

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

Grupo/Tratamiento	Número de animales	Nivel de dosis/Administración	Volumen de la dosis (mL/Animal)	Número de animales	
				sacrificados en el día 58	sacrificados en el día 71
Control de solución salina	5	0	0,5	5	5
Hexaxim, lote S4009	5	1 HD	0,5	5	5
Hexaxim, lote PFAGI007-01	5	1 HD	0,5	5	5
Hexaxim, lote PFAGI003-03	5	1 HD	0,5	5	5

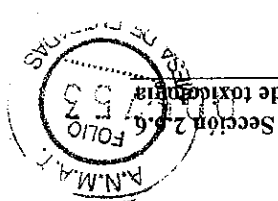
El estudio incluyó parámetros de toxicidad sistémica, tales como patología clínica y oftalmología, para evaluar otros posibles cambios toxicológicos y para confirmar la idoneidad de los lotes para los estudios clínicos. Además, el período de recuperación fue ampliado a 30 días, ya que este fue el plazo en que apareció ulceración en el cobayo y un período de observación ampliado suministraría también más información acerca de la recuperación de las reacciones locales.

Durante el estudio se observó a todos los animales en busca de signos clínicos adversos. Los lugares de inyección fueron examinados al menos una vez al día y se llevó a cabo un examen clínico completo al menos semanalmente. Se llevaron a cabo exámenes oftalmológicos antes de la prueba y en los días 2, 43 y 56. Se pesó semanalmente a todos los animales y se midió diarriamente el consumo de alimentos. Se extrajeron muestras para patología clínica una vez antes de la prueba y en los días 2, 43, 57 y 72. La mitad de los animales fueron sacrificados un día después de la última dosis (día 43) y el resto de los animales, 30 días después de la última dosis (día 72). Se registró el peso de los órganos y se extrajo y conservó una relación completa de órganos para histopatología. Solo se examinaron histopatológicamente los lugares de inyección y como no se apreciaron lesiones adicionales importantes, no se realizaron análisis histopatológicos adicionales.

No hubo muertes prematuras, signos clínicos de toxicidad sistémica, ni efectos sobre el peso corporal ni sobre el consumo de alimentos, no hubo hallazgos oftalmológicos y no hubo cambios en el peso de los órganos.

Las investigaciones de química clínica mostraron un aumento del nivel de globulinas, observado especialmente en el día 43. Un día después de la última inyección, la investigación hematológica mostró un aumento de los recuentos de neutrófilos relacionado con el tratamiento en todos los grupos tratados, en comparación con los valores de control y anteriores a la prueba, que regresaron a los niveles de control 14 días después de la última inyección.

En el lugar de la inyección se observó hematoma, asociado a veces con edema y eritema muy ligero o induración, en todos los grupos, incluidos los controles, y por tanto se consideró debido al procedimiento de administración más que relacionado con el tratamiento. En la necropsia del



día 43 se observaron áreas oscuras en los lugares de inyección en todos los grupos tratados, con respecto a aspecto edematoso en los dos últimos lugares inyectados (de las inyecciones de los días 28 y 42, respectivamente) en algunos animales tratados con los lotes PFAAGI003-03 o PFAAGI007-01. No se observaron lesiones macroscópicas en ningún otro órgano, así que el análisis microscópico se limitó a los lugares de inyección. El examen histopatológico reveló hallazgos relacionados con el tratamiento en los tres grupos, con algunas variaciones en la composición del infiltrado inflamatorio en función de la fase del proceso inflamatorio. El infiltrado inflamatorio se componía de agregado celular espumoso o de material amorfo con residuos celulares y células inflamatorias mixtas. La fase aguda (un día entre la inyección y el sacrificio) se asoció principalmente con ligera hinchazón intersticial y edema. La fase crónica (largo tiempo entre la inyección y el sacrificio, entre 15 y 72 días) mostró predominantemente agregados celulares espumosos con una infiltración menos intensa de células inflamatorias mixtas y hemorragia y edema muy mínimos o ausentes. La infiltración de células inflamatorias mixtas pareció algo más intensa en animales tratados con PFAAGI007-01 y PFAAGI003-03. Se observó miocitocerración con una incidencia y/o gravedad similares en los animales tratados y de control, y se consideró relacionada con el procedimiento de administración.

En conclusión, los lotes analizados indujeron reacciones locales típicas de una vacuna adyuvada con hidróxido de aluminio que presentaron una recuperación limitada. La administración de la vacuna se asoció con variaciones transitorias de los recuentos de neutrófilos. Las reacciones inflamatorias fueron ligeramente menos intensas con el lote S4009 que con los lotes PFAAGI007-01 y PFAAGI003-03 (en contraste con los datos generados anteriormente en cobayos).

8 Otro estudio de toxicidad

No se realizaron otros estudios de toxicidad.

Hubo una serie de residuos del proceso surgidos de la fabricación y potencialmente presentes en la vacuna Hexaxim a concentraciones extremadamente bajas. Para los antígenos: los antígenos D, T, aP, IPV e Hib, todas las materias primas y residuos utilizados en el proceso de fabricación, están presentes a niveles similares a los de otras vacunas combinadas comercializadas por la empresa (Pentavaac/Pentaxim).

Para el nuevo antígeno de Hep B, la mayoría de los residuos del proceso utilizados en el proceso de fabricación han sido cualificados con base en su nivel en otras vacunas comercializadas o con base en orientación regulatorias. Para tres productos, Aerosil, Tris y Structol, se realizaron evaluaciones de toxicología con el fin de determinar los niveles aceptables de exposición. Las evaluaciones tuvieron en cuenta los datos de toxicología disponibles, entre ellos los estudios de dosis repetidas realizadas con Hexaxim. Mostraron que ninguno de los residuos del proceso era genotóxico y que en caso de contar con datos toxicológicos limitados, como no había alertas estructurales ni inquietudes genotóxicas, se aplicaba el principio del umbral de importancia toxicológica (TTC) (vea más abajo).

Con base en estas evaluaciones, los niveles de residuos del proceso procedentes del antígeno Hep B en Hexaxim (cálculos teóricos basados en las diluciones del proceso, sin tener en cuenta ninguna pérdida potencial) no se consideraron de importancia toxicológica en una población de



lactantes/niños pequeños para un máximo de cuatro administraciones IM a lo largo de un periodo de dos años.

El TTC es un instrumento pragmático de evaluación del riesgo desarrollado que se basa en el principio de establecer un umbral de exposición humana para productos químicos por debajo del cual no existe riesgo apreciable de que tenga lugar un suceso (e. g., cáncer) a lo largo de toda una vida de consumo (6) (7)(8)(9) (10). Este instrumento de evaluación del riesgo se utiliza para la aceptación de posibles impurezas genotóxicas en medicamentos farmacéuticos, en los que un TTC de 1,5 µg/día es un nivel aceptable, si el producto no tiene ninguna alerta estructural, para una exposición de toda la vida a una impureza genotóxica (6).

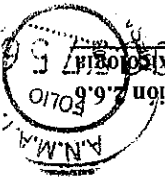
9 Discusión

Se evaluó la seguridad no clínica de la vacuna Hexaxim en un total de tres estudios de toxicidad en conejos. Se llevaron a cabo dos estudios de toxicidad de dosis repetidas para respaldar diferentes fases del desarrollo de la vacuna, y evaluar así las formulaciones inicial y mejorada. Entre estos dos estudios, se llevó a cabo un estudio de investigación de tolerancia local en conejos para el seguimiento de algunas lesiones observadas en una prueba de liberación de lote en cobayos.

En ninguno de los estudios hubo muertes prematuras de animales, ni signos clínicos adversos ni efectos sobre el peso corporal ni sobre el consumo de alimentos.

Todos los conejos vacunados generaron anticuerpos en respuesta a los antígenos de la vacuna (respuestas de anticuerpos T, D o Hep B analizadas) como se esperaba, y se asoció con mayores niveles de globulinas observados en las investigaciones de química clínica. En el último estudio de toxicidad de dosis repetidas, la estimulación del sistema inmunitario se transcribió también en el examen histopatológico de los órganos linfáticos, con desarrollo de centros germinales (a veces asociados con un aumento del desarrollo de la paracorteza) en los nódulos linfáticos de drenaje y en el bazo.

En los tres estudios realizados, se investigaron las reacciones locales tras administraciones IM repetidas en el modelo de conejo correspondiente. Uno de los estudios se realizó específicamente para el seguimiento de algunas lesiones observadas en cobayos durante las pruebas de rutina de liberación de lotes. Los tres estudios mostraron reacciones inflamatorias similares en los lugares de la inyección, con algunos cambios persistentes. Histopatológicamente, estos cambios consistieron en la presencia de infiltrados inflamatorios; es decir, macrófagos, material amorto (probablemente el adyuvante de la vacuna), residuos celulares y células inflamatorias mixtas. La naturaleza y gravedad de los hallazgos fue comparable entre estudios y lotes aunque hubiera algunas diferencias ligeras, probablemente atribuibles a la variabilidad individual. No hubo pruebas de aumento de las reacciones locales con los lotes de vacuna que habían mostrado anteriormente ulceración en el cobayo. Los lotes analizados en este estudio (AA33910) fueron utilizados para estudios clínicos y tuvieron un perfil de seguridad comparable al de los lotes analizados anteriormente. Nunca se ha comunicado ninguna observación de ulceración en los estudios clínicos en el hombre hasta la fecha. Los resultados generados en el conejo y



posteriormente en el ser humano demuestran que las lesiones observadas en los cobayos no se reprodujeron tras la inyección intramuscular de Hexaxim y que las condiciones experimentales de esta prueba de liberación no eran adecuadas para evaluar la tolerancia local de una vacuna que se inyecta intramuscularmente. Se llevaron a cabo investigaciones adicionales en cobayos; estas incluyeron una evaluación de las consecuencias de una inyección intradérmica de 0,1 mL de Hexaxim. Los resultados mostraron que esta administración ID inducía ulceraciones en el lugar de la inyección con un tiempo similar de inicio y un aspecto similar al observado en las condiciones de la prueba de liberación. Por lo tanto, la exploración más razonable para la ulceración observada se relaciona con la administración accidental por vía intradérmica en lugar de la administración subcutánea especificada.

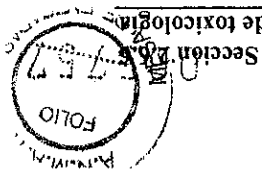
Durante los estudios de toxicidad en conejos, los cambios observados en el lugar de la inyección eran típicos de la inflamación local tras la vacunación, especialmente después de las inyecciones de vacunas combinadas adyuvadas con hidróxido de aluminio ya sea en animales (11) (12) o en el hombre (13) (15) (14). La recuperación de algunos de los cambios histopatológicos (agregados de macrófagos) fue limitada y no evidente incluso hasta 30 días después de la última administración de la vacuna Hexaxim. Los estudios no clínicos han demostrado que la inducción de cambios locales puede persistir durante varios meses, especialmente con la administración de hidróxido de aluminio (12). En seres humanos, Chong *et al.* demostraron que los granulomas inducidos por el hidróxido de aluminio pueden persistir durante varios meses después de la vacunación (15). No obstante, no existen pruebas hasta la fecha de que estas reacciones estén asociadas con ningún otro signo clínico anormal. El hidróxido de aluminio estimula la respuesta inmunitaria y es beneficioso para garantizar una buena respuesta inmunitaria y la cantidad de aluminio de Hexaxim ($600 \mu\text{g Al}^3$) no supera la de otras vacunas comercializadas, que pueden contener hasta 1,25 mg por dosis de conformidad con el límite establecido en la Farmacopea Europea (Ph. Eur., monografía 0153). Los adyuvantes con base de aluminio se han utilizado ampliamente con un buen historial de seguridad durante varias décadas.

En todos los estudios se observaron aumentos de los recuentos de neutrófilos, mientras que los cambios de los glóbulos blancos, monocitos, se observaron solamente en el primer estudio, lo cual podría deberse a variaciones individuales de la respuesta inmunitaria del conejo. Estos cambios se consideraron consecuencia de la inmunestimulación/reacciones inflamatorias locales y todos los estudios mostraron una recuperación completa de estas variaciones 14 días después de la última inyección.

Se advirtieron otros cambios menores durante los estudios, que no se consideraron relacionados con el tratamiento, sino que se consideraron un hallazgo de fondo. Entre estos cambios figuraron algunos cambios menores de la química clínica (colesterol [día 58], urea [día 71]), en el primer estudio de toxicidad de dosis repetidas, que podrían deberse a variaciones individuales, aun cuando no se pudo demostrar ya que no había análisis anteriores a la prueba en este estudio. Estos hallazgos no se vieron acompañados de ningún cambio histopatológico correspondiente. No obstante, durante el estudio de fase I se monitorearon los parámetros de química clínica (creatinina, alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa) y los parámetros hematológicos (hemoglobina, glóbulos blancos, plaquetas) y no presentaron cambios (vea la sección 2.5 Panorama clínico). Los datos de química clínica de los estudios clínicos no reprodujeron cambios de los parámetros arriba indicados, ni se repitieron en los

ROXANA MONTMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.



estudios adicionales de toxicología en el conejo y por tanto esto confirma que no tenían importancia toxicológica.

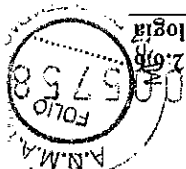
10 Conclusión

Hexaxim administrado por vía intramuscular hasta cinco veces, a un volumen de dosis equivalente a una HD a conejos, indujo cambios inflamatorios locales persistentes (recuperación parcial de los cambios microscópicos tras 70 días) acompañados de aumentos transitorios de los neutrófilos. Las reacciones locales se consideraron observaciones típicas causadas por la administración de vacunas combinadas con hidróxido de aluminio. La vacunación con Hexaxim indujo reacciones locales frecuentes; es decir, enrojecimiento o induración/hinchazón/dolor en los lugares de la inyección en seres humanos (vea la sección 2.5 Panorama clínico). Los datos generados en los tres estudios de toxicidad realizados en conejos demostraron que Hexaxim tenía un perfil de seguridad no clínica similar desde la formulación inicial de la vacuna combinada hasta la mejorada, que representa la vacuna para comercialización.



Lista de referencias

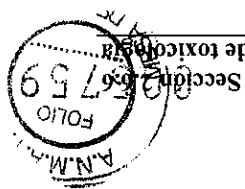
- 1 The European Medicines Agency. Committee for Proprietary Medicinal Products. Note for guidance on preclinical pharmacological and toxicological testing of vaccines. CPMP/SWP/465/95. London, 17 December 1997.
- 2 World Health Organization. Guidelines on Nonclinical Evaluation of Vaccines. WHO Technical Report Series No. 927: Annex 1, 2005. p31-63
- 3 Wells MY, Weisbrode SE, Maurer JK, Capen CC, Bruce RD. Variable Hepatocellular Vacuolization Associated with Glycogen in Rabbits. Toxicologic Pathology 1988;16:360-365.
- 4 Brennan FR, Dougan G. Non-clinical safety evaluation of novel vaccines and adjuvants: new products, new strategies. Vaccine 2005;23(24):3210-22.
- 5 Jochims K, Kemkowski J, Nolte T, Bartels T, Heuser A. Local Tolerance Testing of Parenteral drugs: how to put into practice. Regulatory Toxicology and Pharmacology 2003;38:166-182.
- 6 The European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human Use. Guideline on the Limits of Genotoxic Impurities. CPMP/SWP/5199/02 - EMEA/CHMP/QWP/251344/2006. London, 28 June 2006.
- 7 Kroes R, Kleiner J, Renwick A. The Threshold of Toxicological Concern Concept in Risk Assessment. Toxicological Sciences 2005;86:226-230
- 8 ICH International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Impurities In New Drug Substances Q3A (R2). ICH Expert Working Group. Current Step 4 version: 25 October 2006.
- 9 ICH International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Impurities In New Drug Products Q3B (R2). ICH Expert Working Group. Current Step 4 version: 2 June 2006.
- 10 Müller L, Mauthe RJ, Riley CM, Andino MM et al. A rationale for determining, testing, and controlling specific impurities in pharmaceuticals that possess potential for genotoxicity. Regulatory Toxicology and Pharmacology 2006;44:198-211.
- 11 Goto N, Akama K. Histopathological studies of reactions in mice injected with aluminium-adsorbed tetanus toxoid. Microbiology and Immunology 1982;26(12):1121-32.
- 12 Verdier F, Burnett R, Michelet-Habchi C, Moretto P, Fievet-Groynne F, Sauzeat E. Aluminium assay and evaluation of the local reaction at several time points after intramuscular administration of aluminium containing vaccines in the Cynomolgus monkey. Vaccine 2005;23(11):1359-67.
- 13 Rennels MB, Deloria MA, Pichichoero ME, Englund JA, Anderson EL, Steinhoff MC et al. Lack of consistent relationship between quality of aluminium in diphtheria-tetanus-acellular pertussis vaccines and rates of extensive swelling reactions. Vaccine 2002;20(Suppl 3):S44-7.





14 Eickhoff TC, Myers M. Workshop summary. Aluminum in vaccines. Vaccine 2002;20(Suppl 3):S1-4.

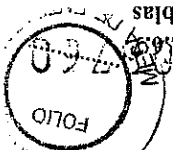
15 Chong H, Brady K, Metz D, Calonje E. Persistent nodules at injection sites (aluminum granuloma)-clinical pathological study of 14 cases with a diverse range of histological reaction patterns. Histopathology 2006;48(2):182-88.



ROXANA MONTMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.





Sección 2.6.7 Resumen de toxicología en tablas

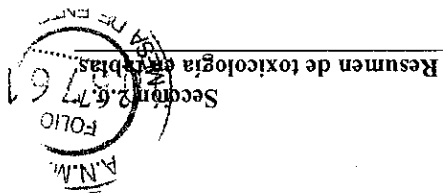
Índice

3	Lista de Abreviaturas.....
4	Toxicología: Panorama.....
6	Toxicología: Lista de productos analizados en los estudios de seguridad no clínica.....
6	Toxicidad de dosis única: Panorama de todos los estudios de dosis única.....
6	Toxicidad de dosis repetidas: Estudios no fundamentales.....
6	Toxicidad de dosis repetidas: Estudios fundamentales.....
8	Genotoxicidad: In Vitro.....
9	Genotoxicidad: In Vivo.....
10	Carcinogenia.....
11	Toxicidad reproductiva y del desarrollo (Estudios no fundamentales).....
12	Toxicidad reproductiva y del desarrollo: fertilidad y desarrollo embrionario temprano hasta la implantación.....
13	Toxicidad reproductiva y del desarrollo: efectos sobre el desarrollo embrionario.....
14	Toxicidad reproductiva y del desarrollo: efectos sobre el desarrollo prenatal y posnatal, incluida la función materna.....
15	Estudios en animales jóvenes.....
16	Tolerancia local.....
17	Otros estudios de toxicidad.....

Información confidencial/propietaria

Página 1 de 25

ROXANA MONTMILONE DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.
CHRISTIAN DOMINGUEZ APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.



Información confidencial/proprietaria

Página 2 de 25

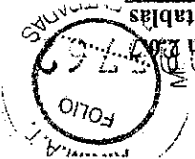
HOXANA MONTEILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.
APODERADO
CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
SANOFI PASTEUR S.A.



Lista de Abreviaturas

EMA	Agencia Europea de Medicamentos
F	Hembra
BPL	Buenas Prácticas de Laboratorio
IM	Intramuscular
M	Macho

Información confidencial/proprietaria
Página 3 de 25
ROXANA MONTMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
sanofi PASTEUR S.A.
CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
sanofi PASTEUR S.A.



1 Toxicología: Panorama

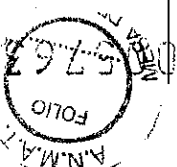
Artículo de prueba: Hexaxim

Tipo de Estudio	Especie	Método de administración	Duración de la dosificación	Dosis	Cumplimiento con las BPL	Institución de prueba	N.º de estudio	Ubicación del informe del estudio
Toxicidad de dosis repetidas	Conejo	Intramuscular (IM)	5 inyecciones a intervalos de 2 semanas	<ul style="list-style-type: none"> - Toxoide diftérico purificado ≥ 20 UI* - Toxoide tetánico purificado ≥ 40 UI* - Toxoide pertúsico purificado: 25 µg - Hemaglutinina filamentososa pertúsica purificada: 25 µg - Virus inactivado de la poliomielitis: Tipo 1 (Mahoney): Antígeno DT 40 unidades† Tipo 2 (MEF 1): Antígeno D 8 unidades - Tipo 3 (Saukett): Antígeno D 32 unidades - Polisacárido de <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b conjugado con proteína tetánica [proteína tetánica: 18-30 µg]; 12 µg (expresado como cantidad de polisacárido) - Antígeno de superficie de hepatitis B_S: 10 µg - Hidróxido de aluminio: 0,6 mg de aluminio 	Sí	TherImmune 15 Firstfield Road Gaithersburg, Maryland 20878, EE. UU.	1372-102	4.2.3.2

ROXANA RAMONTE MILONE CHRISTIAN DOMINGUEZ
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.

RED_00022947

Información confidencial/proprietaria
Página 4 de 25



Tipo de Estudio	Especie	Método de administración	Duración de la dosificación	Dosis	Cumplimiento con las BPL	Institución de prueba	N.º de estudio	Ubicación del informe del estudio
Toxicidad de dosis repetidas	Conejo	Intramuscular (IM)	5 inyecciones a intervalos de 2 semanas	<ul style="list-style-type: none"> - Toxoide diftérico purificado ≥ 20 UI* - Toxoide tetánico purificado ≥ 40 UI* - Toxoide pertúsico purificado: 25 µg - Hemaglutinina filamentosa pertúsica purificada: 25 µg - Virus inactivado de la poliomielitis: Tipo 1 (Mahoney): Antígeno Dt 40 unidades† Tipo (2) (MEF 1): Antígeno D 8 unidades - Tipo 3 (Saukett): Antígeno D 32 unidades - Polisacárido de <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b conjugado con proteína tetánica [proteína tetánica: 18-30 µg]; 12 µg (expresado como cantidad de polisacárido) - Antígeno de superficie de hepatitis B \leq: 10 µg - Hidróxido de aluminio: 0,6 mg de aluminio 	Sí	CIT BP 563, 27005 Evreux, Francia	HXI.RD-b09/03	4.2.3.2

ROXANA MONTMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFTI PASTEUR S.A.
CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFTI PASTEUR S.A.

RED_00022947

Información confidencial/propietaria
Página 5 de 25

