

Lot 109901  
Page 26 of 42  
Prot. 816/11

Residual barium (Specification:  $\leq 1$  mcg/mL)

Method A. A. Spectrophotometry  
Date of test December 13, 2010  
Result  $\leq 1$  mcg/mL

Residual sodium citrate (Specification:  $\leq 1$  mg/60 mcg HA)

Method HPLC  
Date of test December 09, 2010  
Result  $< 0.01$  mg/60 mcg HA

Residual Tween 80 (Specification:  $\leq 300$  mcg/mL)

Method HPTLC  
Date of test December 06, 2010  
Result  $< 300$  mcg/mL

Residual ovalbumin (Specification: Report result)

Method ELISA  
Date of test December 09, 2010  
Result 0.03 mcg/60 mcg HA

Residual formaldehyde (Specification:  $\leq 1$  mcg/60 mcg HA)

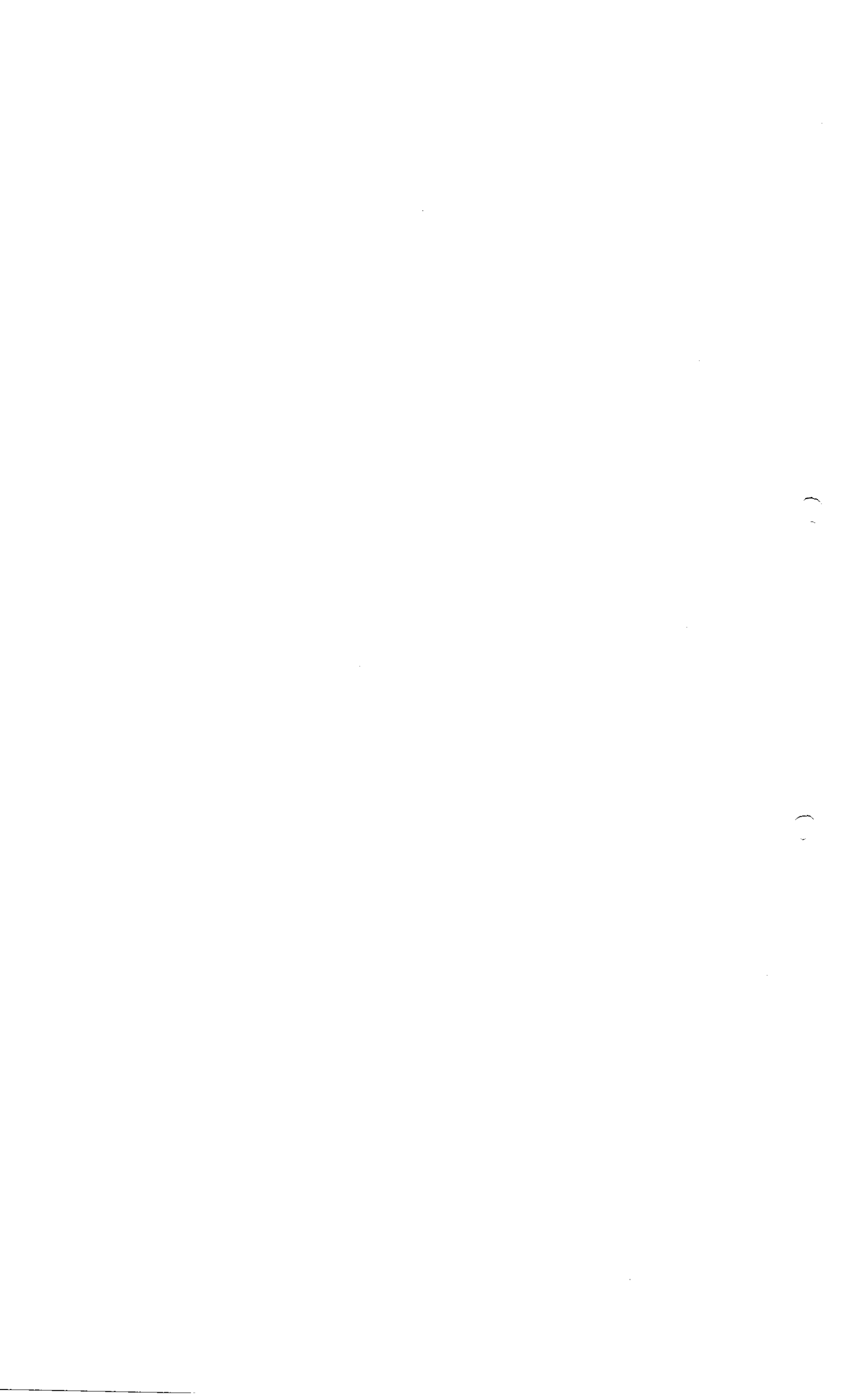
Method Colorimetric  
Date of test December 13, 2010  
Result 0.3 mcg/60 mcg HA

Sterility test (Specification: Sterile)

Method Eur. Ph., membrane filtration  
Media FTM and SCDM  
Volume tested 30 mL  
Date of test Dec. 02 – Dec. 16, 2010  
Result Sterile

Novartis Argentina S.A.  
Farm. Elsa Orosa  
Cta. Directora Técnica - M.N. 15.576  
Cta. de Asuntos Regulatorios  
Apoderada

Novartis Argentina S.A.  
Vaccinas S. D. O. S. S. C. S.  
Farm. Argentina, Buenos Aires  
Cta. de Asuntos Regulatorios  
Apoderada





Lot 109901  
Page 27 of 42  
Prot. 816/11

Test for inactivation (Specification: Absence of live virus)

Method	Hemagglutination
Date of test	December 03, 2010
Result	Absence of live virus

Endotoxin content (Specification: < 100 IU/60 mcg HA)

Method	LAL test
Date of test	December 09, 2010
Result	< 0.3 IU/60 mcg HA

Haemagglutinin antigen content (Specification: Report result)

Method	SRID
Date of test	December 09, 2010
Result	393 mcg HA/mL

Novartis Argentina S.A.  
Buenos Aires, Argentina  
Calle Corrientes 15575  
Código Postal 1427  
Teléfono: +54 11 4754-1000

Novartis Argentina S.A.  
Vicepresidente Comercial  
Pablo Acosta  
Cte. Atención Al Cliente  
Apoderada





Lot 109901  
Page 28 of 42  
Prot. 816/11

**SUMMARY PROTOCOL FOR PRODUCTION AND TESTING  
OF INFLUENZA VACCINE (SUB - UNIT)  
NYMC BX-35 MONOVALENT POOLED HARVEST**

**Lot 1121/10**

**Summary**

	Page
- Seed virus:	
General information on seed virus	29
Tests on master seed	30
Tests on working seed	30
- Monovalent pooled harvest lot 1121/10:	
Production details of monovalent pooled harvest	32
Tests on monovalent pooled harvest	33

Novartis Argentina S.A.  
Fam. Elsa Orosa  
Co-Directora Técnica - M.N. 15.575  
Cte. de Asuntos Regulatorios  
Apoderada

Novartis Argentina S.A.  
Vaccines - F.P. Médico  
Fam. de Orosa, Elsa  
Cte. Asuntos Regulatorios  
Apoderada





Lot 109901  
Page 29 of 42  
Prot. 816/11

**SEED VIRUS**

**General information on seed virus**

Name and address of manufacturer	Novartis Vaccines and Diagnostics Srl Via Fiorentina, 1 - Siena (Italy)
B virus strain	NYMC BX-35 (B/ Brisbane/60/2008 - like virus)
Primary seed lot	E5873
Source of primary seed	New York Medical College Valhalla, New York, USA
Date of receipt of primary seed	January 27, 2010
Number of passage of primary seed on receipt	9
Comment	None
Storage conditions of primary seed	- 80 ± 10°C
Master seed lot	MS-093 dil. (10 <sup>-6</sup> ) 10 <sup>-5</sup>
Date of manufacture of master seed	October 05, 2010
Number of passages from primary seed to master seed	3
Storage conditions of master seed	-80 ± 10°C
Working seed lot	WS-093-01 dil. (10 <sup>-5</sup> ) 10 <sup>-6</sup>
Date of manufacture of working seed	October 05, 2010
Number of passages from master seed to working seed	1
Added antibiotics	Kanamycin sulphate and neomycin sulphate
Storage conditions of working seed	- 80 ± 10°C

Novartis Argentina S.A.  
C.A.M. Elsa Orosa  
Unidad Técnica - M.N. 15.575  
Vta. de los Puertos Regulatorios  
Apunderada

Novartis Vaccines and Diagnostics  
Farm. Argentina S.A. S.R.L.  
C.A.M. Elsa Orosa  
Apunderada





Lot 109901  
Page 30 of 42  
Prot. 816/11

### Tests on master seed

#### Sterility test (Specification: Sterile)

Method	Eur. Ph., direct inoculation
Media	FTM and SCDM
Volume tested	20 mL
Date of test	Oct. 04 – Oct.18, 2010
Result	Sterile

### Tests on working seed

#### Sterility test (Specification: Sterile)

Method	Eur. Ph., direct inoculation
Media	FTM and SCDM
Volume tested	20 mL
Date of test	Oct. 06 – Oct.20, 2010
Result	Sterile

#### Test for mycoplasma (Specification: Sterile)

Method	Eur. Ph.
Media	Basic agar / broth and modified 1699 plus agar / broth
Volume tested	8.7 mL
Date of test	Oct. 11 – Nov. 08, 2010
Result	Sterile

#### Infectivity titre (Specification: $\geq 10^{5.0}$ EID<sub>50</sub>/mL)

Method	HA titration
Date of test	October 11, 2010
Result	$5 \times 10^{8.6}$ EID <sub>50</sub> /mL

Novartis Argentina S.A.  
Farm. Elise Orosa  
Quinta Técnica - M.N. 15.575  
Sist. de Arg. Regulatorios  
Aprobada

Novartis Argentina S.A.  
Vaccines & Biotechnology  
Farm. Elise Orosa  
Cte. Av. de los Regulatorios  
Aprobada





Lot 109901  
Page 31 of 42  
Prot. 816/11

Identity of neuraminidase (Specification: Positive for B strain)

Method ELISA  
Date of test October 26, 2010  
Result Positive for B strain

NI titre			
Antigen	Antiserum		
	[A(H1N1)] Anti-N1 NA A/California/7/2009 10/118	[A(H3N2)] Anti-N2 NA A/Perth/16/2009 10/182	[B] Anti-B NA B/Brisbane/60/2008 10/146
NYMC BX-35 Working seed Lot WS-093-01 dil. (10 <sup>-5</sup> ) 10 <sup>-6</sup>	24	15	713

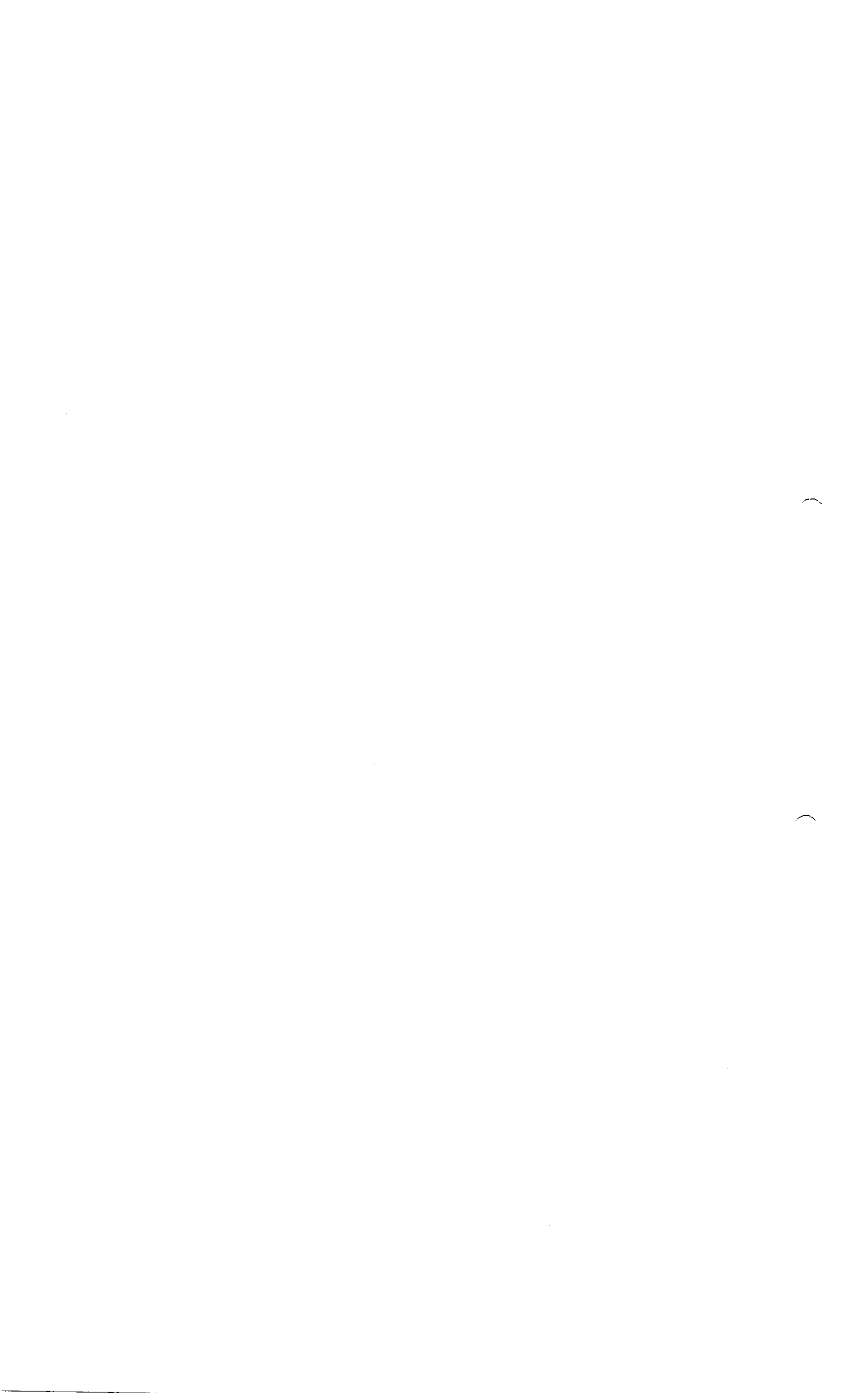
Identity of haemagglutinin (Specification: Positive for B strain)

Method Haemagglutination - inhibition test  
Date of test October 26, 2010  
Result Positive for B strain

HI titre			
Antigen	Antiserum		
	[A(H1N1)] X-181/10/118	[A(H3N2)] X-187/10/182	[B] BX-35/10/146
NYMC BX-35 Working seed Lot WS-093-01 dil. (10 <sup>-5</sup> ) 10 <sup>-6</sup>	20	20	640

Novartis Argentina S.A.  
Farm. Elba Orosa  
Co-Directora Técnica - M.N. 15.575  
Gto. de Asuntos Regulatorios  
Apoderada

Novartis Argentina S.A.  
Vacunas y Diagnóstico  
Farm. Elba Orosa  
Gto. Asuntos Regulatorios  
Apoderada





Lot 109901  
Page 32 of 42  
Prot. 816/11

## MONOVALENT POOLED HARVEST LOT 1121/10

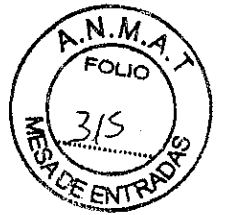
### Production details of monovalent pooled harvest

Name and address of manufacturer	Novartis Vaccines and Diagnostics Srl Via Fiorentina, 1 - Siena (Italy)
B virus strain	NYMC BX-35 (B/ Brisbane/60/2008 - like virus)
Working seed lot used in manufacture	WS-093-01 dil. ( $10^{-5}$ ) $10^{-6}$
Date of inoculation:	
Monovalent lot : 378/10	December 09, 2010
Monovalent lot : 379/10	December 10, 2010
Monovalent lot : 380/10	December 11, 2010
Added antibiotics	Kanamycin sulphate and neomycin sulphate
Date of harvesting:	
Monovalent lot : 378/10	December 13, 2010
Monovalent lot : 379/10	December 14, 2010
Monovalent lot : 380/10	December 15, 2010
Method of inactivation	Treatment with formaldehyde
Date of inactivation:	
Monovalent lot : 378/10	December 13, 2010
Monovalent lot : 379/10	December 14, 2010
Monovalent lot : 380/10	December 15, 2010
Concentration/purification procedure	Continuous zonal centrifugation in sucrose gradient, adsorption with barium sulphate and elution with sodium citrate solution

Novartis Argentina S.A.  
Farm. Elsa Orosa  
Dirección Técnica - M.N. 15.575  
Gte. de Asuntos Regulatorios  
ApoDERADA

Novartis Argentina S.A.  
Vaccines & Diagnostico  
Rafael Antonio G. Jimenez  
Gte. Asuntos Regulatorios  
ApoDERADA





Lot 109901  
Page 33 of 42  
Prot. 816/11

Date of pooling of monovalent lots	December 17, 2010
Method of disruption	Treatment with Tween 80 and CTAB
Date of disruption	December 20, 2010
Date of sterile 0.2 µm final filtration	December 27, 2010
Volume of monovalent pooled harvest	52,931 mL
Storage conditions of monovalent pooled harvest	2 - 8°C

**Tests on monovalent pooled harvest**

Identity of neuraminidase (Specification: Positive for B strain)

Method	ELISA
Date of test	January 10, 2011
Result	Positive for B strain

Identity of haemagglutinin (Specification: Positive for B strain)

Method	SRID
Date of test	January 10, 2011
Result	Positive for B strain

Purity (Specification: Evidence of HA bands and absence or traces of NP and M components)

Method	SDS-PAGE, reducing conditions
Date of test	January 04, 2011
Result	Evidence of HA bands and absence or traces of NP and M components

Residual CTAB (Specification: ≤ 12 mcg/60 mcg HA)

Method	Colorimetric
Date of test	December 31, 2010
Result	< 3 mcg/60 mcg HA

Novartis Argentina S.A.  
Farm. Elsa Orosa  
Co-Directora Técnica - M.N. 15.575  
Gte. de Asuntos Regulatorios  
Apoderada

Novartis Argentina S.A.  
Vaccines & Biotechnology  
Farm. Avellaneda, 2700  
Gte. de Asuntos Regulatorios  
Apoderada





Lot 109901  
Page 34 of 42  
Prot. 816/11

Residual barium (Specification:  $\leq 1$  mcg/mL)

Method	A. A. Spectrophotometry
Date of test	December 30, 2010
Result	$< 1$ mcg/mL

Residual sodium citrate (Specification:  $\leq 1$  mg/60 mcg HA)

Method	HPLC
Date of test	December 29, 2010
Result	$< 0.02$ mg/60 mcg HA

Residual Tween 80 (Specification:  $\leq 300$  mcg/mL)

Method	HPTLC
Date of test	January 04, 2011
Result	$< 300$ mcg/mL

Residual ovalbumin (Specification: Report result)

Method	ELISA
Date of test	December 30, 2010
Result	0.16 mcg/60 mcg HA

Residual formaldehyde (Specification:  $\leq 1$  mcg/60 mcg HA)

Method	Colorimetric
Date of test	January 04, 2011
Result	0.2 mcg/60 mcg HA

Sterility test (Specification: Sterile)

Method	Eur. Ph., membrane filtration
Media	FTM and SCDM
Volume tested	30 mL
Date of test	December 27, 2010 – January 10, 2011
Result	Sterile

Novartis Argentina S.A.  
Farm. Elisa-Orosa  
Av. Dirección Técnica - M.N. 15.575  
Calle de Asesoros Regulatorios  
Córdoba

Novartis Argentina S.A.  
Vacunas y Diagnóstico  
Farm. Acetana G. Gómez  
Cte. Asesoros Regulatorios  
Córdoba





Lot: 109901  
Page 35 of 42  
Prot. 816/11

Test for inactivation (Specification: Absence of live virus)

Method	Hemagglutination
Date of test	December 28, 2010
Result	Absence of live virus

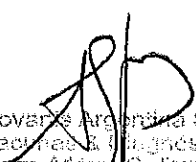
Endotoxin content (Specification: < 100 IU/60 mcg HA)

Method	LAL test
Date of test	January 05, 2011
Result	< 1 IU/60 mcg HA

Haemagglutinin antigen content (Specification: Report result)

Method	SRID
Date of test	December 28, 2010
Result	228 mcg HA/mL

Novartis Argentina S.A.  
Farm. Elsa Orosa  
Co-Directora Técnica - M.N. 15.575  
Gte. de Asuntos Regulatorios  
Apoderada

  
Novartis Argentina S.A.  
Ved. nac. & Diagnóstico  
Farm. Adriana G. Jimenez  
Gte. Asuntos Regulatorios  
Apoderada





Lot 109901  
Page 36 of 42  
Prot. 816/11

**SUMMARY PROTOCOL FOR PRODUCTION AND TESTING  
OF INFLUENZA VACCINE (SUB - UNIT)**

**FINAL LOT 109901**

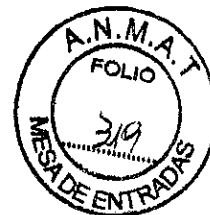
**Summary**

	Page
- Final bulk vaccine lot 1099:	
Information on blending	37
Tests on final bulk vaccine	39
- Final lot 109901:	
Production details of final lot	40
Tests on final lot	40

Novartis Argentina S.A.  
Farm. Elsa Orosa  
Co-Directora Técnica - M.N. 15.575  
Gte. de Asuntos Regulatorios  
Apoderada

Novartis Argentina S.A.  
Votación S. Delegado  
Farm. Elsa Orosa  
Gte. Asuntos Regulatorios  
Apoderado





Lot 109901  
Page 37 of 42  
Prot. 816/11

## FINAL BULK VACCINE LOT 1099

### Information on blending

Name and address of manufacturer

Novartis Vaccines and Diagnostics Srl  
Bellaria - Rosia, 53018 Sovicille - Siena (Italy)

Date of manufacturing

January 27, 2011

#### NYMC X-181 component

Monovalent pooled harvest lot  
Concentration  
Volume

1099/10  
293 mcg HA/mL  
19.782 mL

#### NYMC X-187 component

Monovalent pooled harvest lot  
Concentration  
Volume

1110/10  
396 mcg HA/mL  
8,200 mL

Monovalent pooled harvest lot  
Concentration  
Volume


1111/10  
393 mcg HA/mL  
6,486 mL

#### NYMC BX-35 component

Monovalent pooled harvest lot  
Concentration  
Volume

1121/10  
228 mcg HA/mL  
25,421 mL

  
Novartis Argentina S.A.  
Fam. Elsa Orosa  
Co-Directora Técnica - M.N. 15.571  
Gte. de Asuntos Regulatorios  
Apoderada

  
Novartis Argentina S.A.  
Vaccines and Diagnostics  
Fam. Adalgisa B. Di Menozzi  
Gte. Asuntos Regulatorios  
Apoderada





Lot 109901  
Page 38 of 42  
Prot. 816/11

Buffer A solution

Nature  
Volume

Buffered saline solution  
107,030 ml.

Buffer B solution

Nature  
Volume

MgCl<sub>2</sub> and CaCl<sub>2</sub> in distilled water  
1,080 mL

Final volume

168,000 mL

Storage conditions of final bulk vaccine

2 - 8°C

Novartis Argentina S.A.  
Farm. Elsa Orsá  
Co-Directora Técnica - M.N. 16.576  
Gto. de Asuntos Regulatorios  
Apoderada

Novartis Argentina S.A.  
Vacunas & Diagnóstico  
Farm. Adrián G. Jimenez  
Gto. Asuntos Regulatorios  
Apoderada





Lot 109901  
Page 39 of 42  
Prot. 816/11

**Tests on final bulk vaccine**

Residual ovalbumin (Specification:  $\leq 0.4$  mcg/mL)

Method	ELISA
Date of test	February 03, 2011
Result	0.2 mcg/mL

Residual formaldehyde (Specification:  $\leq 20$  mcg/mL)

Method	Colorimetric
Date of test	February 04, 2011
Result	$\leq 1$ mcg/mL

Sterility test (Specification: Sterile)

Method	Eur. Ph., membrane filtration
Media	FTM and SCDM
Volume tested	30 mL (from each container)
Date of test	Jan. 28 – Feb. 11, 2011
Result	Sterile

Endotoxin content (Specification:  $< 100$  IU/0.5 mL)

Method	LAL test
Date of test	January 31, 2011
Result	$< 1$ IU/0.5 mL

Novartis Argentina S.A.  
Farm. Elsa Orosi  
Co-Directora Técnica - M.N. 15.575  
Gte. de Asuntos Regulatorios  
Apoderada

Novartis Argentina S.A.  
Vaccines & Biologics Division  
Buenos Aires, Argentina  
Gte. Asuntos Regulatorios  
Apoderada





Lot 109901  
Page 40 of 42  
Prot. 816/11

**FINAL LOT 109901**

**Production details of final lot**

Name and address of manufacturer	Novartis Vaccines and Diagnostics Srl Bellaria - Rosia, 53018 Sovicille - Siena (Italy)
Date of filling	February 01, 2011
Filled volume	0.3 mL
Type of container	Pre-filled syringe
No. of final containers	135,810
Expiry date	December 2011
Storage conditions of final product	2 - 8°C, do not freeze

**Tests on final lot**

Haemagglutinin antigens content (Specification: LCL (\$)  $\geq$  6 mcg HA/0.25 mL for each strain)

Method	SRID
Date of test	February 07, 2011
Result:	

Strain	mcg HA/0.25 mL	
	Mean	LCL (\$)
NYMC X-181	8	8
NYMC X-187	8	8
NYMC BX-35	8	8

(\$) - LCL = Lower Confidence Limit,  $P = 0.95$

Novartis Argentina S.A.  
Ej. Elsa Orosa  
Co-Directora Técnica - M.N. 15.576  
Gte. de Asuntos Regulatorios  
Apoderada

Novartis Argentina S.A.  
Vaccines & Diagnostics  
Farm. Adriana Jimenez  
Gte. Asuntos Regulatorios  
Apoderada





Lot 109901  
Page 41 of 42  
Prot. 816/11

Identity of haemagglutinin (Specification: Positive for A(H3N2), A(H1N1) and B strain)

Method	SRID
Date of test	February 07, 2011
Result	Positive for A(H3N2), A(H1N1) and B strain

pH (Specification: 6.9 - 7.7)

Method	Potentiometric
Date of test	February 08, 2011
Result	7.5

Appearance (Specification: Colourless clear liquid)

Method	Visual examination
Date of test	February 08, 2011
Result	Colourless clear liquid

Withdrawable content (Specification:  $\geq 0.25$  mL)

Method	Eur. Ph.
Date of test	February 11, 2011
Result	0.29 mL

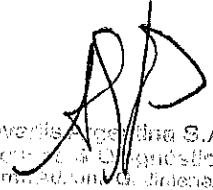
Protein content less HA antigens (Specification:  $\leq 60$  mcg/0.25 mL)

Method	Micro Kjeldahl
Date of test	February 07, 2011
Result	15 mcg/0.25 mL

Endotoxin content (Specification:  $< 50$  IU/0.25 mL)

Method	LAL test
Date of test	February 07, 2011
Result	$< 0.2$ IU/0.25 mL

  
Novartis Argentina S.A.  
Farm. Elsa Gross  
Co-Directora Técnica - M.N. 15.576  
Gte. de Asuntos Regulatorios  
Apoderada

  
Novartis Argentina S.A.  
Veedor de O. y M. de B. S.  
Farm. Elsa Gross  
Gte. Asuntos Regulatorios  
Apoderada





Lot 109901  
Page 42 of 42  
Prot. 816/11


Sterility test (Specification: Sterile)

Method	Eur. Ph., membrane filtration
Media	FTM and SCDM
No. of containers tested	40
Date of test	Feb. 04 – Feb. 18, 2011
Result	Sterile


**CERTIFICATION**

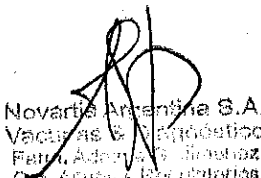
I herewith certify that Final Lot No. 109901 of Influenza Vaccine (sub-unit) was manufactured and tested according to the procedures approved by competent authorities and complies with the quality requirements.

I also certify that no materials derived from ruminants (bovine, ovine, caprine), included within the scope of the current EMEA/CPMP "Note for Guidance on minimizing the risk of transmitting animal spongiform encephalopathy agents via medicinal products", were used in the manufacture and/or formulation of the batch of product specified above.

  
Dr. Stefano Viti  
Quality Assurance / Qualified Person

  
Date

  
Novartis Argentina S.A.  
Farm. Elsa Orosa  
Co-Directora Técnica - M.N. 15.576  
Gte. de Asuntos Regulatorios  
Apoderada

  
Novartis Argentina S.A.  
Vaccinas e Inmunológico  
Farm. Adolfo G. Juncos  
Gte. Asuntos Regulatorios  
Apoderada



## INFORMACION PRECLINICA

La información descripta a continuación se deriva de los estudios realizados a Agrippal.

El presente registro intenta aprobar la vacuna con el nombre comercial Virafly.

### 1 Resumen preclínico

Virafly es una vacuna trivalente contra la influenza, de antígeno de superficie, inactivada. Es una suspensión para inyección estéril, en una jeringa prellenada de 0,5 ml. Una dosis única de 0,5 ml de Agrippal está indicada para la prevención activa de la influenza en adultos y niños de 36 meses de edad y mayores. En niños de 6-35 meses de edad que no hayan sido vacunados previamente, se administra una dosis de 0,25 o 0,5 ml, seguida de una segunda dosis después de un intervalo de al menos cuatro semanas.

Virafly contiene antígenos de superficie hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) purificados de las tres cepas de virus de influenza, tipo A y tipo B, recomendados anualmente para inmunización por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Las cepas de virus de la influenza son cultivadas en forma individual en huevos de gallina embrionados libres de patógenos específicos (SPF) e inactivadas por tratamiento con formaldehído antes de la purificación de los antígenos de superficie y la formulación final.

Una dosis individual de Agrippal contiene 15 µg de antígeno hemaglutinina de cada una de las tres cepas de virus de la influenza, para un total de 45 µg de antígeno HA por dosis. La potencia de la vacuna se expresa como la concentración de la proteína HA. La composición de la vacuna se muestra en la tabla a continuación.

**Tabla 2.4-1 Composición de Virafly (por dosis de 0,5 ml)**

Componentes de la Vacuna	Cantidad	Propósito
Antígenos de superficie del virus de la influenza		
HA de Influenza tipo A (símil H1N1)	≥ 15 µg	Principio activo
HA Influenza tipo A (símil H3N2)	≥ 15 µg	Principio activo
HA Influenza Tipo B	≥ 15 µg	Principio activo
Cloruro de sodio	4,00 mg	auxiliar de isotonicidad
Cloruro de potasio	0,10 mg	buffer
Fosfato diácido de potasio	0,10 mg	buffer
Fosfato disódico dihidrato	0,66 mg	buffer
Cloruro de magnesio	0,05 mg	estabilizador
Cloruro de calcio	0,06 mg	estabilizador
Agua para inyección	hasta 0,5 ml	diluyente

La composición de Virafly cambia anualmente con respecto a los componentes activos (de acuerdo con recomendaciones de la OMS), por lo que cada año se realiza un ensayo clínico para monitorear el perfil de inmunogenicidad y la tolerabilidad de la vacuna final. Todos los demás componentes no activos de la vacuna son componentes bien establecidos en productos farmacéuticos.

Novartis Argentina S.A.  
Farm. Elisa Grossa  
Co-Directora Técnica - M.N. 15.576  
Gte. de Asuntos Regulatorios  
Apoderada

Novartis Argentina S.A.  
Vacunas & Diagnóstico  
Farm. Adrián G. Jiménez  
Gte. Asuntos Regulatorios  
Apoderada



La producción de antígenos de la influenza utilizando la tecnología en base a huevo es un proceso bien establecido, y las vacunas contra la influenza tienen un buen perfil de seguridad clínica. Virafu/Agrippal está aprobado en más de 50 países en todo el mundo, incluyendo Francia, Alemania, Italia, Suecia y el Reino Unido, así como otros países de la Unión Europea.

La evaluación preclínica de Virafu/Agrippal (antígeno de superficie, inactivada) incluye estudios de inmunogenicidad (ratones, conejos y hurones), exposición (ratones y hurones), seguridad general/toxicidad anormal (ratones y cobayos), toxicidad de dosis repetidas (conejos), y toxicidad reproductiva y del desarrollo (conejos). Novartis también ha realizado estudios preclínicos en varias especies con Virafu/Agrippal administrado por otras vías (datos disponibles a pedido).

Se comparó una formulación de Agrippal con adyuvante MF59 con Agrippal en muchos de los estudios preclínicos incluidos en este dossier. Agrippal con adyuvante MF59 es equivalente a Fluad®, una vacuna trivalente interpandémica de Novartis. Fluad® está autorizado en 12 países europeos, así como fuera de Europa.

#### **2.4.1 Descripción de la estrategia de ensayos preclínicos**

La estrategia preclínica de Agrippal se basó en los siguientes lineamientos:

- Guía para la Industria: Evaluación de seguridad preclínica de productos farmacéuticos derivados de biotecnología S6 (1997)
- Guía para la Industria: Estudios de seguridad preclínica para la realización de ensayos clínicos en seres humanos para productos farmacéuticos M3 (1997)
- Guía para la Industria: Consideraciones para estudios de toxicidad del desarrollo de para vacunas preventivas y terapéuticas para indicaciones de enfermedades infecciosas (2006)
- Detección de toxicidad para la reproducción de medicamentos ICH S5A (FDA, 1994) CPMP/SWP/465/95: Nota orientativa sobre ensayos preclínicos farmacológicos y toxicológicos de vacunas
- Informe Técnico de OMS N° 927.2005: Lineamientos de OMS sobre evaluación preclínica de vacunas

El efecto farmacológico deseado de Agrippal es la inducción de inmunidad contra la infección por influenza y la protección de enfermedades relacionadas, que está mediada principalmente por anticuerpos anti-hemaglutinina. El programa preclínico examinó inmunogenicidad, eficacia (estudios de exposición), toxicidad anormal, reactogenicidad local, toxicidad sistémica, y toxicidad reproductiva y del desarrollo. Debido a que Agrippal ha sido autorizado desde hace muchos años en varios países, las formulaciones de las vacunas utilizadas en la mayoría de los estudios preclínicos fueron lotes comerciales.

Los estudios toxicológicos GLP en conejos utilizaron la dosis y vía de administración (intramuscular) clínicas. Se evaluó la seguridad de dos dosis (separadas por 1 o 2 semanas), y se incluyó un período de recuperación para evaluar los efectos retardados. Agrippal fue bien tolerada y no hubo indicación de toxicidad local o sistémica.

Los estudios GLP de toxicidad reproductiva y del desarrollo en conejos demostraron que Agrippal no es tóxico para la madre, fetotóxico o teratogénico, y que no es perjudicial para el desarrollo de la generación F<sub>1</sub>.

Novartis Argentina S.A.  
Farm. Elsa Orosa  
Co-Directora Técnica - M.N. 15.578  
Gte. de Asuntos Regulatorios  
Apoderada

Novartis Argentina S.A.  
Vacunas & Diagnóstico  
Farm. Adriana G. Jiménez  
Gte. Asuntos Regulatorios  
Apoderada



El régimen clínico para la población general (adultos y niños de 36 meses y más) es la administración de una dosis única de Agrippal. Los estudios de toxicología general evaluaron un régimen de dos dosis (N+1). Para la población más joven para que Agrippal está previsto (6 a 35 meses de edad, no vacunados previamente), el régimen de clínica es de 2 dosis administradas aproximadamente con 4 semanas de diferencia. En este caso, los estudios toxicológicos evaluaron la dosis y el régimen clínicos previstos más altos (dos dosis de 0,5 ml) y un esquema comprimido (dosis separadas por 1 o 2 semanas). El hecho de que las dosis N+1 no fueran probadas para la indicación en bebés no se considera una deficiencia debido a que el apoyo primario para la seguridad en edades de 6 a 35 meses es proporcionado por los datos clínicos.

Los datos de inmunogenicidad, eficacia y seguridad preclínicas, en combinación con los datos clínicos, apoyan la seguridad y la inmunogenicidad de Agrippal.

#### **2.4.2 Farmacología**

Se realizaron estudios en ratones, conejos y hurones. Los estudios fundamentales con Agrippal en ratones incluyen la evaluación de la respuesta de anticuerpos en ratones seropositivos y seronegativos, respuesta linfoproliferativa, respuesta a la dosis, duración de la respuesta, y protección contra la exposición. La administración de Agrippal produjo títulos de anticuerpos y protegió contra la exposición a influenza hasta 200 días después de la vacunación.

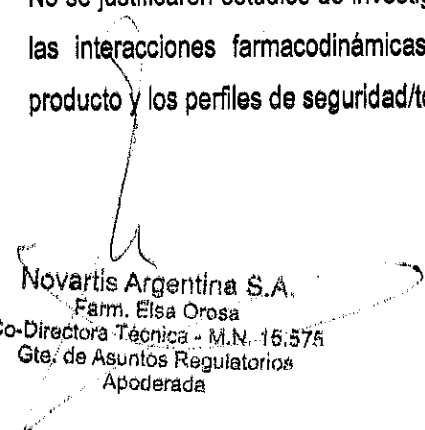
La inmunogenicidad se evaluó en conejos machos y hembras durante uno de dos estudios de toxicología GLP en dosis repetidas. Agrippal fue bien tolerado e inmunogénico en conejos. En dos estudios GLP de reproducción y desarrollo, se administró a conejas la dosis clínica de Agrippal tres veces antes del apareamiento y en dos ocasiones durante la gestación. Agrippal fue inmunogénico en las conejas, y se detectaron anticuerpos en los fetos y las crías F<sub>1</sub>.

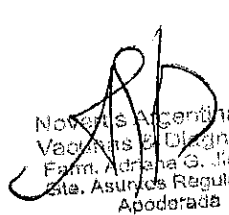
Agrippal fue evaluado en el modelo de exposición en hurón. Dos dosis de Agrippal con una diferencia de tres semanas produjeron niveles protectores de anticuerpos, y aunque los animales vacunados mostraron algunos síntomas de influenza después de la exposición, la pérdida de peso corporal, el aumento de la temperatura corporal, y los recuentos de leucocitos se redujeron en comparación con el grupo control negativo.

No se realizaron estudios de farmacodinamia secundaria y seguridad farmacológica. El principio activo de Agrippal consiste en antígenos proteicos purificados, y los constituyentes inactivos de la vacuna son componentes bien establecidos de productos farmacéuticos. La amplia experiencia clínica no indica ningún motivo de preocupación con respecto a efectos farmacodinámicos indeseables sobre la función fisiológica.

Los estudios en ratones, conejos y hurones demostraron que la inmunización con Agrippal produjo una respuesta de anticuerpos específica para el antígeno, y se demostró protección contra la exposición con el virus de influenza en modelos de ratón y hurón.

No se justificaron estudios de investigación de farmacología secundaria, seguridad farmacológica, o las interacciones farmacodinámicas entre medicamentos sobre la base de la naturaleza del producto y los perfiles de seguridad/tolerabilidad preclínicos y clínicos existentes.

  
Novartis Argentina S.A.  
Farm. Elsa Orosa  
Co-Directora Técnica - M.N. 15.575  
Gte. de Asuntos Regulatorios  
Apoderada

  
Novartis Argentina S.A.  
Vacunas y Diagnóstico  
Farm. Adriana G. Jimenez  
Gte. Asuntos Regulatorios  
Apoderada



### **Pruebas de inmunogenicidad de antígenos de influenza en ratones**

En este estudio no GLP, se comparó la inmunogenicidad de antígenos de influenza derivados de huevos y derivados de cultivos de células MDCK (Estudio N° KOE 050601).

Trece ratones por grupo recibieron dos dosis de 0,5 ml por vía intraperitoneal (día 0 y 7) de material de proceso de vacuna de subunidad convencional derivada de huevos (granel monovalente de Agrippal) o material a granel, purificado por cromatografía, derivado de células MDCK (monovalente y trivalente). Las preparaciones de antígeno se ajustaron a 15 µg de HA por dosis de 0,5 ml para las formulaciones monovalentes (45 µg en total de trivalente). No se utilizó adyuvante. Los animales de control recibieron solución salina tamponada con fosfato. Se recolectó el suero en el día 21 y se realizaron pruebas de inmunogenicidad en muestras de suero individuales (formulación trivalente) o en dos grupos separados de suero para las formulaciones monovalentes (ratones 1-6 y ratones 7-13 agrupados) para anticuerpos inhibidores de hemaglutinación (HI), contra HA homólogos y heterólogos. Como se muestra a continuación, los ratones desarrollaron los mismos títulos de anticuerpos HI contra la HA de la cepa inmunizante de las dos fuentes diferentes. Los pares de antígeno comparados son equivalentes en términos de reactividad homóloga, así como para la reactividad heteróloga, ya que no hubo diferencia estadísticamente significativa.

Los títulos homólogos de HI para antígenos derivados de huevos y de MDCK fueron comparables.

### **Respuestas de anticuerpos con vacunas contra influenza en ratones jóvenes y viejos**


En este estudio no GLP (N° 94-0184), grupos de 9 ratones jóvenes (3 meses de edad) y viejos (18 meses de edad) fueron vacunados dos veces con la vacuna (conteniendo 9 µg de HA total de 3 cepas de virus de influenza, A/Beijing (X-117)/32/92, A/Texas (X-113)/36/91 y B/Panamá 45/90, en un volumen de 200 µl). La vacuna se administró por vía subcutánea, sola o en combinación con adyuvante MF59. Los animales control fueron tratados con PBS. Los títulos de anticuerpos específicos para el antígeno se midieron después de la segunda inmunización.

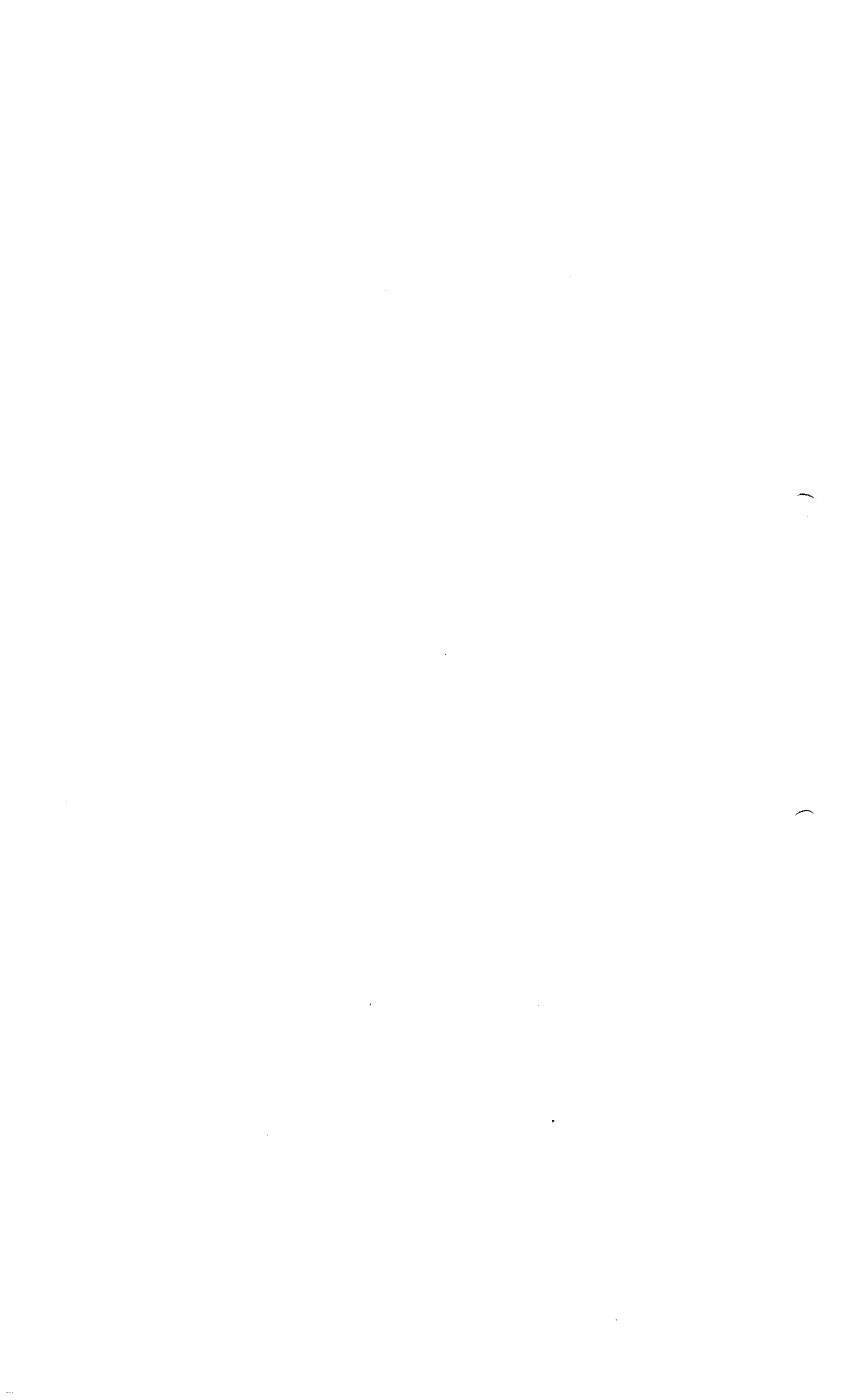
La inmunización con Agrippal provocó respuesta de anticuerpos específicos para el antígeno, tanto en ratones jóvenes como viejos. La respuesta en ratones jóvenes fue de 21 a 72 veces mayor que en los ratones viejos, dependiendo del antígeno. La adición de adyuvante MF59 a la vacuna aumentó la respuesta en ratones jóvenes de 12 a 31 veces, y en ratones viejos de 19 a 253 veces, dependiendo del antígeno. No hubo respuesta de anticuerpos en los animales de control tratados con PBS.

### **Respuesta linfoproliferativa con vacunas contra la influenza en ratones jóvenes y viejos**

En una continuación del estudio antes citado, no GLP (N° 94-0184), dos semanas después de la segunda vacunación subcutánea, todos los animales fueron sacrificados, se retiraron los bazo, y se prepararon suspensiones unicelulares individuales que se cultivaron in vitro. Las células de todos los grupos fueron estimuladas con virus de influenza (cepa no especificada) durante 6 días. Las muestras de control de células de todos los grupos fueron tratadas también con ovoalbúmina durante 6 días o PHA durante 3 días. La proliferación celular se determinó midiendo la incorporación de timidina radiactiva, que se añadió a los pocillos durante 24 horas. El Índice de Estimulación se calculó como la relación de recuentos medios por minuto por pocillo en presencia y ausencia de estímulo del virus de influenza.

Novartis Argentina S.A.  
Farm. Elsa Oroso  
Co-Directora Técnica - M.N. 15.576  
Gte. de Asuntos Regulatorios  
Apoderada

  
Novartis Argentina S.A.  
Vacunas S. Diagnóstico  
Farm. Adrián B. Jimenez  
Gte. Asuntos Regulatorios  
Apoderada



Los ratones ancianos tuvieron una respuesta linfoproliferativa tres veces menor a Agrippal sin adyuvante que los ratones jóvenes, y una respuesta 2 veces inferior a Agrippal administrado con MF59 ( $p < 0,26$ ) que los ratones jóvenes. La presencia del adyuvante aumentó la respuesta linfoproliferativa en ratones jóvenes en 1,85 veces en promedio, y en ratones viejos en 3 veces en promedio (lo que alcanzó significación estadística). Los valores P para A/Beijing, A/Texas y B/Panamá fueron 0,0596, 0,0351 y 0,0215, respectivamente.

#### **Respuesta de anticuerpos en ratones seropositivos jóvenes y viejos**

En este estudio no GLP (N° 93-847), se investigó la respuesta de anticuerpos a Agrippal (con y sin MF59) en ratones seropositivos previamente infectados con el virus de la influenza.

Grupos de 10 ratones jóvenes y viejos (de cepa y edad no especificada) se infectaron por vía intranasal con una cepa de virus de influenza adaptado al ratón (A/Taiwán/1/86) y se permitió la recuperación durante 10 semanas. Los ratones fueron inmunizados luego una vez con Agrippal (que contenía 9 µg de HA total de 3 cepas de virus de influenza A/Beijing 353/89, A/Taiwán 1/86 y B/Panamá 45/90, en un volumen de 200 µl). La vacuna se administró por vía subcutánea, sola o en combinación con el adyuvante MF59. Un grupo control fue tratado con PBS. Se tomaron muestras de sangre el día antes de la inmunización y después de 2 semanas, y los sueros se analizaron por ELISA para anticuerpos contra los 3 antígenos de influenza.

Los títulos séricos pre-Inmunización (post-infección) contra A/Taiwán en animales jóvenes fueron aproximadamente seis veces más altos que en los ratones viejos. Ni los animales jóvenes ni los viejos previamente infectados tenían títulos de reactividad cruzada a A/Beijing o B/Panamá antes de la inmunización.

La inmunización con Agrippal reforzó los títulos de anticuerpos de A/Taiwán, tanto en ratones seropositivos jóvenes como viejos (en 5 y 3 veces, respectivamente), y generó títulos de anticuerpos contra A/Beijing y B/Panamá. Los ratones jóvenes tuvieron una respuesta inmunogénica significativamente mayor a los tres antígenos que los ratones viejos.


La adición de MF59 a la vacuna no tuvo efecto sobre las respuestas a los tres antígenos en ratones jóvenes, pero aumentó de manera significativa ( $P = 0,0287$ ) la respuesta en ratones viejos en 2,5 a 7 veces, dependiendo del antígeno.

#### **Respuestas de anticuerpos a varias dosis de vacuna contra la influenza en ratones**

En este estudio no GLP (N° 94-0307, 94-0214 y 94-0215) grupos de 15 ratones Balb/c de ocho semanas fueron inmunizados en el día 0 y el día 28 con varias dosis de Agrippal que contenía antígeno HA de cada una de las cepas del virus de influenza siguientes: A/Texas 36/91 (X-113), A/Beijing 32/32 (X-117) y B/Panamá (18-19/93A). Todas las dosis de antígeno se administraron por vía intramuscular en un volumen de 0,25 ml mezclado con 0,25 ml de PBS o MF59. Las dosis de antígeno variaron de 0,4 a 0,002 µg de HA cuando se administraron con PBS, y de 0,04 a 0,0002 µg de HA cuando se administraron con MF59. En los días 42, 98 y 182, se recolectaron muestras de sangre y analizaron los sueros por ELISA para anticuerpos contra cada antígeno. No se incluyó un grupo control en este estudio.

Para los tres antígenos, las respuestas de anticuerpos aumentaron con la dosis de antígenos administrados, y el efecto se mantuvo hasta el día 182. Para los tres antígenos, fue evidente un

Novartis Argentina S.A.  
Farm. Elsa Orosa  
Co-Directora Técnica - M.N. 15.575  
Gte. de Asuntos Regulatorios  
Apoderada

  
Novartis Argentina S.A.  
Vacunas y Diagnóstico  
Farm. Adriana G. Jimenez  
Gte. Asuntos Regulatorios  
Apoderada

