

valor límite a 0,0006 µg de HA, la inmunización con dosis inferiores a de este no provocaron respuesta inmune. En general, la presencia de MF59 en la vacuna aumentó la respuesta de anticuerpos en 20 a 300 veces dependiendo del antígeno.

Como se observa en los experimentos anteriores, la mejora de la respuesta de anticuerpos fue más evidente en los ratones viejos, sin embargo también fue evidente un fuerte efecto adyuvante de MF59 en los animales jóvenes.

#### **Respuesta a la dosis de Agrippal en ratones BALB/c hembras de 8 semanas y 18 meses de edad**

El Estudio N° MF-1/MF-2 2003/04 (no-GLP) evaluó la relación dosis-respuesta cuando varias cantidades de vacuna de subunidad, trivalente, contra la influenza (Agrippal) se combinaron con cantidades fijas de MF59C.1 (relación de volumen a volumen de 1:1), manteniendo el volumen de la inyección constante. El estudio evaluó también la capacidad de MF59 para mejorar la respuesta de anticuerpos (ELISA e inhibición de la hemaglutinación) en ratones BALB/c adultos jóvenes (8 semanas de edad) y viejos (18 meses de edad).

Se inmunizaron ratones jóvenes y viejos (10 por grupo) por vía subcutánea con una vacuna contra la influenza, trivalente, de subunidad que contenía los siguientes antígenos: A/New Caledonia/20/99 (H1N1), A/Panamá/2007/99 (H3N2) y B Shandong/7/97 (B), sola o combinada con MF59. La vacuna fue probada en las siguientes dosis: 0,4, 0,13, 0,04, 0,01, 0,003 y 0,001 µg. Cada ratón fue inmunizado en los días 1 y 21, y exanguinado en el día 35.

Se determinaron los títulos de anticuerpos específicos para antígenos por ELISA y HI (no se realizó HI contra el virus H1N1 debido a la limitación en la disponibilidad del suero).

En los animales que recibieron dos inyecciones subcutáneas de Agrippal no adyuvado, los títulos de ELISA fueron mayores en los ratones jóvenes en comparación con los ratones viejos. Los títulos de ELISA en ratones jóvenes que recibieron 0,4 o 0,13 µg de antígenos por cepa fueron similares, y la reducción de la cantidad de antígeno administrado resultó una reducción en los títulos. En ratones viejos, Agrippal sin adyuvante fue menos inmunogénico, y sólo la cepa H3N2 produjo títulos de anticuerpos medibles a niveles de antígeno de menos de 0,04 µg. Los resultados fueron similares utilizando el ensayo de HI.

#### **Carga viral relativa post-exposición en pulmones de ratones inmunizados**

En una continuación de los trabajos no GLP descritos anteriormente (Estudio N° 94-0307, 94-0214 y 94-0215), los mismos ratones fueron expuestos por vía intranasal a 5 veces la DL<sub>50</sub> de la cepa del virus de influenza A/Taiwán/86 el día 56, o con 9 veces la DL<sub>50</sub> de la misma cepa en los días 126 o 200. Cinco ratones de cada grupo fueron sacrificados 3 a 5 días después de cada exposición, y los preparados de pulmón lisado de estos animales fueron examinados en cuanto a títulos virales relativos utilizando un ensayo in vitro.

Grupos de control de 2 o 3 ratones no tratados previamente fueron expuestos de manera similar en los días 56, 126 y 200, y se evaluaron las cargas virales pulmonares.

La inmunización previa con Agrippal causó una disminución dependiente de la dosis en la carga viral presente en los pulmones de los animales expuestos al virus de influenza (cepa A/Taiwán/86) 56, 126 y 200 días más tarde.

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

Novartis Argentina S.A.  
Vacunas y Diagnóstico  
Farm. Mariana Jiménez  
Gte. Asuntos Regulatorios  
Apoderada



La vacunación con una dosis de antígeno sin adyuvante de 13 µg o más dio títulos virales medios en el pulmón de menos de 50, mientras que cuando se administró con MF59, dosis de antígeno de 0,005 µg dieron títulos virales medios en el pulmón de menos de 50. Así, la presencia del adyuvante redujo la dosis de antígeno necesaria para producir una reducción similar en la carga viral del pulmón en 26 veces.

#### **Modelo de exposición en ratón**

En otra continuación del trabajo no GLP descrito anteriormente (Estudio N° 94-0307, 940214 y 94-0215), 10 ratones por grupo fueron monitoreados en cuanto a supervivencia durante 14 días después de la exposición con virus de influenza en los días 56, 126 o 200. También se incluyeron en el estudio grupos de control de 10 ratones no inmunizados (naïve).

La protección contra la exposición fue dependiente de la dosis, aumentando con la dosis de antígeno, y el efecto se mantuvo hasta el día 200. La inmunización con la vacuna más MF59 mejoró la supervivencia, permitiendo un 100% de protección a dosis de antígeno 65 a 80 veces menores que la vacuna no adyuvada. Los ratones control (naïve) no estuvieron protegidos en los días 56 y 200, sin embargo, se observó 20% de protección en el día 126. Esto puede haber sido un artefacto del estudio o el resultado de inmunidad adquirida de forma natural.

#### **Inmunogenicidad en conejos**

Se evaluó la inmunogenicidad en tres estudios de toxicología utilizando el ensayo de inhibición de la hemaglutinación. Agrippal fue inmunogénico en conejos machos y en hembras nulíparas y no preñadas. Agrippal también fue inmunogénico en conejas preñadas, y se detectaron anticuerpos en los fetos y las crías.

#### **Estudio de toxicidad intramuscular de dos dosis de la formulación de vacuna contra la influenza en conejos Nueva Zelanda Blancos (Estudio N° 191-44)**

Conejos de Nueva Zelanda Blancos recibieron dos inyecciones intramusculares con una semana de diferencia. Grupos de 6 animales por sexo recibieron placebo (solución salina tamponada con fosfato), el artículo de prueba (vacuna FCC) o una vacuna de comparación (Agrippal). La vacuna Agrippal y FCC contenían 15 µg de antígeno de cada una de tres cepas para un total de 45 µg. Las tres cepas utilizadas incluyeron B/Guangdong/120/00, A/New Caledonia/20/99 y A/Panamá/2007/99. La mitad de los animales fueron sometidos a necropsia en el día 10 (machos) u 11 (hembras), el resto en el día 22 (machos) o 23 (hembras). Se recolectó suero para análisis de anticuerpos de todos los animales en los días del estudio 1 y 8. Se recolectaron muestras adicionales de la mitad de los animales antes de la necropsia (día 10 u 11, necropsia terminal). Para los demás animales, las muestras fueron recolectadas el día 15 y antes de la necropsia de recuperación el día 22 o 23. Se realizaron ensayos de inmunogenicidad bajo condiciones no-GLP.

Los resultados de anticuerpos séricos inhibidores de la hemaglutinación (HI) contra dos de las cepas (A/New Caledonia y B/Guangdong) no mostraron título pre-tratamiento y un aumento en el título después de la segunda dosis de la vacuna FCC o Agrippal (vacuna de referencia). No hubo título contra estas cepas en los animales control. Por el contrario, hubo títulos de fondo contra la cepa A/Panamá en los animales control y pre-tratamiento en los animales tratados con la vacuna

Novartis Argentina S.A.  
Farm. Elsa Orcoza  
Co-Directora Técnica - M.N. 15.877  
Gte. de Asuntos Regulatorios  
Apoderada

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



FCC y Agrippal, que se atribuyeron a unión no específica. Sin embargo, pudo observarse una tendencia hacia el aumento de cantidades del título de anticuerpos A/Panamá después de la segunda dosis de la vacuna.

**Estudio de toxicidad reproductiva y del desarrollo intramuscular de la vacuna Agrippal en conejos, incluyendo una evaluación post-natal (Estudio N UBA00040)**

Se evaluó la inmunogenicidad en este estudio de toxicidad GLP de reproducción y desarrollo en conejos. Se asignaron conejas (27 por grupo) a los Grupos I, II, III o IV. Los animales de los Grupos I y II fueron sometidos a cesárea en el día de gestación 29 y los de los Grupos III y IV tuvieron parto en forma natural (ver la tabla a continuación). Todos los animales recibieron cinco inyecciones de 0,5 ml por vía intramuscular de solución salina (Grupos I y III) o Agrippal (Grupos II y IV). Cada dosis clínica de Agrippal contenía un total de 45 µg de antígeno (15 µg de HA de cada una de tres cepas). Se administraron tres inyecciones pregestación los días 1, 15 y 29 para garantizar que los anticuerpos a Agrippal se produjeran antes del apareamiento y la gestación. Se administraron dos inyecciones adicionales en los días 7 (tiempo de implantación) y 20 (final de la organogénesis principal) de la gestación.

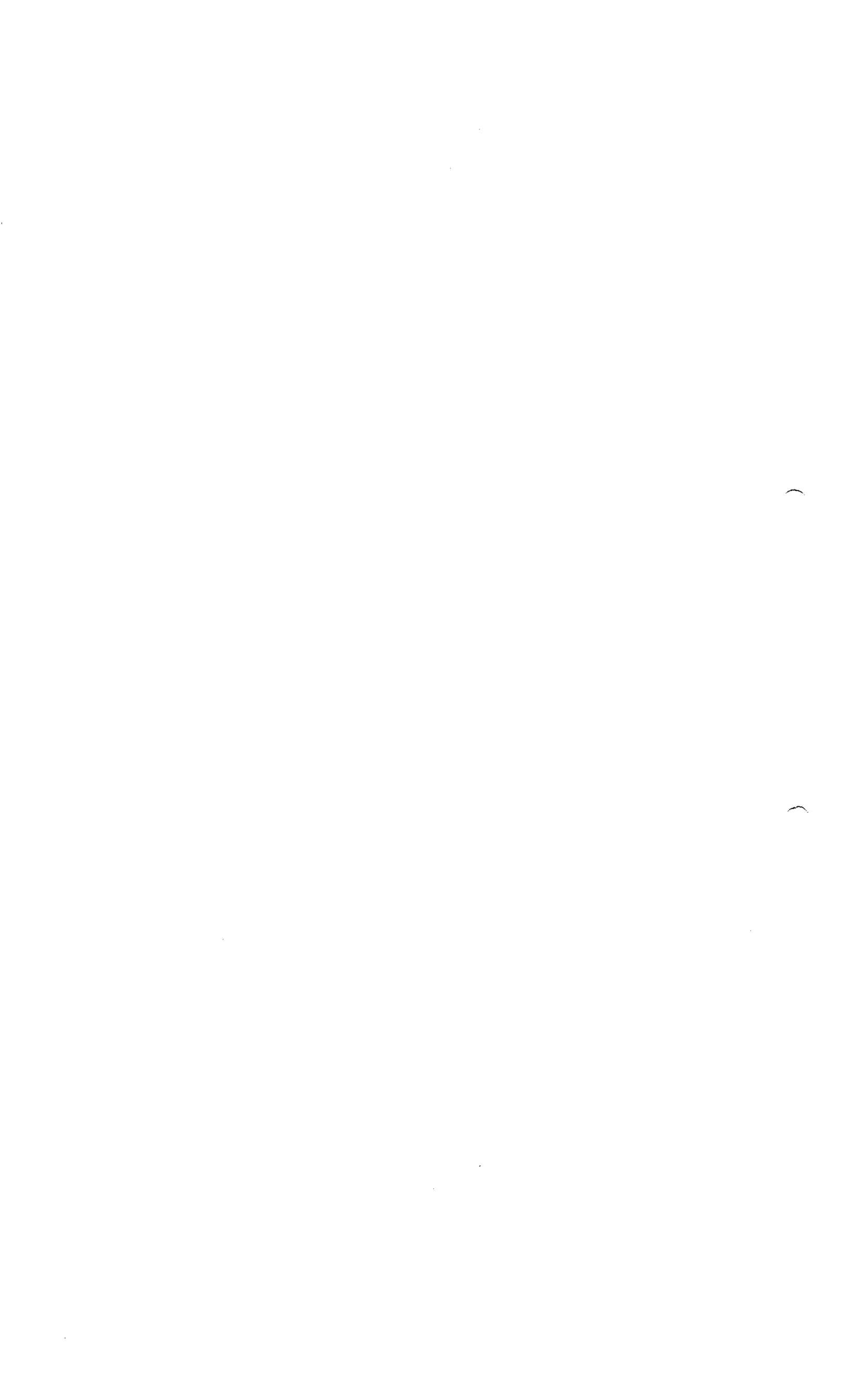
Se recolectó sangre y se preparó el suero durante el estudio para medir los niveles de anticuerpos anti-Agrippal en las madres y sus fetos (agrupados por camada) o crías. La inmunogenicidad se evaluó (no GLP) mediante el ensayo de inhibición de la hemoaglutinación (HI). Un subconjunto de muestras fue analizada contra la cepa de influenza A (H1N1) IVR-116 (cepa simil A/New Caledonia/20/99).

Se observaron niveles similares de anticuerpos se observaron en los conejos del Grupo II en los días 29 del estudio y día 7 de gestación, y en los conejos del Grupo II y IV en el día 20 de gestación. Los títulos disminuyeron en el Grupo II en el día 29 de gestación y en el Grupo IV en el día 29 de lactancia. En general, los títulos en suero fetal fueron similares a los títulos maternos en el día 29 de gestación. Los títulos en la descendencia F<sub>1</sub> fueron generalmente más bajos en comparación con los títulos maternos en el día 29 de lactancia.

**Estudio de toxicidad reproductiva y del desarrollo intramuscular de la vacuna Agrippal en conejos, incluyendo una evaluación post-natal (Estudio N° UBA00043)**

Este estudio GLP se inició después de la pérdida apreciable de camadas/descendencia en los grupos control y tratado con Agrippal en el Estudio N° UBA00040. Se asignaron conejas (27 por grupo) al Grupo I (control) o el Grupo II (Agrippal). Todos los animales recibieron cinco inyecciones de 0,5 ml por vía intramuscular de solución salina (grupo I) o Agrippal (Grupo II). Cada dosis clínica de Agrippal contenía un total de 45 µg de antígeno (15 µg de HA de cada una de las tres cepas). Se administraron tres inyecciones antes del apareamiento en los días 1, 15 y 29 para garantizar que los anticuerpos a Agrippal se produjeran antes del apareamiento y la gestación. Se administraron dos inyecciones adicionales en los días 7 y 20 de gestación. Se permitió que las conejas parieran sus camadas en forma natural y las madres y las crías fueron seguidas hasta la eutanasia en el día 29 de lactancia.

Se recolectó sangre y se preparó el suero durante el estudio para medir los niveles de anticuerpos anti-Agrippal en las madres y su descendencia. La inmunogenicidad se evaluó (no GLP) mediante el



ensayo de inhibición de la hemoaglutinación (HI). Un subconjunto de muestras fue analizada contra la cepa de influenza A H1N1 simil Solomon Islands/3/2006.

No se detectaron anticuerpos en muestras de animales de control en ningún punto de tiempo examinado. Se midieron anticuerpos neutralizantes contra una cepa de influenza A (H1N1) simil Salomón Islands/3/2006 en el suero de los animales del Grupo II. Los títulos de anticuerpos en el Grupo II fueron detectables en el día 15 del estudio (dos semanas después de una sola inyección) antes del apareamiento y en general fueron más altos en el día 20 de gestación (dos semanas después de la cuarta inyección). Al día 29 de lactancia los títulos de anticuerpos en las madres habían disminuido. Los títulos en la descendencia el día 29 de lactancia fueron inferiores a los títulos maternos correspondientes, y se confirmó la transferencia de anticuerpos.

### **Inmunogenicidad y exposición en hurones**

Los hurones se han establecido como un buen modelo animal para el estudio de la infección y la vacunación con virus de influenza (Potter 1975, Sweet 1999). En este modelo, los animales pueden no haber recibido tratamiento anteriormente (naïve) o haber sido cebados con un virus heterólogo. Los animales son inmunizados a continuación una o más veces con una vacuna candidata y/o de control. Después de la inmunización, los animales son expuestos a virus vivos. La cantidad de virus utilizados para infectar a los animales se establece mediante la evaluación de los efectos de varias diluciones en animales no tratados anteriormente. La infectividad se evalúa sobre la base de signos clínicos, peso corporal y temperatura corporal, presencia de anticuerpos en suero y células inflamatorias y virus en lavados nasales.

Como se mencionó anteriormente, y dependiendo del tipo de vacuna contra la influenza en estudio, los hurones pueden ser inmunológicamente no tratados o pueden haber sido cebados con un virus heterólogo antes de las fases de vacunación y exposición del estudio. Con las vacunas de subunidades en general, Potter et al. han demostrado que las respuestas inmunológicas de los hurones se incrementan cuando los animales reciben virus heterólogo antes de la vacunación y la exposición (virus homólogo a la vacuna).

Novartis ha llevado a cabo estudios de exposición con Agrippal (como vacuna de control positivo en comparación con la vacuna de FCC; BB-IND 11580) en hurones utilizando ambos enfoques. Después de la experimentación con el modelo (Estudios N° CB001 a CB006; los informes del estudio están disponibles a solicitud) llegamos a la conclusión de que un diseño de estudio que utiliza el cebado con virus heterólogos optimiza la capacidad de evaluar vacunas de subunidades altamente purificadas. El Estudio N° CBI-PCS-007, que se considera un estudio de exposición fundamental, se realizó con el método de cebado heterólogo.

### **Estudio fundamental de exposición en hurones**

#### **Determinación de la eficacia de una vacuna contra la influenza en el modelo de exposición experimental en hurones (Estudio N° CBI-PCS-007)**

En este estudio fundamental no GLP, la eficacia de Agrippal (llamado Agrippal S1 en el informe del estudio) en comparación con la vacuna de FCC se evaluó mediante el modelo de exposición en hurón. Antes del inicio del estudio, se implantó a los hurones transpondedores para la identificación y recopilación de datos de temperatura corporal. En el día 0, tres grupos de 8 machos por cada

