neurotóxicos ("Nota guía sobre pruebas farmacológicas preclínicas y de toxicidad de vacunas" de la EMA [CPMP/SWP/465/95]).

5 Interacciones medicamentosas farmacodinámicas

No se ha investigado información alguna sobre interacciones del fármaco en animales ("Nota guía sobre pruebas farmacológicas preclínicas y de toxicidad de vacunas" de la EMA [CPMP/SWP/465/95]).

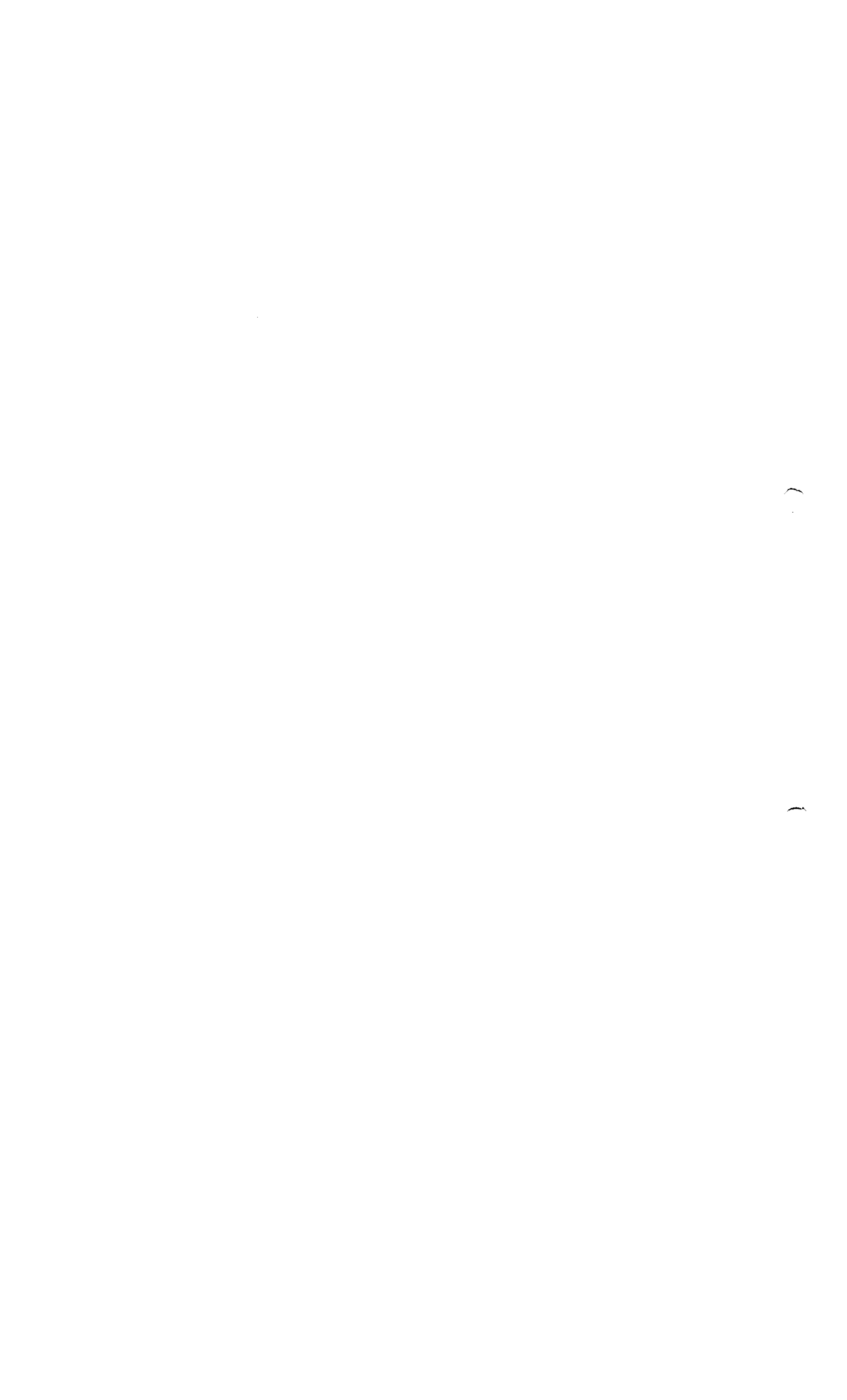


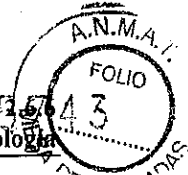


Sección 2.6.6 Resumen escrito de toxicología

Índice

Lista de tablas	2
Lista de Abreviaturas.....	3
1 Resumen breve.....	4
2 Toxicidad de dosis única	5
3 Toxicidad de dosis repetidas.....	5
3.1 Hexaxim, formulación vacunal combinada inicial	5
3.2 Hexaxim, formulación vacunal combinada mejorada	7
4 Genotoxicidad	9
5 Carcinogenia	10
6 Toxicidad reproductiva y del desarrollo	10
7 Tolerancia local	10
8 Otro estudio de toxicidad.....	13
9 Discusión	14
10 Conclusión.....	16
Lista de referencias	17





Lista de tablas

Tabla 1: Programa de toxicología.....4

Tabla 2: Hexaxim: Diseño del estudio de toxicidad de dosis repetidas en conejos blancos de Nueva Zelanda por vía IM.....6

Tabla 3: Hexaxim: Diseño del estudio de toxicidad de dosis repetidas en conejos blancos de Nueva Zelanda por vía IM.....7

Tabla 4: Hexaxim: Diseño del estudio de investigación de toxicidad de tolerancia local en conejos blancos de Nueva Zelanda por vía IM.....12

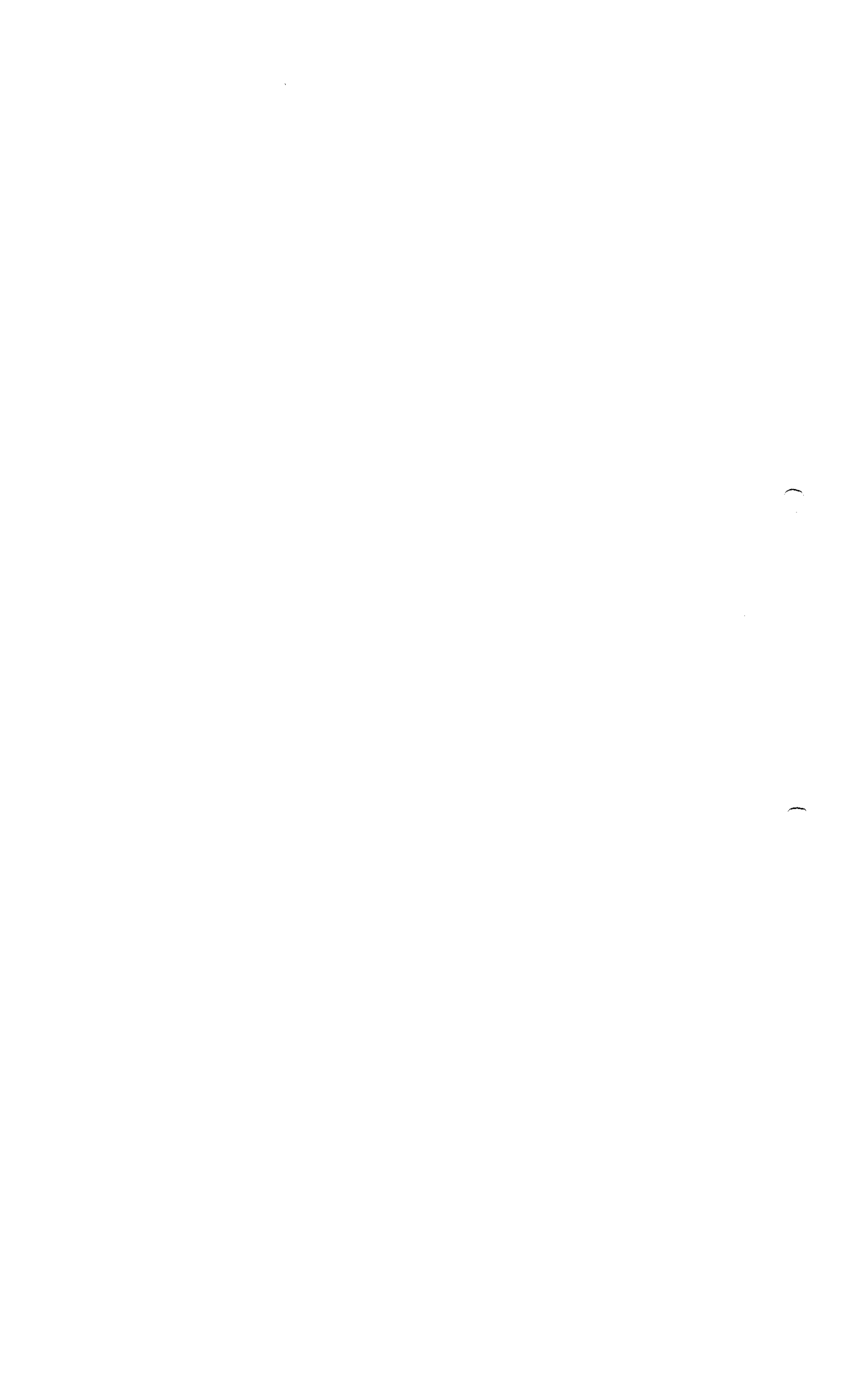

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.



Lista de Abreviaturas

aP	<i>B. pertussis</i> , componente acelular
Ag	Antígeno
CHMP	Comité para productos medicinales para uso humano
CPMP	Comité para Productos Medicinales Propietarios
D	Difteria
D1	Día 1
EMA	Agencia Europea de Medicamentos
BPL	Buenas Prácticas de Laboratorio
BPM	Buenas Prácticas de Manufactura
HD	Dosis humana
Hep B	Hepatitis B
IM	Intramuscular
IPV	Virus inactivado de la poliomielitis
mL	Mililitro
Ph. Eur.	Farmacopea Europea
PRP-T	fosfato de polirribosil ribitol
SC	Subcutáneo
SWP	Grupo de Trabajo de Seguridad
T	Tétanos
TRS	Serie de Informes Técnicos
TTC	Umbral de Importancia Toxicológica
WBC	Glóbulos blancos
OMS	Organización Mundial de la Salud





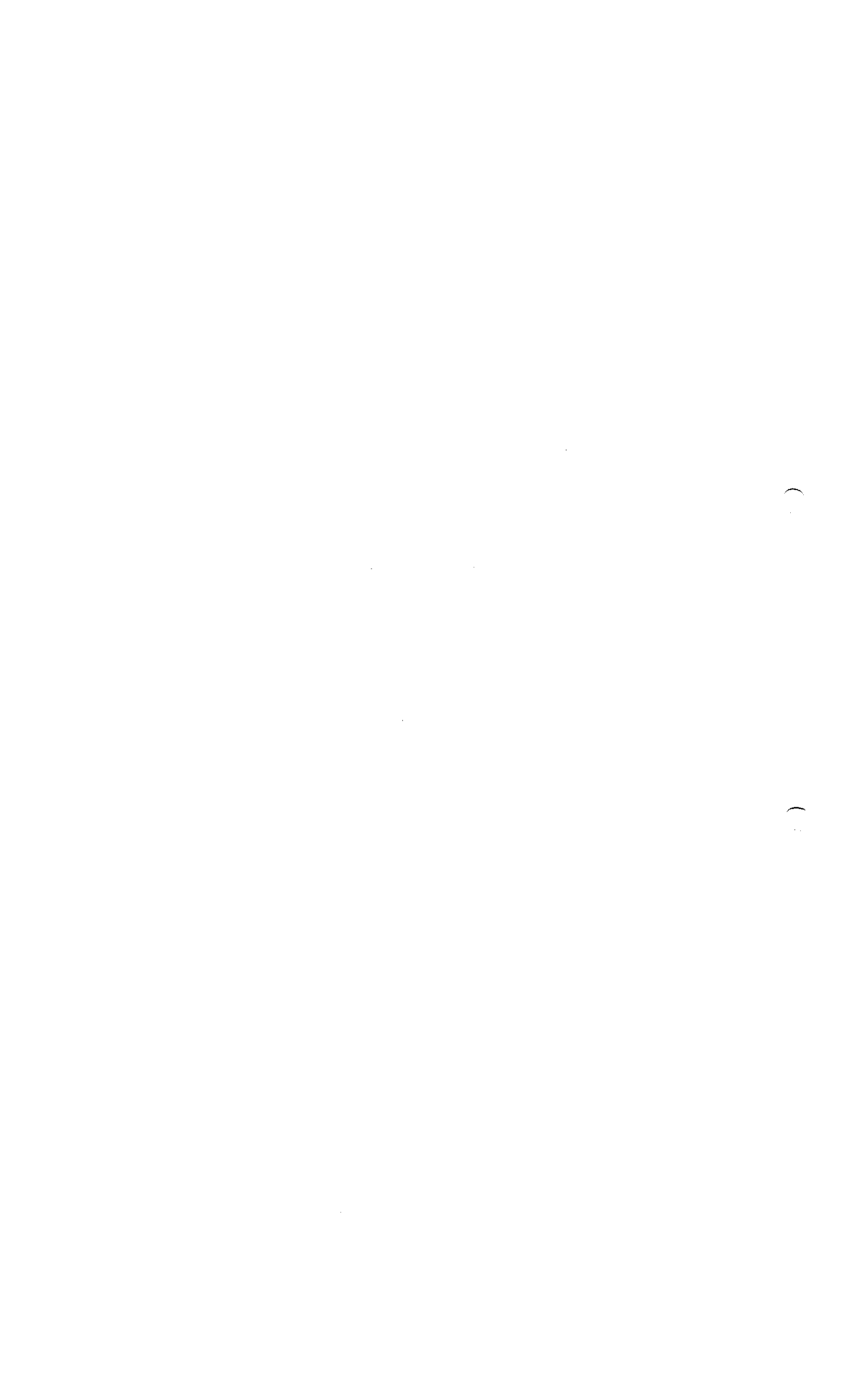
1 Resumen breve

Para la evaluación de seguridad no clínica de la vacuna hexavalente Hexaxim, se han llevado a cabo tres estudios de toxicología en conejos. Se llevó a cabo un estudio inicial de toxicidad de dosis repetidas para respaldar la fase clínica I. Este estudio comprendió una evaluación de la tolerancia local y evaluó la formulación inicial de la vacuna combinada. En un momento posterior del desarrollo de la vacuna se llevó a cabo un estudio de investigación de tolerancia local en conejos, para el seguimiento de algunas lesiones observadas durante una prueba de liberación de lotes en cobayos (ulceración en el lugar de la inyección en una prueba de toxicidad específica). Por último, se llevó a cabo un estudio de toxicidad de dosis repetidas para evaluar la formulación mejorada de la vacuna combinada, que es representativa de la vacuna para comercialización. Todos estos estudios se resumen en la tabla 1.

Tabla 1: Programa de toxicología

Duración y tipo del estudio	Vía de administración	Especie	Productos administrados
Toxicidad de dosis repetidas (1372-102) Cinco inyecciones en los días 1, 15, 29, 43 y 57	Intramuscular (IM)	Conejo	Hexaxim (formulación vacunal combinada inicial) Lote de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM): PFAGI001-01
Investigación de tolerancia local (AA33910 + enmienda) Cuatro inyecciones en los días 0, 14, 28 y 42	IM	Conejo	Hexaxim (formulación vacunal combinada inicial) Lotes BPM: S4009, PFAGI003-03, PFAGI007-01
Toxicidad de dosis repetidas (HX1.RDrb09/03) Cinco inyecciones en los días 1, 15, 29, 43 y 57	IM	Conejo	Hexaxim (formulación vacunal combinada mejorada) Lote experimental: IND09014

Todos los estudios se llevaron a cabo en cumplimiento de las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL), salvo el análisis de inmunogenicidad (i. e., mediciones de anticuerpos llevadas a cabo en sueros de conejo) que se realizó en sanofi pasteur ya que posee la experiencia científica más adecuada para este estudio. Los lotes de vacuna utilizados en los dos primeros estudios (n.º 1372-102 y n.º AA33910) fueron elaborados conforme a las BPM, el lote de vacuna utilizado para el tercer estudio de toxicidad fue un lote experimental representativo de la vacuna para comercialización (consulte la sección 2.6.7 Resumen de toxicología en tablas para mayores detalles).





El proceso de fabricación de Hexaxim ha evolucionado en el transcurso del desarrollo. Esta vacuna combinada contiene cinco antígenos: difteria (D), tétanos (T), componente acelular de *B. pertussis* (aP), virus inactivado de polio (IPV) y *Haemophilus influenzae* tipo b (PRP-T), que ya están incluidos en otras vacunas combinadas del solicitante que ya poseen licencia (Pentavac/Pentaxim y Tetravac/Tetraxim) y un nuevo antígeno de superficie de la hepatitis B (Hep B). El fundamento principal tras el conjunto de toxicología era la necesidad de evaluar el nuevo antígeno de Hep B como parte de una vacuna combinada y posteriormente la necesidad de evaluar los cambios de la formulación de la vacuna combinada. La formulación inicial fue evaluada en el primer estudio de toxicidad de dosis repetidas, para respaldar la primera inyección en el hombre (n.º 1372-102) y en el estudio de investigación de tolerancia local (n.º AA33910), que se llevó a cabo para el seguimiento de ciertas lesiones cutáneas observadas durante una prueba de liberación *in vivo* (prueba de toxicidad específica). En un momento posterior del desarrollo de la vacuna, la formulación de la vacuna combinada fue mejorada y se cambiaron ligeramente los excipientes. En consecuencia, se llevó a cabo un estudio puente de toxicidad de dosis repetidas (n.º HXI-RDrb09/03) para evaluar la formulación mejorada utilizando un lote experimental representativo de la vacuna para comercialización.

Los resultados de los estudios de toxicidad se debatirán en los siguientes párrafos.

2 Toxicidad de dosis única

No se consideró necesario realizar un estudio de toxicidad de dosis única ya que la vacuna está indicada para su uso con administraciones repetidas. La evaluación de seguridad de la vacuna se llevó a cabo en dos estudios de toxicidad de dosis repetidas y en un estudio de investigación de tolerancia local (consulte 3 y 7).

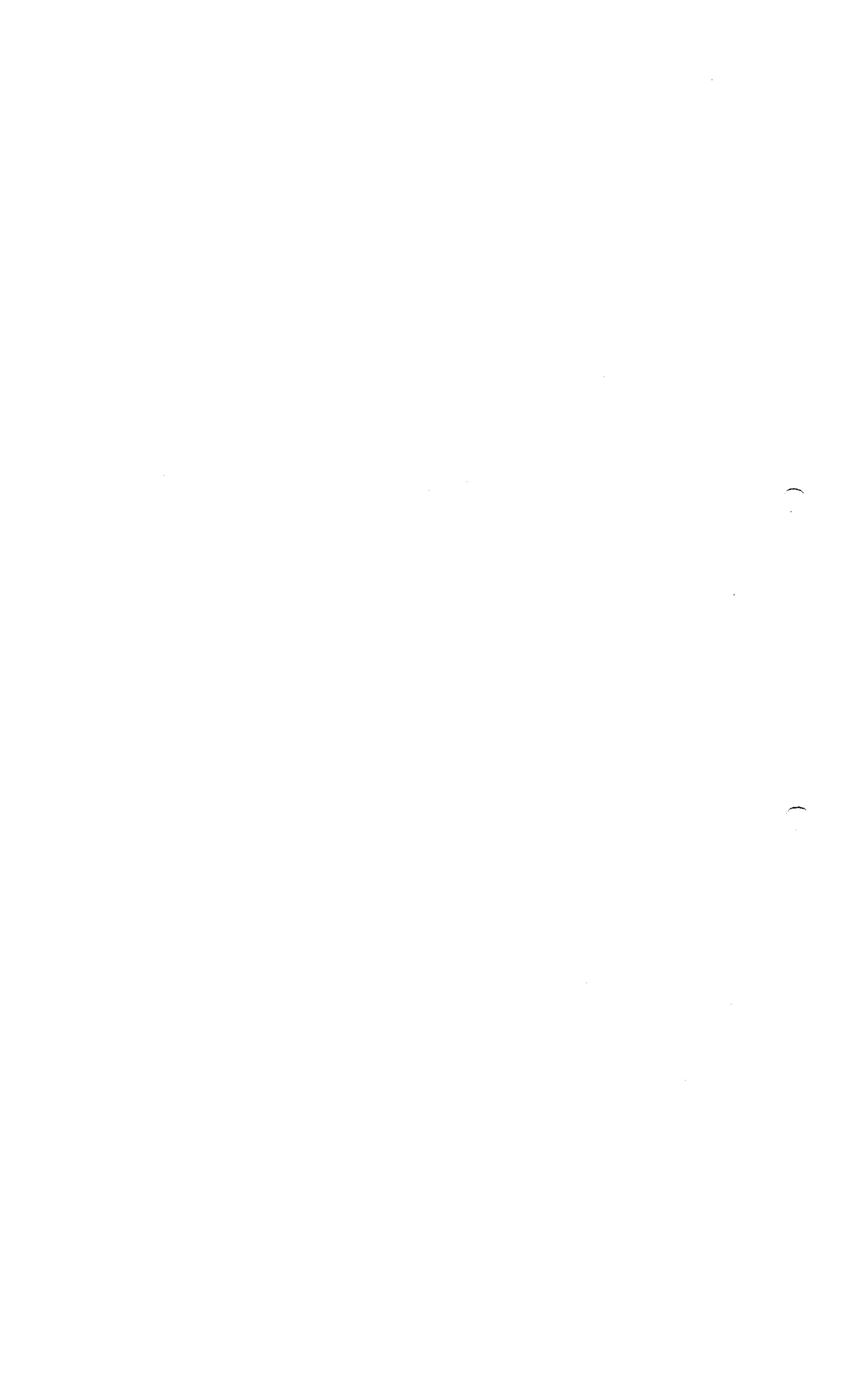
3 Toxicidad de dosis repetidas

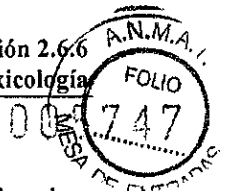
3.1 Hexaxim, formulación vacunal combinada inicial

Título del estudio: - Estudio de dosis repetidas administradas por vía intramuscular a conejos blancos de Nueva Zelanda (Estudio n.º 1372-102)

El informe de este estudio se incluye en la sección 4.2.3.4 Toxicidad de dosis repetidas y se resume en esta sección y en la sección 2.6.7 Resumen de toxicología en tablas.

Se llevó a cabo un estudio de dosis repetidas en conejos para evaluar tanto la toxicidad sistémica como la tolerancia local, que comprendió un período de observación de dos semanas después de la última dosis. El régimen de dosificación utilizado (cinco inyecciones cada dos semanas) respaldaba un régimen clínico de hasta 4 dosis (3 inyecciones para la serie primaria y una inyección de refuerzo). Se eligió el conejo porque es una especie adecuada para toxicología y responde inmunológicamente a la vacuna. La masa muscular del conejo permitió administrar el volumen de la dosis humana (HD) por vía intramuscular, que es la vía de administración clínica.





Se inyectó a dos grupos de conejos (8 machos y 8 hembras) cinco veces con la solución salina de control o con Hexaxim, cada dos semanas, por vía IM (en el muslo) (consulte tabla 2). Se administró una dosis de 0,5 mL a todos los conejos (un volumen y dosis equivalente a la humana). Durante el estudio se observó a los animales dos veces al día en busca de signos clínicos adversos. El peso corporal y el consumo de alimentos se midieron una vez a la semana o cada día, respectivamente. Se evaluaron las reacciones locales en los lugares de inyección inmediatamente después de cada dosis, diariamente durante tres días después de cada dosis y semanalmente entre cada dosis. Se extrajeron muestras de sangre para patología clínica los días 3, 58 y 71 y se extrajeron muestras para evaluación de la inmunogenicidad el día 58. Se llevaron a cabo exámenes de oftalmología antes de la administración y luego en los días 3, 57 y 70. La mitad de los animales de cada grupo (4) fue sacrificada el día 1 o el día 14 después de la última administración (día 58 ó 71, respectivamente). Se pesó y examinó microscópicamente una gama completa de órganos y tejidos (según las guías de la EMA (1) y de la OMS (2)).

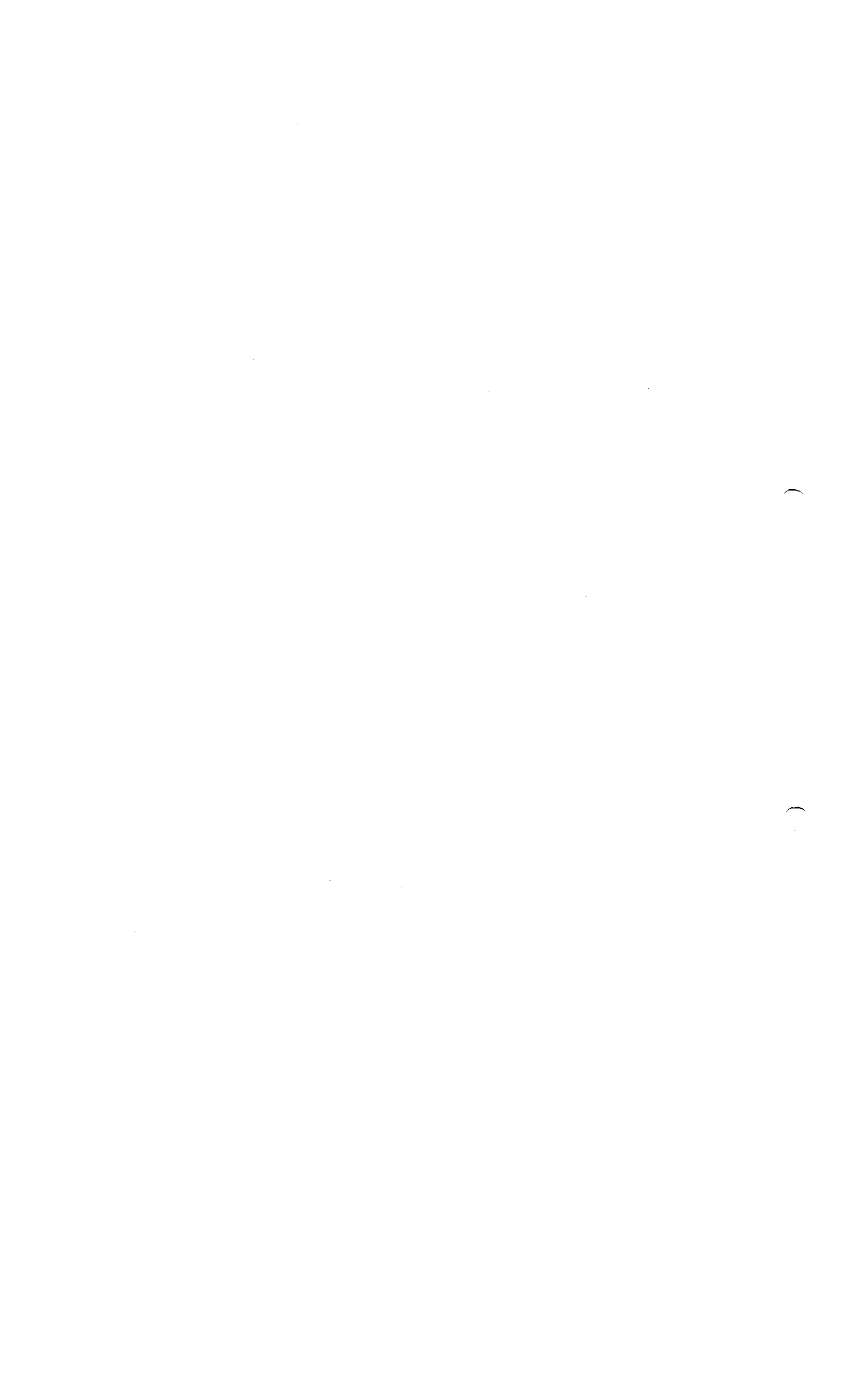
Tabla 2: Hexaxim: Diseño del estudio de toxicidad de dosis repetidas en conejos blancos de Nueva Zelanda por vía IM

Grupo/ Tratamiento	Nivel de dosis / Administración (HD)	Volumen de la dosis (mL/ animal)	Número de animales			
			sacrificados en el día 58		sacrificados en el día 71	
			Machos	Hembras	Machos	Hembras
Control de solución salina	0	0,5	4	4	4	4
Hexaxim	1	0,5	4	4	4	4

No hubo muertes prematuras, signos clínicos adversos ni efecto sobre el peso corporal, sobre el consumo de alimentos, oftalmología o peso de los órganos.

En el lugar de la inyección se observó eritema o edema mínimo o, en algunos casos, leve después de las dos últimas administraciones (días 43 y 58). Tras la necropsia del día 58 el examen microscópico mostró decoloración roja y un aspecto gelatinoso en los lugares de inyección (principalmente en el último lugar inyectado) en dos animales tratados y no hubo hallazgos en los animales de control ni en ninguno de los animales en la necropsia del día 71. Los exámenes histopatológicos de los lugares revelaron inflamación crónica-activa (edema, algo de hemorragia, infiltración de células polimorfonucleares y algunas células mononucleares), que tenían un aspecto más crónico 14 días después de la última inyección (día 71). Se observó también inflamación en el tejido subcutáneo (SC) el día 58, que se extendía a las fascias musculares subyacentes, pero no se observó ulceración alguna. El día 71, la mayoría de los lugares de inyección presentaba lesiones consistentes en una acumulación o agrupamientos de macrófagos grandes que contenían abundante material claro, basófilo, finamente granuloso. Las lesiones se consideraron reacciones típicas del huésped a una materia extraña y no mostraron recuperación después de 14 días.

Se observaron cambios de patología clínica, concordantes con una respuesta inmunitaria, el día 58, que incluyeron un aumento de los glóbulos blancos (WBC), neutrófilos y monocitos y un aumento estadísticamente significativo de las globulinas, en comparación con los controles. El día



71, estos parámetros habían regresado a los valores de control, lo cual era indicativo de recuperación.

Se observaron también otros cambios menores de los parámetros de la química sanguínea, entre ellos un aumento estadísticamente significativo del colesterol en las hembras el día 58 y unos niveles medios de urea más elevados, de forma estadísticamente significativa, en ambos sexos el día 71 (vea el comentario del párrafo 9).

Se detectó una respuesta inmunitaria humoral contra la difteria (antígeno seleccionado para demostrar la exposición a la vacuna) en todos los conejos tratados con la vacuna, lo que indica una inmunización efectiva.

En conclusión, las inyecciones IM repetidas de Hexaxim a los conejos indujeron reacciones inflamatorias locales, asociadas con cambios de los glóbulos blancos. Hubo una recuperación limitada de los cambios histopatológicos en los lugares de la inyección tras dos semanas de observación, mientras que los cambios de los glóbulos blancos resultaron reversibles.

3.2 Hexaxim, formulación vacunal combinada mejorada

Título del estudio: “Estudio de tolerancia local y toxicidad de dosis repetidas en conejos blancos de Nueva Zelanda tras cinco inyecciones intramusculares a intervalos de 2 semanas (estudio n.º HXI.RDrb09/03)”

El informe de este estudio se incluye en la sección 4.2.3.4 Toxicidad de dosis repetidas y se resume en esta sección y en la sección 2.6.7 Resumen de toxicología en tablas.

El objetivo de este estudio era confirmar que la tolerancia local y la toxicidad sistémica potencial de Hexaxim no habían cambiado como consecuencia de la optimización de su formulación.

El diseño del estudio, incluyendo el modelo animal y las investigaciones, fueron los mismos que se utilizaron para el primer estudio de toxicidad de dosis repetidas, para que se pudieran comparar los perfiles de seguridad de la vacuna inicial y mejorada. La tabla 3 resume el diseño del estudio. Dos grupos de conejos blancos de Nueva Zelanda (16 machos y 16 hembras) recibieron cinco inyecciones IM de solución salina o una HD de Hexaxim los días 1, 15, 29, 43 y 57 en el músculo dorsolumbar.

Tabla 3: Hexaxim: Diseño del estudio de toxicidad de dosis repetidas en conejos blancos de Nueva Zelanda por vía IM

Grupo/Tratamiento	Nivel de dosis/Administración	Volumen de la dosis (mL/Animal)	Número de animales			
			sacrificados en el día 58		sacrificados en el día 71	
			Machos	Hembras	Machos	Hembras
Control de solución salina	0	0,5	4	4	4	4
Hexaxim	1 HD	0,5	4	4	4	4





Se observó la mortalidad de los animales dos veces al día durante el estudio. Se llevó a cabo el registro de signos clínicos y de reacciones locales en el lugar de la inyección al mismo tiempo al menos una vez al día. Se registró el peso corporal durante la aclimatación, el D1 de tratamiento y una vez por semana hasta el final del estudio. El consumo de alimentos se midió diariamente. Se extrajeron muestras de sangre para patología clínica en los días 3, 58 y 71, mientras que las demás muestras para los análisis de inmunogenicidad (IgG contra D, T, Hep B, como antígenos seleccionados para demostrar la exposición) se extrajeron antes del primer tratamiento y antes del sacrificio en los días 58 y 71. La mitad de los animales (16) de cada grupo fueron sacrificados en el día 58 ó 71 y la relación completa de tejidos y órganos fueron pesados y examinados microscópicamente (según las guías de la EMA(1) y de la OMS (2)).

No hubo muertes prematuras, signos clínicos adversos relacionados con el tratamiento ni efectos sobre el peso corporal ni sobre el consumo de alimentos durante el transcurso del estudio. Los resultados de las pruebas de oftalmología fueron normales. Todos los conejos tratados con la vacuna mostraron una respuesta inmunitaria positiva a los antígenos de la difteria, el tétanos y la Hep B.

Las investigaciones de química sanguínea mostraron una disminución persistente del cociente de albúmina/globulina que se debió al aumento de los niveles de globulina. Los cambios hematológicos se limitaron a un aumento de los recuentos de neutrófilos, con ligeras disminuciones transitorias asociadas en los recuentos de eosinófilos o basófilos, en el día 58 en ambos sexos. El orden de disminución de los eosinófilos o basófilos es decir, de 1,2 veces a 1,6 veces respectivamente, no se consideró toxicológicamente relevante porque todos los valores se mantuvieron dentro de los datos de referencia.

En la necropsia, se evidenció que el peso de los nódulos linfáticos inguinales había aumentado en los machos en el día 58 y en el día 71, mientras que en las hembras hubo aumentos del peso de los nódulos linfáticos inguinales en el día 58 y del peso de los nódulos linfáticos poplíteos en el día 71. No se produjeron cambios macroscópicos relacionados con el tratamiento.

Las investigaciones histopatológicas mostraron el desarrollo de centros germinales en los nódulos linfáticos inguinales y en el bazo los días 58 y 71. Este cambio se asoció con un aumento del desarrollo de la paracorteza de los nódulos linfáticos inguinales en los machos y en las hembras solamente en el día 58. En el día 71, se observaron ocasionalmente centros germinales en el nódulo linfático poplíteo con mayor incidencia e intensidad en algunos animales tratados. Sólo un macho tratado presentó un desarrollo moderado de centros germinales asociados con un ligero desarrollo de la paracorteza.

El examen microscópico del hígado mostró una vacuolación periportal mínima o ligera en los animales de control y en los tratados. Estas vacuolas presentaron tinción positiva con rojo aceite O lo que sugiere que contenían lípidos. En el día 58, se observaron en una hembra de control, en todos los machos y en tres hembras del grupo tratado; mientras que en el día 71 se apreciaron en un macho y dos hembras de control frente a solamente dos hembras tratadas. Además, se observó contenido de glucógeno, calificado como mínimo, en el hígado de un macho de control sacrificado el día 58 y en tres machos tratados sacrificados el día 71. A la vista de la distribución de estos cambios y en ausencia de cambios de los parámetros de química clínica, se consideró improbable cualquier relación con Hexaxim. Estos fenómenos pueden producirse también espontáneamente y la observación de vacuolación periportal está posiblemente relacionada con el





ayuno de 14 horas antes del sacrificio (3) y por consiguiente estos hallazgos hepáticos no se consideraron de importancia toxicológica.

En los lugares de inyección muestreados un día después de la administración IM (lugares inyectados el día 57, muestreados el día 58), se apreciaron cambios agudos relacionados con el tratamiento, consistentes en inflamación con moderada infiltración de heterófilos y presencia de material (ciertamente el elemento de prueba) asociado con ulceración de las microfibras (lesión debida al material inyectado). Los demás hallazgos (hemorragia/edema, mínima infiltración de heterófilos, mínima fibroplasia/fibrosis, degeneración de miofibras, agregado de células mononucleares) se consideraron relacionados con los procedimientos de inyección.

Los lugares de inyección observados entre 15 y 70 días después de la administración IM (lugares inyectados los días 1, 15, 29 y 43 muestreados el día 58 o el 71) mostraron signos de un proceso inflamatorio crónico leve. Los hallazgos consistieron en agregados de macrófagos dilatados (calificados como mínimos o moderados), ocasionalmente coalescentes, asociados con infiltrados mínimos o ligeros de células inflamatorias. Estos hallazgos fueron concordantes entre los cuatro lugares de inyección. Unos pocos animales tenían depósitos de material amorfo. Los macrófagos presentes en los lugares de inyección persistieron durante largo tiempo y todavía se observaban 70 días después de la inyección. Se observó una mínima fibroplasia/fibrosis en el intersticio y este hallazgo corresponde probablemente al proceso de curación posterior a la inflamación.

El análisis de los datos histopatológicos sugería que había menor incidencia de reatogenicidad local (especialmente para la presencia de material) de la esperada en los lugares de inyección. En consecuencia, se realizaron múltiples secciones histológicas adicionales y los bloques de los lugares de inyección fueron examinados cuidadosamente de nuevo. El análisis resultante puso de manifiesto que en unos cuantos animales, la trayectoria exacta de la aguja y el centro del lugar de la inyección pudieron no haber sido muestreados. No obstante, el extenso análisis de la zona del lugar de la inyección permitió que la interpretación y conclusión de la histopatología permaneciera del modo descrito previamente. Además, la baja incidencia de hallazgos microscópicos se vio respaldada por la baja incidencia de signos clínicos y hallazgos macroscópicos locales.

En conclusión, las inyecciones IM repetidas de Hexaxim en conejos indujeron reacciones inflamatorias locales, con un aumento transitorio asociado de los recuentos de neutrófilos y un aumento de la actividad de los tejidos linfáticos. Hubo una recuperación limitada para los cambios histopatológicos en los lugares de inyección, cuyos cambios todavía estaban presentes después de 71 días. Estos hallazgos fueron comparables a los observados en el estudio anterior de toxicidad de dosis repetidas.

4 Genotoxicidad

No hubo ninguna nueva materia prima, residuos del proceso, conservante ni adyuvante en los antígenos D, T, aP, IPV o PRP-T, en comparación con los utilizados actualmente en otras vacunas combinadas con licencia de sanofi pasteur.





Para el antígeno Hep B, los residuos del proceso utilizados en el proceso de elaboración fueron evaluados para determinar su genotoxicidad potencial utilizando información de vacunas comercializadas, orientación regulatoria y datos disponibles de toxicidad (vea el párrafo 8).

5 Carcinogenia

De conformidad con la “Nota guía sobre pruebas farmacológicas preclínicas y de toxicidad de vacunas” de la EMA (CPMP/SWP/465/95) (1) y las guías de la OMS sobre la evaluación no clínica de vacunas (2), no se consideraron necesarios los estudios de carcinogenia ya que la exposición a la vacuna es de corto plazo.

6 Toxicidad reproductiva y del desarrollo

De conformidad con la “Nota guía sobre pruebas farmacológicas preclínicas y de toxicidad de vacunas” de la EMA (CPMP/SWP/465/95) (1) y las guías de la OMS sobre la evaluación no clínica de vacunas (2), no se realizaron estudios de toxicidad reproductiva o del desarrollo con Hexaxim ya que la población objetivo son lactantes o niños pequeños solamente. Durante los estudios de toxicidad de dosis repetidas se obtuvo información acerca de los efectos sobre los órganos reproductores (vea el párrafo 3) y no se observó ninguna evidencia de toxicidad.

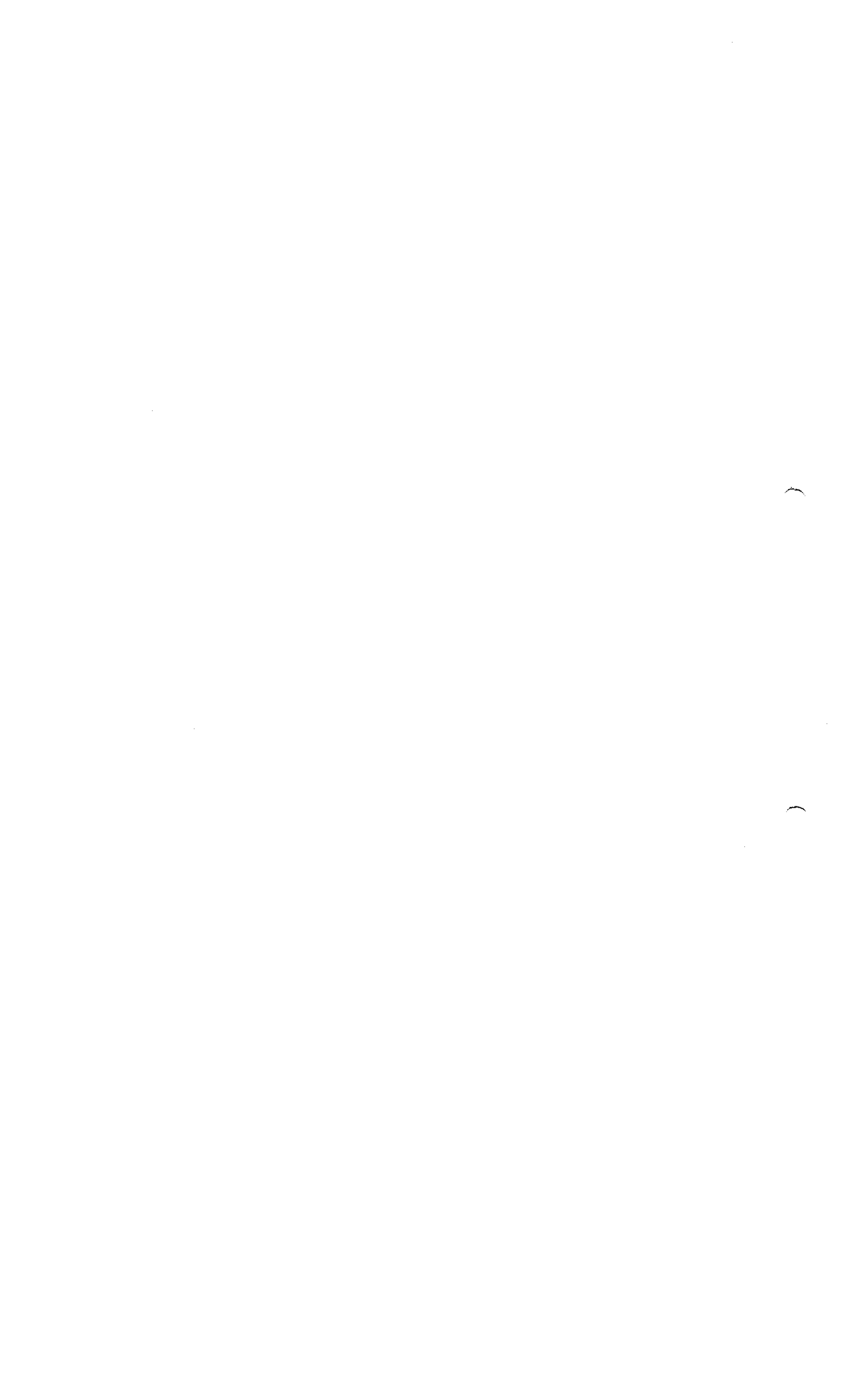
7 Tolerancia local

Se evaluó la tolerancia local en los dos estudios de toxicidad de dosis repetidas comentados en el párrafo 3 y en un estudio de investigación diseñado para la evaluación adicional de lesiones observadas utilizando una prueba de liberación en cobayos (vea más abajo).

Título del estudio: Estudio de investigación de tolerancia local y de toxicidad de dosis repetidas en conejos hembras tras cuatro administraciones por vía intramuscular (estudio n.º AA33910+ enmienda).

El informe de este estudio se incluye en la sección 4.2.3.6 Tolerancia local y se resume en esta sección y en la sección 2.6.7 Resumen de toxicología en tablas.

Se llevaron a cabo pruebas de toxicidad *in vivo* durante el desarrollo de Hexaxim como parte de la liberación de lotes de BPM (vea la descripción del método en la sección 3.2.P.8.3 Datos de estabilidad). En una de estas pruebas, la “prueba de toxicidad específica”, que se utiliza para demostrar la ausencia de reversibilidad de las toxinas tetánica y diftérica, el producto se administra a 5 veces la HD (es decir, 2,5 mL) en el costado de cobayos por vía subcutánea (OMS TRS 800, anexo 2; Ph. Eur. monografía 2067). Durante estas pruebas, dos lotes clínicos dieron lugar a observaciones de ulceración en unos cuantos cobayos: el lote PFAGI007-01 (posteriormente liberado para su empleo en el estudio clínico de fase III A3L04) y el lote S4009 (posteriormente liberado para su empleo en el estudio clínico de fase III A3L11). Dado que anteriormente no se había comunicado ulceración para Hexaxim, estos lotes fueron sometidos a evaluación adicional mediante un estudio de investigación de tolerancia local en un modelo animal adecuado, es decir, el conejo, que es la especie más sensible para la evaluación de la





tolerancia local (4) (5), y que se había utilizado anteriormente para el estudio de toxicidad de dosis repetidas (vea el párrafo 3.1), utilizando condiciones más relevantes en cuanto al régimen de dosificación y la vía de administración.

En este estudio, se evaluaron tres lotes clínicos en pruebas de liberación con cobayos (dos de los cuales presentaron cierta ulceración: S4009, PFAGI007-01 y uno no la presentó: PFAGI003-03).

Se trató a cuatro grupos de diez conejos blancos de Nueva Zelanda hembra los días 0, 14, 28 y 42 por vía IM en los músculos dorsolumbares. No hubo evidencia de ninguna diferencia en función del sexo en los estudios de tolerancia local y por tanto solo se sometieron a prueba hembras para reducir el uso de animales (5). Los conejos recibieron 0,5 mL por inyección de S4009, PFAGI003-03, PFAGI007-01 o solución salina (el volumen administrado fue equivalente a la HD). Se administraron cuatro dosis, que era el número mínimo de dosis que producía signos locales visibles en el estudio anterior de toxicidad de dosis repetidas (estudio n.º 1372-102; vea la sección 3.1).

El diseño del estudio se resume en la tabla 4.

