

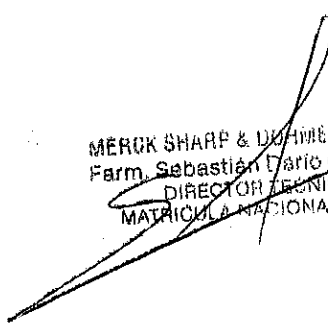
procesos se llevan a cabo con un método estéril de sistema cerrado. Todas las conexiones al sistema de formulación se esterilizan mediante un ciclo validado de esterilización in situ, o bien están soldadas en forma estéril.

En cuanto al llenado de jeringas y viales, todos los pasos de los procesos se llevan a cabo de manera aséptica, dentro de un aislador de barrera con ambiente controlado, o con un método estéril de sistema cerrado. La conexión entre el tanque portátil de producto tetravalente adsorbido a granel y el trayecto húmedo se esteriliza mediante un ciclo validado de esterilización in situ. En cuanto a la línea de llenado de viales, estos se lavan en el lavador de viales, y se esterilizan y se eliminan los pirógenos mediante el paso a través del túnel continuo de eliminación de pirógenos antes de entrar en el aislador de barrera de Clase 100 a través del alimentador de barrera. Los tapones esterilizados en bolsas se transfieren por medio de una compuerta de transferencia esterilizable al interior del aislador de barrera. En cuanto a la línea de llenado de jeringas, antes del llenado; la tapa y el revestimiento de las tinas llenas de jeringas preesterilizadas se retiran automáticamente en un área de Clase 100. Después del llenado, las jeringas se tapan inmediatamente con émbolos preesterilizados.

#### 1.11 Edificio 38: Monitoreo microbiológico del ambiente

Se estableció un plan de monitoreo ambiental para garantizar que las áreas clasificadas y las instalaciones operen a un nivel aceptable de control. En las zonas críticas de los procesos de llenado de viales y llenado de jeringas se realiza un monitoreo de áreas críticas, que incluye pruebas para partículas suspendidas en el aire, microbios suspendidos en el aire y microbios en las superficies. Además, se realiza un monitoreo de partículas suspendidas en el aire en las áreas servidas por los sistemas de calefacción, ventilación y aire acondicionado y en las áreas conectadas a dispositivos con filtros HEPA. No se realizan pruebas para zonas críticas en el módulo de formulación, ya que no es una zona crítica del proceso.

  
Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.  
Jose Berone  
Aprobado

  
MERCK SHARP & DOHME ARG. INT  
Farm. Sebastián Dario Galderisi  
DIRECTOR TÉCNICO  
MATRÍCULA NACIONAL 15438

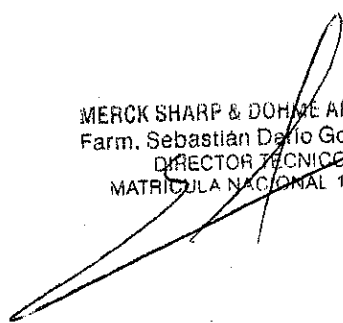


También se realiza un monitoreo sistemático, que incluye pruebas para microbios suspendidos en el aire y partículas suspendidas en el aire, en las áreas clasificadas. Las instalaciones certificadas que sirven a los módulos de formulación, llenado de viales y llenado de jeringas (por ej., las de aire comprimido, agua inyectable y vapor limpio) se monitorean sistemáticamente. El agua inyectable se monitorea mediante pruebas para endotoxinas y microbios y con las pruebas químicas y físicas de la USP/Ph. Eur (color y aspecto). El vapor limpio se monitorea mediante pruebas para endotoxinas y las pruebas químicas y físicas de la USP (color y aspecto). Los gases certificados se monitorean mediante pruebas para microbios y partículas y pruebas de identidad. Se llevan a cabo investigaciones con relación a todos los resultados recurrentes de nivel de alerta o que requieran tomar medidas pertinentes. Las investigaciones incluyen análisis de tendencias de los datos ambientales, análisis de causas de fondo y la medida o medidas correctivas aplicables, aunque no se limitan únicamente a ello.

Se realizan pruebas de exposición de los medios que simulan todos los pasos relevantes, tiempos de espera, condiciones de procesamiento y cualesquiera otras operaciones para los pasos subsecuentes a la esterilización final. Se completaron exitosamente tres pruebas de exposición, tanto para la formulación como para el llenado, como parte de la certificación inicial de las líneas, y se han llevado a cabo con éxito 16 pruebas de exposición adicionales para la línea de llenado de viales, como parte de su evaluación periódica.



  
Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.  
**José Merone**  
**Apoderado**

  
MERCK SHARP & DOHME ARG. INC  
Farm. Sebastián De la Goldent  
DIRECTOR TÉCNICO  
MATRICULA NACIONAL 15436



## INFORMACION PRECLINICA Y CLINICA


### PARTE A

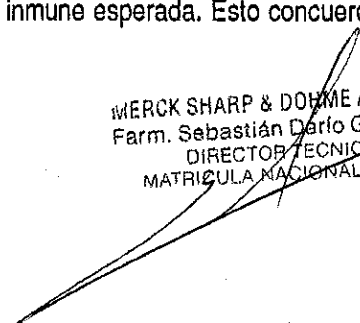
#### 1. Panorámica de la estrategia de pruebas no clínicas

Esta panorámica no clínica se presenta como sustento para el registro de un esquema de vacunación fijo con GARDASIL® † (L-000931225 o L-931225). GARDASIL®, también conocida como Vacuna recombinante contra el virus del papiloma humano (tipos 6, 11, 16, 18), es una vacuna tetravalente preparada a partir de las partículas parecidas a virus (PPV) altamente purificadas, compuestas de la proteína recombinante de la cápside mayor (proteína L1) del VPH de los tipos 6, 11, 16 y 18. Las proteínas L1 se producen mediante fermentaciones por separado en levaduras recombinantes y se autoensamblan para formar las partículas parecidas a virus. Las partículas parecidas a virus de cada tipo se purifican y se adsorben en una formulación patentada de sulfato hidroxifosfato de aluminio amorfo (adyuvante de aluminio de Merck). La vacuna recombinante tetravalente contra el virus del papiloma humano se prepara combinando las partículas parecidas a virus adsorbidas de cada tipo de VPH.

GARDASIL® está indicada para la inmunización de las personas, a fin de prevenir el cáncer, las lesiones precancerosas o displásicas, las verrugas genitales y la infección causadas por el VPH de los tipos 6, 11, 16 y 18. GARDASIL® se administra por vía intramuscular en un esquema de tres dosis, en el cual la segunda dosis se aplica dos meses después de la primera, y la tercera dosis se aplica seis meses después de la primera. Cada dosis de 0.5 ml contiene aproximadamente 20 µg de PPV de L1 del tipo 6, 40 µg de PPV de L1 del tipo 11, 40 µg de PPV de L1 del tipo 16, 20 µg de PPV de L1 del tipo 18 y 225 µg de aluminio del adyuvante de aluminio de Merck.

La evaluación farmacológica de GARDASIL® se centró en una evaluación de la farmacodinámica primaria (es decir, la inmunogenicidad), ya que la vacuna no mostró ningún efecto aparte de la respuesta inmune esperada. Esto concuerda con la "Nota sobre directrices

  
Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.  
José Nerone  
Apoderado

  
MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.  
Farm. Sebastián Darío Goldentul  
DIRECTOR TÉCNICO  
MATRICULA NACIONAL 15436



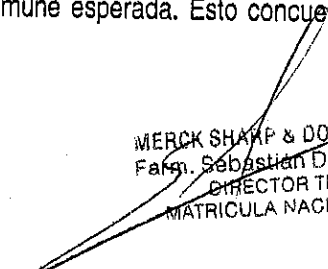
relativas a las pruebas farmacológicas y toxicológicas preclínicas de las vacunas" ("Note for Guidance on Preclinical Pharmacological and Toxicological Testing of Vaccines" - CPMP/SWP/465/95) de la EMEA (Agencia Europea para la Evaluación de Productos Medicinales, Ref. 4.3: 1) y con las "Directrices sobre la evaluación no clínica de las vacunas", de la OMS (Organización Mundial de la Salud) (Ref. 4.3: 2). Se realizaron cinco estudios de la farmacodinámica primaria de GARDASIL®, no sujetos a las GLP (buenas prácticas de laboratorio), en tres especies de primates no humanos: monos verdes africanos (*Cercopithecus* sp.), chimpancés (*Pan troglodytes*) y monos rhesus (*Macaca mulatta*). Los objetivos de dichos estudios fueron determinar si la vacuna desencadenaba una respuesta inmune específica contra las partículas parecidas a virus del VPH, examinar la duración de la respuesta y determinar si era necesario el adyuvante de aluminio de Merck para una inmunogenicidad óptima. Los estudios también estaban diseñados para determinar si la antigenicidad de los cuatro tipos de partículas parecidas a virus que contiene GARDASIL® era similar, y si la respuesta inmune a las partículas parecidas a virus de cada tipo, al combinarlas en una formulación tetravalente, era similar a la que se lograba mediante la vacunación con una formulación monovalente de partículas parecidas a virus.

La toxicología no clínica de GARDASIL® se evaluó en cinco estudios, efectuados en distintas etapas del desarrollo preclínico y clínico de la vacuna. Estos fueron un estudio de toxicidad de dosis única en ratones, un estudio de toxicidad de dosis única en ratas, un estudio de toxicidad de dosis repetidas en ratones, un estudio de toxicidad reproductiva y del desarrollo en ratas y un estudio de tolerancia local en conejos. Los cinco estudios de toxicología se realizaron en condiciones de buenas prácticas de laboratorio (GLP), y cumplen con las recomendaciones de la "Nota sobre directrices relativas a las pruebas farmacológicas y toxicológicas preclínicas de las vacunas" (CPMP/SWP/465/95) de la EMEA (Ref. 4.3: 1) y con las "Directrices sobre la evaluación no clínica de las vacunas", de la OMS (Ref. 4.3: 2).

## 2. Farmacología

La evaluación farmacológica de GARDASIL® se centró en una evaluación de la farmacodinámica primaria (es decir, la inmunogenicidad), ya que la vacuna no mostró ningún efecto aparte de la respuesta inmune esperada. Esto concuerda con "Nota sobre directrices

  
Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.  
José Verone  
Apoderado

  
MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.  
Fabr. Sebastián Darío Goldentul  
DIRECTOR TECNICO  
MATRICULA NACIONAL 15436

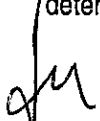


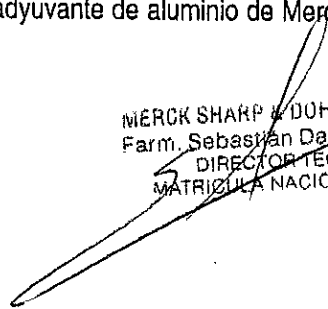
relativas a las pruebas farmacológicas y toxicológicas preclínicas de las vacunas" (CPMP/SWP/465/95) de la EMEA (Ref. 4.3: 1) y con las "Directrices sobre la evaluación no clínica de las vacunas", de la OMS (Ref. 4.3: 2).

## 2.1 Farmacodinámica primaria

La farmacodinámica primaria de algunos de los componentes individuales en forma de partículas parecidas a virus de GARDASIL<sup>®</sup>, así como la formulación completa de GARDASIL<sup>®</sup>, se evaluaron en cinco estudios de farmacodinámica primaria, no sujetos a las GLP (buenas prácticas de laboratorio), en monos verdes africanos, chimpancés y monos rhesus. Dichos estudios se diseñaron para examinar la inmunogenicidad de la vacuna y para determinar si era necesario el adyuvante de aluminio de Merck para una mayor inmunogenicidad. Esto concuerda con las "Directrices sobre la evaluación no clínica de las vacunas", de la OMS (Ref. 4.3: 2), las cuales recomiendan que se demuestre el efecto del adyuvante en estudios preclínicos de inmunogenicidad. La respuesta inmune se vigiló usando un radioinmunoanálisis competitivo (RIAc) (Ref. 4.3: 3), un inmunoanálisis Luminex<sup>®</sup> competitivo (IALc) o un análisis de inmunosorbente ligado a enzimas competitivo (ELISA competitivo, o EIAC). Tales análisis emplean anticuerpos monoclonales, que reconocen cada tipo de partícula parecida a virus de VPH y se ligan a los epitopos conformacionales específicos que han demostrado neutralizar la infección. La eficacia protectora contra el VPH de los tipos 6, 16 y 18 no podía demostrarse en condiciones preclínicas, ya que no hay modelos en animales de infección por el VPH de estos tipos (6, 16 y 19); sin embargo, hay un modelo de neutralización del VPH de tipo 11 en xenoinjertos (Ref. 4.3: 5). En dicho modelo con VPH de tipo 11 en xenoinjertos, se emplearon sueros de seres humanos inmunizados con el VPH de tipo 11 para neutralizar la infección del tejido epitelial con viriones de VPH de tipo 11. Los títulos de los sueros humanos medidos por RIAc mostraron una correlación con el potencial para neutralizar la infección por el VPH de tipo 11 (Ref. 4.3: 6). Ya que no hay un modelo en animales para los cuatro tipos de VPH que refleje la infección en seres humanos, la evaluación apropiada para estos experimentos preclínicos era la de inmunogenicidad.

El primer estudio de inmunogenicidad se llevó a cabo en monos rhesus, y se diseñó para determinar si era necesario el adyuvante de aluminio de Merck a fin de obtener una respuesta

  
Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.  
**José Nerone**  
Apoderado

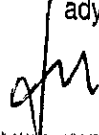
  
MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.  
Farm. Sebastián Darío Goldentul  
DIRECTOR TÉCNICO  
MATRÍCULA NACIONAL 15436

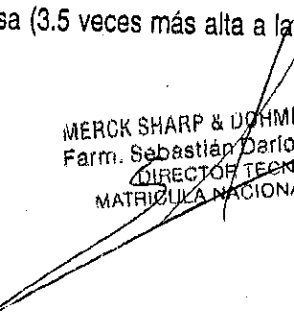


342

inmune más intensa contra las partículas parecidas a virus de la vacuna. Dos grupos de animales recibieron vacuna recombinante monovalente de PPV de L1 del VPH de tipo 16: un grupo (n = 3) recibió una formulación sin el adyuvante de aluminio y el segundo grupo (n = 3) recibió una formulación con el adyuvante de aluminio. La vacuna se administró en un esquema de tres dosis (a los 0, 2 y 6 meses), y se obtuvo suero en varios puntos a lo largo del estudio, incluidos el día de la inmunización y dos semanas después de cada vacunación. La vacuna fue inmunogénica en los seis animales, y la respuesta inmune fue congruente con un efecto típico de dosis de sensibilización y refuerzo. El grado al cual se desencadenó la respuesta de anticuerpos neutralizantes específicos contra las PPV de L1 del VPH 16 con la formulación de VPH 16 que contenía el adyuvante de aluminio fue notablemente más intenso (16 veces más a las dos semanas después de la tercera dosis), en comparación con la formulación de VPH 16 sin el adyuvante. Estos resultados demuestran que, en los primates no humanos, se genera una respuesta inmune específica contra las partículas parecidas a virus de VPH al recibir la vacunación con PPV de L1 del VPH de tipo 16, y que el nivel de respuesta de los anticuerpos puede incrementarse sustancialmente cuando la vacuna se formula con adyuvante de aluminio.

El segundo estudio de inmunogenicidad se realizó en chimpancés, y se diseñó para demostrar, en un modelo distinto en primates no humanos, que era necesario el adyuvante de aluminio de Merck para obtener una mayor respuesta inmune contra las partículas parecidas a virus de la vacuna. Dos grupos de animales recibieron una vacuna monovalente de PPV de L1 del VPH de tipo 16: un grupo (n = 2) recibió una formulación sin el adyuvante de aluminio y el segundo grupo (n = 4) recibió una formulación con el adyuvante de aluminio. La vacuna se administró en un esquema de tres dosis (a los 0, 2 y 6 meses), y se obtuvo suero en varios puntos a lo largo del estudio, incluidos el día de la inmunización y dos semanas después de cada vacunación. Un animal al que se administró la vacuna sin adyuvante no presentó una respuesta inmune serológica detectable. La vacuna fue inmunogénica en los otros cinco animales, y fue congruente con un efecto típico de dosis de sensibilización y refuerzo. Una vez más, el nivel de la respuesta de anticuerpos neutralizantes específicos contra las PPV de L1 del VPH 16 que se obtuvo en los animales inmunizados con la formulación de VPH 16 más el adyuvante de aluminio fue más intensa (3.5 veces más alta a las cuatro semanas después de

  
Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.  
José Verone  
Apoderado


  
MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.  
Farm. Sebastián Darío Goldentul  
DIRECTOR TÉCNICO  
MATRÍCULA NACIONAL 15436



la tercera dosis), que en el animal que sí presentó una respuesta inmune a la formulación de VPH 16 sin el adyuvante. La diferencia en los títulos se mantuvo a lo largo de 6 meses (2.9 veces más alta en los animales inmunizados con VPH 16 más adyuvante). El incremento en las respuestas contra el VPH asociado con las formulaciones que contienen el adyuvante de aluminio representa una ventaja que muy probablemente se traduzca en una mayor eficacia en condiciones clínicas.

El tercer estudio de inmunogenicidad se realizó en monos verdes africanos, y se diseñó para demostrar una respuesta inmune de anticuerpos neutralizantes específicos contra las PPV de L1 monovalentes del VPH de tipo 18 en primates no humanos. En este caso, se administraron PPV de L1 del VPH 18 formuladas con adyuvante de aluminio de Merck en un esquema de tres dosis (a los 0, 2 y 6 meses) a cuatro monos. Cada uno de los cuatro animales presentó una respuesta inmune mensurable después de la primera dosis, y le siguió una respuesta anamnésica típica después de la segunda y la tercera dosis. Estos resultados demuestran que, al igual que las partículas parecidas a virus del VPH de tipo 16, las partículas parecidas a virus de L1 del VPH de tipo 18 son altamente inmunogénicas.

El cuarto estudio de inmunogenicidad se realizó en monos verdes africanos, y se diseñó para determinar si la respuesta inmune a las partículas parecidas a virus de cada tipo, mezcladas en una formulación tetravalente, era similar a la que se lograba mediante la vacunación con una formulación monovalente de partículas parecidas a virus. Cinco grupos de 6 a 8 animales recibieron un esquema de tres dosis, ya fuera de vacunas monovalentes de PPV de L1 de VPH de los tipos 6, 11, 16 o 18 formuladas con adyuvante de aluminio, o de una vacuna tetravalente de PPV de VPH de los tipos 6, 11, 16 y 18 formulada con adyuvante de aluminio. El esquema de tres dosis se administró en forma de inyección intramuscular de una dosis de 0.5 ml a los 0, 2 y 6 meses. Los 34 animales presentaron respuestas de anticuerpos específicos a las partículas parecidas a virus de los cuatro tipos de VPH. El esquema de dosificación produjo una respuesta característica de sensibilización y refuerzo, y los títulos disminuyeron con el tiempo después de cada dosis. Sin embargo, los títulos elevados se mantuvieron durante un lapso más largo después de las dosis sucesivas, es decir, la declinación en los títulos después de la tercera dosis fue gradual y prolongada en


  
Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.  
Jose Verone  
Apodado

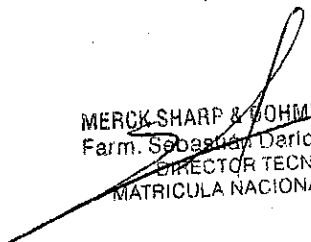
  
MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.  
Farm. Sebastian Dario Goldentul  
DIRECTOR TECNICO  
MATRICULA NACIONAL 15436



comparación con la declinación después de la primera o la segunda dosis. Los títulos que alcanzaron los animales inmunizados con las vacunas monovalentes a menudo fueron ligeramente más altos, aunque dentro del mismo rango logarítmico, en comparación con los que presentaron los animales que recibieron vacunas tetravalentes de las mismas dosis. A fin de determinar si los anticuerpos producidos eran neutralizantes, en un subconjunto de sueros tomados a la semana 14 se analizó la capacidad para neutralizar la infección por partículas parecidas a virus de células C33A, una estirpe de cáncer cervicouterino negativa para el VPH (Ref. 4.3: 7). Se analizaron los sueros de cinco animales de cada grupo en cuatro análisis de pseudoneutralización, que investigaron la entrada de las partículas parecidas a virus del VPH de los tipos 6, 11, 16 y 18 en las células. Los sueros de todos los animales inmunizados fueron capaces de inhibir específicamente la entrada de las partículas parecidas a virus, lo cual neutralizó efectivamente la infección. Estos resultados demuestran que la antigenicidad de los cuatro componentes de la vacuna tetravalente GARDASIL® son similares, y que se genera una respuesta inmune de anticuerpos específicos contra los cuatro tipos de partículas parecidas a virus que la constituyen. Además, el perfil de la respuesta inmune es tal que se provoca la aparición de anticuerpos neutralizantes contra las partículas parecidas a virus de cada tipo específico de VPH presente en la vacuna, como se demuestra por el análisis de pseudoneutralización de la entrada de las partículas parecidas a virus.

El quinto estudio de inmunogenicidad se realizó en macacos rhesus, y se diseñó para examinar la clase y la subclase de los anticuerpos producidos después de la inmunización. Se administró a cinco animales la vacuna recombinante tetravalente contra el virus del papiloma humano (tipos 6, 11, 16, 18), formulada con adyuvante de aluminio de Merck, y a otros cinco animales la vacuna recombinante tetravalente contra el virus del papiloma humano sin adyuvante de aluminio de Merck. La vacuna se administró en un esquema de tres dosis, a los 0, 2 y 6 meses, y se obtuvo suero en varios puntos a lo largo del estudio, incluidos el día de la inmunización, dos semanas después de cada vacunación y a las 52 semanas. La vacuna fue inmunogénica en los diez animales, y fue congruente con un efecto típico de sensibilización y refuerzo. Los animales que recibieron la vacuna tetravalente con adyuvante exhibieron una respuesta inmune entre 1 y 2 log más alta que los animales que recibieron la vacuna tetravalente sin adyuvante. También se evaluaron la respuesta de IgG total y el perfil de

  
Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.  
Jose Berone  
Apooderado

  
MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.  
Farm. Sebastian Darío Goldentul  
DIRECTOR TECNICO  
MATRICULA NACIONAL 15436

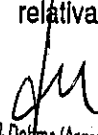


isotipos, en forma de títulos de dilución en el punto final, mediante inmunoanálisis no competitivos con Luminex®. Las respuestas de IgG total a las PPV de L1 del VPH de los tipos 6, 11, 16 y 18 fueron similares para todos los tipos. Los títulos de la IgG total de punto final que se alcanzaron después de la tercera dosis fueron en conjunto aproximadamente 2 logs mayores en los animales que recibieron la vacuna tetravalente sin adyuvante. El perfil global de isotipos en ambos grupos de animales fue similar, independientemente de que hubieran recibido el adyuvante o no. La vacuna desencadenó una respuesta predominantemente de linfocitos T auxiliares de tipo 2 (T<sub>H</sub>2, por sus siglas en inglés), con altos niveles de IgG1 e IgG4 y bajos niveles de IgG2. También se produjeron altos niveles de IgA, lo cual puede ser importante para brindar inmunidad a las mucosas del aparato genital. Esto ha sido confirmado por Lowe y cols., quienes demostraron que la vacunación de monos verdes africanos con partículas parecidas a virus del VPH de tipo 11 desencadenaba una respuesta inmune específica contra las partículas parecidas a virus tanto en el suero como en las secreciones cervicovaginales (Ref. 4.3: 8).

En conjunto, estos resultados demuestran que la vacuna tetravalente formulada con adyuvante de aluminio induce una vigorosa respuesta de anticuerpos contra las partículas parecidas a virus de los cuatro tipos de VPH (6, 11, 16 y 18). El perfil de isotipos de los anticuerpos que se producen concuerda con el perfil de isotipos que se observan en los tejidos genitales y sus alrededores, ubicación de las infecciones por el VPH. El adyuvante de aluminio de Merck se ha usado en varias otras vacunas aprobadas y tiene un perfil de seguridad demostrado (Ref. 4.3: 9). Los estudios preclínicos que evaluaron el adyuvante de aluminio han demostrado el importante papel de este adyuvante para inducir una respuesta vigorosa contra el VPH, lo que justifica su empleo en la formulación final de la vacuna tetravalente, GARDASIL®, sin ningún efecto adverso local o sistémico duradero de consideración.

### 3. Farmacocinética

No se han realizado estudios experimentales para demostrar la absorción, la distribución, el metabolismo y la excreción de los ingredientes activos de GARDASIL® para ningunas de las partículas parecidas a virus ni para el adyuvante de aluminio. La "Nota sobre directrices relativas a las pruebas farmacológicas y toxicológicas preclínicas de las vacunas"

  
Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.  
Jose Berone  
Aprobado

  
MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.  
Farm. Sebastian Darío Goldentul  
DIRECTOR TÉCNICO  
MATRICULA NACIONAL 15436



(CPMP/SWP/465/95) de la EMEA (Ref. 4.3: 1) reconoce que normalmente no se necesitan estudios farmacocinéticos de las vacunas.

No se realizaron estudios farmacocinéticos del adyuvante de aluminio de Merck, porque el adyuvante de sulfato hidroxifosfato de aluminio de esta vacuna ya se ha usado antes en varias otras vacunas de Merck (Cuadro 2.4: 1) y tiene un perfil de seguridad bien establecido (Ref. 4.3: 9).

Cuadro 2.4: 1

Lista de las vacunas de Merck que contienen el adyuvante de sulfato hidroxifosfato de aluminio amorfo


Vacuna	Cantidad de adyuvante sulfato hidroxifosfato de aluminio
RECOMBIVAX HB® ‡ (vacuna contra la hepatitis B [recombinante])	Aproximadamente 500 µg por dosis de 1.0 ml (aproximadamente 250 µg por dosis pediátrica de 0.5 ml) (Ref. 4.3: 10)
LIQUID PEDVAXHIB®§ (vacuna conjugada contra <i>Haemophilus influenzae</i> b [conjugado de proteínas meningocócicas])	Aproximadamente 225 µg por dosis de 0.5 ml (Ref. 4.3: 11)
COMVAX®¶ (vacuna conjugada contra <i>Haemophilus influenzae</i> b [conjugado de proteínas meningocócicas] y vacuna contra la hepatitis B [recombinante])	Aproximadamente 225 µg por dosis de 0.5 ml (Ref. 4.3: 12)
VAQTA®* (vacuna contra la hepatitis A, inactivada)	Aproximadamente 450 µg por dosis de 1.0 ml (aproximadamente 225 µg por dosis pediátrica de 0.5 ml) (Ref. 4.3: 13)

‡ RECOMBIVAX HB® es una marca registrada de Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, Nueva Jersey, EE.UU.

§ LIQUID PEDVAXHIB® es una marca registrada de Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, Nueva Jersey, EE.UU.

¶ COMVAX® es una marca registrada de Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, Nueva Jersey, EE.UU.

\* VAQTA® es una marca registrada de Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, Nueva Jersey, EE.UU.

  
 Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.  
 Jose Perrone  
 Apodado

MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.  
 Farm. Sebastian Dario Goldental  
 DIRECTOR TECNICO  
 MATRICULA NACIONAL 15436



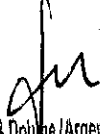
#### 4. Toxicología

##### 4.1 Introducción

La seguridad de GARDASIL® se analizó en un estudio de toxicidad de dosis única en ratones, en un estudio de toxicidad de dosis única en ratas, en un estudio de toxicidad de dosis repetidas en ratones, en un estudio de toxicidad reproductiva y del desarrollo en ratas, el cual incluyó una evaluación de inmunogenicidad, y en un estudio de tolerancia local en conejos. Los cinco estudios se llevaron a cabo en condiciones de buenas prácticas de laboratorio (GLP), y cumplen con las recomendaciones de la "Nota sobre directrices relativas a las pruebas farmacológicas y toxicológicas preclínicas de las vacunas" (CPMP/SWP/465/95) de la EMEA (Ref. 4.3: 1) y con las "Directrices sobre la evaluación no clínica de las vacunas", de la OMS (Ref. 4.3: 2). Los mencionados estudios ofrecen una amplia evaluación de la seguridad preclínica de GARDASIL®, y respaldan la administración de esta vacuna a seres humanos.

##### 4.2 Toxicidad de las dosis únicas

La toxicidad de las dosis únicas de GARDASIL® se evaluó en dos estudios, en condiciones de buenas prácticas de laboratorio (GLP), en los cuales se administró una sola dosis intramuscular de la vacuna a ratones o ratas (0.1 ml en los ratones, 0.2 ml en ratas de solución con 160/160/80/160 µg/ml de PPV de L1 del VPH de los tipos 6/11/16/18), seguida por un periodo de observación de 14 días. La vía intramuscular fue adecuada, ya que esta es la vía para la administración clínica de la vacuna. La duración de los estudios (14 días) fue suficiente para observar cualquier toxicidad aguda de la vacuna en los animales. El número de animales en cada estudio fue de 5 por sexo por cada grupo. La elección de estas dos especies de roedores para las evaluaciones de toxicidad de la dosis única es apropiada, porque ofrecen márgenes de seguridad amplios con base en el peso corporal. La dosis administrada representa un múltiplo de aproximadamente 1,200 veces en los ratones y 300 veces en las ratas, suponiendo un peso corporal de los seres humanos de 75 kg. La vacuna fue bien tolerada y no hubo efectos relacionados con el tratamiento la sobre mortalidad, los signos físicos o los cambios en el peso corporal durante un periodo de observación de 14 días. Además de estos dos estudios, se evaluó la toxicidad de GARDASIL® después de una administración única en el estudio de toxicidad de las dosis repetidas que se describe en la sección siguiente.

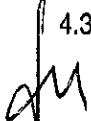
  
Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.  
Jose Berone  
A0000000

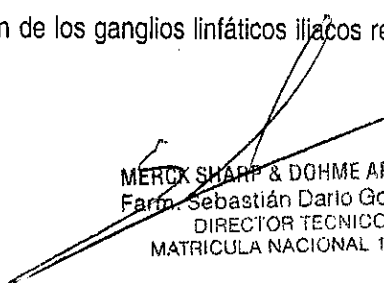
  
MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.  
Firm. Sebastián Dario Goldentui  
DIRECTOR TECNICO  
MATRICULA NACIONAL 15436



#### 4.3 Toxicidad de las dosis repetidas

La toxicidad de las dosis repetidas de GARDASIL® se evaluó en un estudio sujeto a las buenas prácticas de laboratorio (GLP) en ratones. La vacuna se administró como una dosis intramuscular única (administrada el día 1 del estudio) o bien como tres dosis intramusculares (administradas los días 1, 29 y 57 del estudio), seguidas por un periodo de observación de 64 días. La concentración de la vacuna en las pruebas consistió en partículas parecidas a virus de L1 del VPH de los tipos 6/11/16/18 en concentraciones de 160/160/80/160 µg/ml, respectivamente. Cada ratón recibió 0.1 ml por dosis (0.05 ml en cada cuadríceps). Ya que GARDASIL® se administra clínicamente por inyección intramuscular, esa fue la vía empleada en el estudio. El número de dosis, que se equiparó al esquema clínico, y la duración del estudio (64 días) fueron adecuados para evaluar la toxicidad derivada de la administración intramuscular repetida de la vacuna. La especie elegida para el presente estudio de dosis repetidas, el ratón, es apropiada para evaluar los riesgos de GARDASIL®, ya que esta especie animal ofrece un amplio margen de seguridad con base en el peso corporal. Además, se sabe que la cepa de ratones escogida para el estudio (BALB/c) presenta una respuesta inmune a la vacuna (Sec. 3.2.S.3.1-hpv). La dosis administrada representa un múltiplo de aproximadamente 1,450 veces en proporción al peso corporal, suponiendo un peso corporal de los seres humanos de 75 kg. Se contó con un número adecuado de ratones por grupo de dosis (15 ratones de cada sexo por grupo de dosis) y grupos apropiados de control. Se usó un grupo de control con placebo, al cual se le administró el adyuvante de aluminio de Merck, porque ello permitió una comparación de los efectos del tratamiento entre los animales que recibieron un placebo y la vacuna. El diseño del estudio permitía la evaluación de la mitad de los animales después de 8 días (dosis única, autopsia "intermedia") y del resto después de 64 días (tres dosis, autopsia "final"). En el estudio se evaluaron los parámetros de rigor, incluyendo la autopsia completa y el análisis microscópico de numerosos tejidos. No hubo cambios relacionados con el tratamiento en signos físicos, consumo de alimento, citología hemática, análisis bioquímicos del suero, peso de los órganos ni aumento de peso de los animales. No se observaron indicios de toxicidad sistémica inducida por el adyuvante de aluminio en los animales del estudio, entre ellos datos de toxicidad en el encéfalo o la médula espinal (Ref. 4.3: 14). Se observó un aumento de volumen de los ganglios linfáticos ilíacos relacionado con

  
 Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.  
 Jose Verone  
 Apoderado

  
 MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.  
 Farm. Sebastián Darío Goldentul  
 DIRECTOR TÉCNICO  
 MATRICULA NACIONAL 15436



el tratamiento, tanto en las autopsias intermedias como en las finales. Microscópicamente, se observó hiperplasia relacionada con el tratamiento en los ganglios linfáticos iliacos e inguinales, tanto en las autopsias intermedias como en las finales. Además, en ambos tipos de autopsias se observó inflamación relacionada con el tratamiento en los músculos del sitio de inyección; sin embargo, no hubo un mayor daño global relacionado con el tratamiento en comparación con el grupo de control con placebo que recibió el adyuvante de aluminio. Estas observaciones son de esperarse con una vacuna, y son indicativas de la presencia de una respuesta inmune.

#### 4.4 Genotoxicidad

No se evaluó el potencial mutagénico o de toxicidad genética de GARDASIL®. Según la "Nota sobre directrices relativas a las pruebas farmacológicas y toxicológicas preclínicas de las vacunas" (CPMP/SWP/465/95) de la EMEA (Ref. 4.3: 1) y las "Directrices sobre la evaluación no clínica de las vacunas", de la OMS (Ref. 4,3: 2), generalmente no se requieren estudios de genotoxicidad para las vacunas.

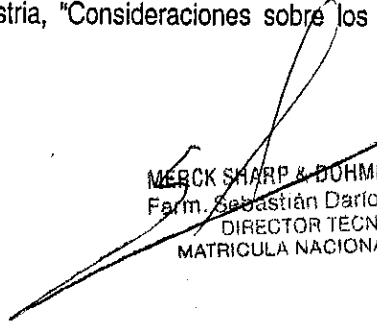
#### 4.5 Carcinogenicidad

No se evaluó el potencial oncogénico o carcinogénico de GARDASIL®. Según la "Nota sobre directrices relativas a las pruebas farmacológicas y toxicológicas preclínicas de las vacunas" (CPMP/SWP/465/95) de la EMEA (Ref. 4.3: 1) y las "Directrices sobre la evaluación no clínica de las vacunas", de la OMS (Ref. 4.3: 2), generalmente no se requieren estudios de carcinogenicidad para las vacunas.

#### 4.6 Toxicidad reproductiva y del desarrollo

La toxicidad reproductiva y del desarrollo de GARDASIL® se evaluó en un estudio con buenas prácticas de laboratorio (GLP) en ratas hembra. El objetivo de dicho estudio fue evaluar los efectos potenciales de la vacuna sobre el desarrollo, el crecimiento, la conducta, el desempeño reproductivo y la fertilidad de las crías. El estudio de toxicidad reproductiva y del desarrollo fue una parte importante de la evaluación global de seguridad para esta vacuna, ya que su uso está indicado en mujeres en edad reproductiva. El diseño del estudio se elaboró con base en el Borrador de Directrices para la Industria, "Consideraciones sobre los estudios de toxicidad

  
Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.  
José María  
Apoderado

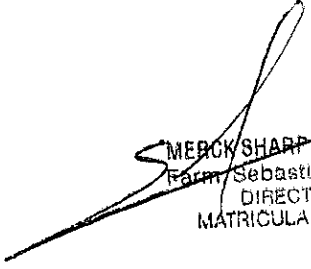
  
MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.  
Firm. Sebastián Darío Goldentul  
DIRECTOR TÉCNICO  
MATRICULA NACIONAL 15436



reproductiva para las vacunas preventivas indicadas contra las enfermedades infecciosas", del Centro para Evaluación e Investigación sobre Biológicos, de la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (CBER/FDA, por sus siglas en inglés) (Ref. 4.3: 15) y las Directrices ICH S5A, de la Comisión Internacional de Armonización, o ICH (Ref. 4.3:16). Antes de iniciar el estudio, se obtuvo la aprobación del CBER/FDA para el diseño del mismo.

Se sabe que la cepa de ratas elegida para el presente estudio (Sprague-Dawley) presenta una respuesta inmune a la vacuna (Sec. 2.4.4.8). Se administró a las ratas hembra el equivalente a una dosis humana completa de GARDASIL® (0.5 ml de solución con 40/80/80/40 µg/ml de PPV del VPH de los tipos 6/11/16/18) por vía intramuscular. Para cada dosis, se administró aproximadamente 0.25 ml del material de prueba o de control en los músculos cuádriceps derecho e izquierdo de cada rata (0.5 ml por rata por dosis). Con base en el peso corporal, la dosis de vacuna administrada a las ratas tenía un margen de seguridad de aproximadamente 300 veces con respecto a la dosis proyectada para los seres humanos. Hubo dos grupos tratados con la vacuna. El Grupo 2 recibió cuatro inmunizaciones, cinco y dos semanas antes del apareamiento y los días 6° de la gestación (DG) y 7° de la lactancia (DL). El Grupo 1 recibió dos inmunizaciones, los días 6° de la gestación y 7° de la lactancia. Esto permitió evaluaciones por separado de animales que se habían expuesto a la vacuna antes de aparearse y de animales que eran inmunológicamente "vírgenes" (no expuestos a la vacuna). La dosis durante la gestación se administró al sexto día, ya que es el momento de la implantación y el inicio de la organogénesis. También se administró la vacuna a las madres durante la lactancia, para determinar si había algún efecto adverso para las crías lactantes. Además de los dos grupos tratados con la vacuna, hubo dos grupos de control. El primero (Control 1) recibió solución salina amortiguada con fosfato, y el segundo grupo (Control 2) recibió el adyuvante de aluminio de Merck como placebo. Se asignaron cuando menos 44 animales por grupo, de modo que la mitad de los animales (cuando menos 20) fueran sometidos a operación cesárea para realizar una exploración uterina y fetal sistemática y que la otra mitad (al menos 20) dieran a luz en forma natural y se les permitiera amamantar a sus crías hasta el destete, a fin de vigilar el desarrollo posnatal.

  
Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.  
José Merone  
Apoderado

  
MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.  
Sebastián Darío Goldentul  
DIRECTOR TÉCNICO  
MATRICULA NACIONAL 15438




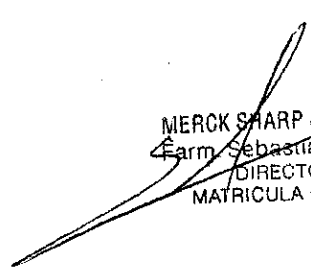
En las ratas hembra F<sub>0</sub>, no hubo efectos relacionados con el tratamiento sobre mortalidad, signos físicos, aumento del peso corporal medio o consumo de alimento durante el estudio (periodo previo al apareamiento, gestación y lactancia), ni se observaron cambios macroscópicos relacionados con el tratamiento en la autopsia. En las crías F<sub>1</sub>, no hubo efectos relacionados con el tratamiento sobre la supervivencia embrionaria y fetal, evaluada por el porcentaje de pérdida de crías alrededor de la fecha de implantación, pérdida posterior a la implantación, media de implantaciones por hembra gestante y fetos vivos por hembra gestante. No hubo efectos relacionados con el tratamiento en la proporción de crías de cada sexo, la morfología macroscópica de la placenta ni el peso fetal medio. No hubo anomalías fetales externas, viscerales, coronales ni esqueléticas relacionadas con el tratamiento. No hubo efectos relacionados con el tratamiento sobre la morfología externa de las crías al nacimiento, ni sobre los signos físicos o la supervivencia antes y después del destete. No hubo efectos relacionados con el tratamiento sobre el peso corporal de las crías antes y después del destete. Además, no hubo efectos relacionados con el tratamiento sobre los signos del desarrollo (momento de la abertura vaginal o de la separación del prepucio), la conducta (aprendizaje y memoria de la evitación pasiva, habituación al reflejo de sobresalto auditivo y actividad motora en campo abierto), el desempeño reproductivo o la fertilidad de las crías.

GARDASIL® indujo una respuesta de anticuerpos específicos contra el VPH de los tipos 6, 11, 16 y 18 en las ratas gestantes, después de una o varias inyecciones intramusculares. Los anticuerpos contra los cuatro tipos de VPH se transfirieron a las crías durante la gestación y, posiblemente, durante la lactancia. Los anticuerpos transferidos pasivamente duraron más allá del destete, incluso hasta el día 77 de vida extrauterina, cuando se les midió por última vez.

#### 4.7 Tolerancia local

La tolerancia local se evaluó mediante la administración intramuscular de la vacuna en conejos. Dieciséis conejos (ocho de cada sexo) recibieron, en cinco puntos distintos del músculo dorsal largo, una dosis intramuscular de 0.5 ml de cada una de las siguientes formulaciones (incluida la formulación destinada a comercializarse, que aparece en el # 2 de la lista):

  
Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.  
José Verone  
Apodado

  
MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.  
Sebastián Darío Goidentul  
DIRECTOR TECNICO  
MATRICULA NACIONAL 15436



- 1) Placebo de adyuvante de aluminio para control
- 2) Vacuna tetravalente contra el VPH 6/11/16/18 (40/80/80/40  $\mu$ g/ml de PPV de L1)
- 3) Vacuna tetravalente contra el VPH 6/11/16/18 (80/80/80/80  $\mu$ g/ml de PPV de L1)
- 4) Vacuna tetravalente contra el VPH 6/11/16/18 (160/80/160/80  $\mu$ g/ml de PPV de L1)
- 5) Vacuna tetravalente contra el VPH 6/11/16/18 (160/160/80/160  $\mu$ g/ml de PPV de L1)

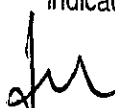
Los sitios de inyección se examinaron macroscópica y microscópicamente los días 4 y 14. Las formulaciones de la vacuna fueron bien toleradas. No hubo efectos relacionados con el tratamiento sobre la mortalidad, los signos físicos o el peso corporal a lo largo de un periodo de observación de 14 días. La intensidad de la reacción histopatológica local fue de muy ligera a ligera, y se asemejó estrechamente a la que causó el placebo de adyuvante de aluminio del grupo control. Con base en el peso corporal, la dosis de vacuna administrada a los conejos tenía un margen de seguridad de hasta 40 veces con respecto a la dosis proyectada para los seres humanos. El estudio se llevó a cabo bajo buenas condiciones de laboratorio (condiciones GLP).

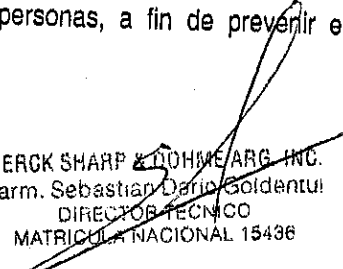
#### 4.8 Otros estudios de toxicidad

Los otros estudios de toxicidad de GARDASIL® fueron dos estudios exploratorios de la inmunogenicidad en ratas, no sujetos a las normas GLP. El objetivo de dichos estudios fue confirmar que GARDASIL® inducía una respuesta inmune en el modelo en animales empleado para las pruebas de toxicidad reproductiva y del desarrollo. En ambos estudios de exploración, se demostró que la vacuna fue inmunogénica en las ratas, y se observó una respuesta de anticuerpos contra el VPH de todos los tipos presentes en la vacuna. Estos resultados demuestran que la rata constituye un modelo animal apropiado para investigar los posibles efectos tóxicos relacionados con la administración de GARDASIL®.

#### 5. Panorámica integrada y conclusiones

Esta panorámica no clínica se presenta como sustento para el registro de un esquema de vacunación fijo con GARDASIL® (L-000931225 o L-931225). GARDASIL®, también conocido como Vacuna recombinante contra el virus del papiloma humano (tipos 6, 11, 16, 18), está indicado para la inmunización de las personas, a fin de prevenir el cáncer, las lesiones

  
Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.  
José Marone  
Apoderado

  
MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.  
Farm. Sebastián Darío Goldentui  
DIRECTOR TÉCNICO  
MATRICULA NACIONAL 15436



precancerosas o displásicas, las verrugas genitales y la infección causadas por el VPH de los tipos 6, 11, 16 y 18.

Los estudios no clínicos de farmacología fueron cinco estudios de la farmacodinámica primaria de GARDASIL<sup>®</sup>, no sujetos a las buenas prácticas de laboratorio (no GLP), en monos verdes africanos (*Cercopithecus* sp.), chimpancés (*Pan troglodytes*) y monos rhesus (*Macaca mulatta*). En cada una de las especies animales estudiadas, la administración intramuscular de GARDASIL<sup>®</sup>, o de los componentes monovalentes, desencadenó una vigorosa respuesta inmune que llevó a la producción de anticuerpos contra las partículas parecidas a virus de los tipos de VPH presentes en la vacuna. Dichos estudios demostraron que el adyuvante de aluminio era necesario para inducir una respuesta inmune más intensa contra los antígenos de la vacuna. Los isotipos de los anticuerpos indicaron una respuesta de los linfocitos T auxiliares de tipo 2 (T<sub>H</sub>2), con IgA e IgG1 mensurables. La IgA es un importante isotipo de los anticuerpos, presente en las secreciones cervicouterinas además de la IgG. Así pues, el perfil de isotipos de los anticuerpos que se producen concuerda con el perfil de isotipos que se observan en los tejidos genitales y sus alrededores, ubicación de las infecciones por el VPH.

No se realizaron estudios de farmacodinámica secundaria, seguridad farmacológica ni interacciones medicamentosas farmacodinámicas de GARDASIL<sup>®</sup>, ya que la vacuna no mostró ningún efecto aparte de la respuesta inmune esperada. No se han efectuado estudios farmacocinéticos de GARDASIL<sup>®</sup> para ningunas de las partículas parecidas a virus que la componen ni para el adyuvante de aluminio. Esto cumple con las directrices de la OMS, que estipulan que normalmente no se necesitan estudios farmacocinéticos de las vacunas (Ref. 4.3: 2). Además, como el adyuvante de sulfato hidroxifosfato de aluminio de esta vacuna ya se ha usado antes en varias otras vacunas, no se realizaron estudios farmacocinéticos del adyuvante de aluminio.

Los estudios de toxicología que respaldan la seguridad de GARDASIL<sup>®</sup> fueron cinco estudios en condiciones de buenas prácticas de laboratorio (GLP), consistentes en un estudio de toxicidad de dosis únicas en ratones, un estudio de toxicidad de dosis únicas en ratas, un estudio de toxicidad de dosis repetidas en ratones, un estudio de tolerancia local en conejos y

Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.  
Jose M. Arone  
Aprobado

MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.  
Farm. Sebastián Darío Goldentul  
DIRECTOR TÉCNICO  
MATRICULA NACIONAL 15436



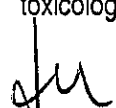
un estudio de toxicidad reproductiva y del desarrollo en ratas, el cual incluyó un estudio de inmunogenicidad. Todos ellos ofrecen una amplia evaluación de la seguridad de GARDASIL®. En los cinco estudios, la vacuna fue bien tolerada, y los únicos efectos relacionados con el tratamiento fueron indicativos de la respuesta inmune esperada. En conclusión, los estudios no clínicos que aquí se presentan respaldan la administración de esta vacuna en seres humanos.

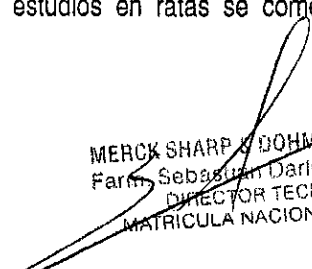
## PARTE B

### 1. Síntesis de los Estudios Farmacodinámicos

La farmacodinámica primaria de GARDASIL® se evaluó en cinco estudios no sujetos a las buenas prácticas de laboratorio (GLP) en tres especies de primates no humanos: monos verdes africanos (*Cercopithecus* sp.), chimpancés (*Pan troglodytes*) y monos rhesus (*Macaca mulatta*). Los objetivos de dichos estudios fueron determinar si la vacuna desencadenaba una respuesta inmune específica contra las partículas parecidas a virus del VPH, examinar la duración de la respuesta y determinar si era necesario el adyuvante de aluminio de Merck para una inmunogenicidad óptima. Los estudios también se diseñaron para determinar si la antigenicidad de los cuatro tipos de partículas parecidas a virus en GARDASIL® era similar, y si la respuesta inmune a las partículas parecidas a virus de cada tipo, al combinarlas en una formulación tetravalente, era similar a la que se lograba mediante la vacunación con una formulación monovalente de partículas parecidas a virus. La evaluación farmacológica de GARDASIL® se centró en una evaluación de la farmacodinámica primaria (es decir, la inmunogenicidad), ya que la vacuna no mostró ningún efecto aparte de la respuesta inmune esperada. Esto concuerda con la "Nota sobre directrices relativas a las pruebas farmacológicas y toxicológicas preclínicas de las vacunas" ("*Note for Guidance on Preclinical Pharmacological and Toxicological Testing of Vaccines*" -CPMP/SWP/465/95) de la EMEA (Agencia Europea para la Evaluación de Productos Medicinales, Ref. 4.3: 1) y con las "Directrices sobre la evaluación no clínica de las vacunas", de la OMS (Organización Mundial de la Salud) (Ref. 4.3: 2).

Además de los estudios descritos en la presente sección, la inmunogenicidad de la vacuna se evaluó en ratas, ya que esta fue una de las especies usadas para los estudios no clínicos de toxicología. Los resultados de los estudios en ratas se comentan dentro del resumen de

  
Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.  
Jose Merone  
Aprobado

  
MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.  
Farms. Sebastian Dario Goldentul  
DIRECTOR TECNICO  
MATRICULA NACIONAL 15436




toxicología (Sec. 2.6.6.8). La evaluación farmacológica de GARDASIL® se centró en una evaluación de la farmacodinámica primaria, ya que la vacuna no mostró ningún efecto aparte de la respuesta inmune esperada. Esto concuerda con las directrices de la EMEA y de la OMS (Ref. 4.3: 1,2).

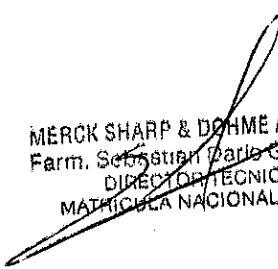
En cada una de las especies animales estudiadas, se observó que la administración intramuscular de GARDASIL®, o de los componentes monovalentes, fue bien tolerada y desencadenó una vigorosa respuesta inmune que llevó a la producción de anticuerpos contra las partículas parecidas a virus de los tipos de VPH presentes en la vacuna. Los estudios citados demostraron que el adyuvante de aluminio era necesario para inducir una respuesta inmune más intensa contra los antígenos de la vacuna. Se demostró que los anticuerpos séricos contra los cuatro tipos de VPH neutralizaban la infección pseudoviral de una estirpe de cáncer cervicouterino (la C33A), lo cual demostró el potencial de las vacunas recombinantes contra el VPH para proteger contra la infección por el VPH (Sec. 2.6.2.1.4). El perfil de los anticuerpos totales y de los isotipos generados por la vacunación con GARDASIL® se examinó en monos rhesus. Se inducen títulos altos de IgG total, además de niveles importantes de IgA y niveles mensurables de IgM, IgG1 e IgG4. Los isotipos de los anticuerpos indicaron una respuesta de los linfocitos T auxiliares de tipo 2 (TH2, por sus siglas en inglés). La IgA es un importante isotipo de anticuerpos, presente en las secreciones cervicouterinas además de la IgG (Ref. 4.3: 8). Así pues, el perfil de isotipos de los anticuerpos producidos en respuesta a la vacuna concuerda con el perfil de isotipos que se observan en los tejidos genitales y sus alrededores, ubicación de las infecciones por el VPH.

## 2. Farmacocinética primaria

### 2.1 Estudios de inmunogenicidad en primates no humanos (monos verdes africanos, monos rhesus y chimpancés)

Se realizaron cinco estudios no sujetos a las buenas prácticas de laboratorio (GLP) para determinar la inmunogenicidad de las vacunas monovalentes con partículas parecidas a virus de L1 del VPH de los tipos 6, 11, 16 y 18 y de GARDASIL®, la vacuna recombinante tetravalente contra el VPH de los tipos 6, 11, 16 y 18, en primates no humanos (Sec. 2.6.3.1).

  
Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.  
**Jose Verone**  
Aprobado

  
MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.  
Farm. Sebastian Parlo Goldentul  
DIRECTOR TECNICO  
MATRICULA NACIONAL 15436



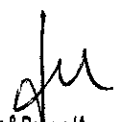
Las formulaciones monovalentes de partículas parecidas a virus de L1 y la vacuna recombinante tetravalente (GARDASIL®) que se probaron en estos estudios se elaboraron siguiendo el mismo proceso de fabricación que los lotes de fabricación sistemática y, por consiguiente, eran similares a los lotes empleados en la clínica. Las vacunas recombinantes monovalentes contra el VPH o GARDASIL® se administraron por inyección intramuscular en tres o cuatro ocasiones en el curso de 52 semanas, seguidas por un estudio de inmunogenicidad de los títulos de anticuerpos surgidos contra los tipos de VPH correspondientes. Los estudios se efectuaron en monos rhesus (Sec. 2.6.3.2A; 2.6.3.2E), en chimpancés (Sec. 2.6.3.2B) y en monos verdes africanos (Sec. 2.6.3.2C; Sec. 2.6.3.2D).

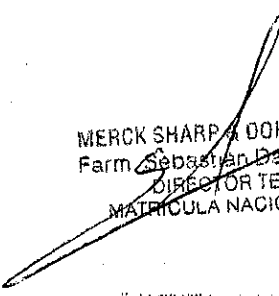
**2.1.1 Primer estudio de inmunogenicidad en primates no humanos: monos rhesus**

El primer estudio de inmunogenicidad se realizó en monos rhesus (*Macaca mulatta*) y se diseñó para determinar si era necesario el adyuvante de aluminio para obtener una respuesta inmune más intensa contra las partículas parecidas a virus de la vacuna. Dos grupos de animales recibieron una vacuna monovalente de partículas parecidas a virus de L1 del VPH de tipo 16: un grupo (n = 3) recibió una formulación sin el adyuvante de aluminio y el segundo grupo (n = 3) recibió una formulación con el adyuvante de aluminio. El estudio se llevó a cabo en condiciones no sujetas a las buenas prácticas de laboratorio (GLP).

Los seis monos rhesus, de aproximadamente 2.5 años de edad, con peso entre 2.85 y 4.05 kg al inicio del estudio, fueron albergados en salas con control ambiental. La concentración de las partículas parecidas a virus de L1 del VPH de tipo 16 fue de 4 µg/ml. Cada grupo de tres monos recibió tres dosis, el día 0 y a las 8 y 24 semanas. Para cada dosis, se administraron aproximadamente 0.5 ml de la vacuna en el músculo deltoides izquierdo o derecho.

Los animales fueron observados sistemáticamente. Se observaron los signos físicos el día de la administración de la vacuna, desde 1 hasta 5 horas después de la administración, y en los días en que se registró el peso corporal. Para los análisis de inmunogenicidad, se obtuvieron muestras de suero a las 0, 2, 4, 8, 10, 24, 26, 28 y 52 semanas.

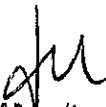
  
Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.  
Jose Barone  
Aprobado

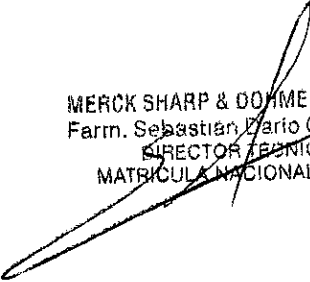
  
MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.  
Farm. Sebastian Darío Goldentul  
DIRECTOR TECNICO  
MATRICULA NACIONAL 15436



A fin de evaluar las respuestas de anticuerpos específicos de tipo contra el VPH de tipo 16, se analizaron los sueros usando un radioinmunoanálisis competitivo para VPH (Ref. 4.3: 3). Dicho radioinmunoanálisis permite la cuantificación de los anticuerpos neutralizantes contra el VPH de tipo 16 en una muestra de suero. El análisis emplea partículas parecidas a virus (PPV) derivadas de levadura que están acopladas con esferas de poliestireno. Un anticuerpo monoclonal neutralizante 16.V5, específico para el VPH de tipo 16 y dependiente de la conformación, se combinó con los sueros de los monos y con las esferas recubiertas de partículas parecidas a virus. Los títulos de anticuerpos en el suero se determinaron en un formato competitivo, en el cual el anticuerpo monoclonal neutralizante conocido 16.V5, específico del tipo, competía con cada muestra de suero de mono por unirse a los epítomos neutralizantes de las partículas parecidas a virus, sensibles a la conformación. La unión del 16.V5 monoclonal se detectó con un anticuerpo anti-ratón secundario de cabra radiomarcado. La inhibición relativa de la unión del anticuerpo monoclonal se comparó con un suero estándar de referencia, usando una curva logística de cuatro parámetros. El suero de referencia era el suero acumulado de varios monos verdes africanos (inmunizados con partículas parecidas a virus del VPH de tipo 16) al cual se le asignaron valores arbitrarios, expresados en miliunidades Merck (mUM) por mililitro.

Durante el estudio, no hubo muertes ni signos físicos relacionados con el tratamiento. Los seis animales exhibieron una respuesta inmune característica de sensibilización y refuerzo a lo largo del estudio. El grupo que recibió VPH de tipo 16 más el adyuvante de aluminio de Merck presentó una media geométrica de títulos (MGT) más elevada en todos los momentos analizados a lo largo del tiempo, en comparación con el grupo sin adyuvante (Sec. 2.6.3.2A). El Cuadro 2.6.2: 1 ilustra los múltiplos de la media geométrica de los títulos obtenidos en los animales.

  
Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.  
Jose Berone  
Aprobado

  
MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.  
Farm. Sebastian Dario Goldentul  
DIRECTOR TECNICO  
MATRICULA NACIONAL 15436



Cuadro 2.6.2: 1

Media geométrica de los títulos (mUM/ml) de anticuerpos específicos contra el VPH de tipo 16 de monos rhesus vacunados con VPH de tipo 16 formulado con o sin adyuvante de aluminio

	2 semanas tras la 1a. dosis	2 semanas tras la 2a. dosis	2 semanas tras la 3a. dosis	6 meses tras la 3a. dosis
MGT VPH 16 + adyuvante	140	57,250	94,745	5,981
MGT VPH 16 sin adyuvante	15	2,882	5,614	539
Diferencia (múltiplo)	9.3	19.8	16.8	11.1

(Sec. 2.6.3.2A)

En conclusión, la inyección intramuscular de tres dosis de vacuna monovalente de partículas parecidas a virus de L1 del VPH de tipo 16 en monos rhesus fue generalmente bien tolerada a lo largo de 52 semanas. La respuesta específica contra el VPH de tipo 16 se midió usando un radioinmunoanálisis específico contra este tipo de VPH. La vacuna monovalente de PPV de VPH de tipo 16 fue inmunogénica en todos los monos rhesus, independientemente del grupo. Las respuestas de anticuerpos específicos más intensas se observaron en el grupo que recibió 2 µg/dosis de PPV de L1 del VPH 16 formulados con el adyuvante de aluminio. Estos títulos elevados se mantuvieron a lo largo del periodo de seguimiento, de seis meses. Tales resultados demuestran que en los primates no humanos se obtiene una respuesta inmune vigorosa después de la inmunización, con la producción de anticuerpos contra las partículas parecidas a virus del VPH 16.

2.1.2 Segundo estudio de inmunogenicidad en primates no humanos: chimpancés

El presente estudio se realizó para demostrar una respuesta inmune serológica contra el VPH en otra especie de primates no humanos. Se administraron PPV monovalentes de L1 del VPH

*Ju*  
 Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.  
 José Verone  
 Apoderado


*[Signature]*  
 MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.  
 Farm. Sebastián Dato Goldentul  
 DIRECTOR TÉCNICO  
 MATRICULA NACIONAL 15436

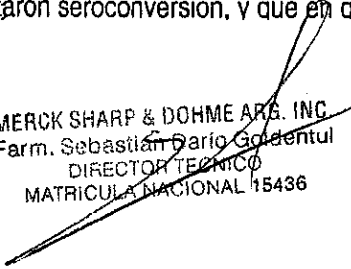


de tipo 16 por inyección intramuscular a seis chimpancés en tres ocasiones (a las 0, 8 y 24 semanas) en el curso de 6 meses. El estudio no estuvo sujeto a las condiciones de buenas prácticas de laboratorio (GLP). Los seis chimpancés fueron albergados en salas con control ambiental. Para cada dosis, se administraron aproximadamente 0.5 ml del material de prueba en el músculo deltoideo izquierdo o derecho de cada animal (0.5 ml por chimpancé por dosis). La concentración de las partículas parecidas a virus de L1 del VPH de tipo 16 administrada fue de 20 µg/ml (10 µg/dosis). Un grupo de cuatro animales recibió las partículas parecidas a virus formuladas con el adyuvante de aluminio de Merck y un grupo de dos animales recibió las partículas parecidas a virus sin el adyuvante.

Los animales fueron observados diariamente, y los signos físicos relativos a la administración de la vacuna se observaron el día de la administración de la vacuna, desde 1 hasta 5 horas después de la administración, y en los días en que se registró el peso corporal y se tomaron muestras de suero. Para los análisis de inmunogenicidad, se obtuvieron muestras de suero de los chimpancés cada 4 semanas a lo largo de todo el estudio, de un año de duración. Los sueros se analizaron usando un radioinmunoanálisis competitivo para VPH de tipo 16 (Ref. 4.3: 3). Los resultados se presentan en la Sec. 2.6.3.2B.

Durante el estudio, no hubo muertes ni signos físicos relacionados con el tratamiento. Un animal, el 88A001, no presentó una respuesta mensurable de anticuerpos contra la vacuna de PPV de L1 del VPH 16. No se observó un título de anticuerpos contra la proteína L1 del VPH 16 en ningún momento, incluso después de la administración de tres dosis de la vacuna. Este animal perteneció al grupo sin adyuvante. Todos los demás chimpancés presentaron respuestas mensurables de anticuerpos, independientemente del grupo del estudio. La observación de que todos los animales del grupo con adyuvante presentaron una respuesta inmune considerable respalda la contribución positiva del adyuvante de aluminio. Ya que el grupo sin adyuvante consistió en un solo animal que mostró seroconversión, no pudo obtenerse una media geométrica de los títulos. Sin embargo, al comparar entre los títulos individuales del grupo con VPH 16 más adyuvante a las cuatro semanas después de la tercera dosis (3068, 1784, 399 y 201 mUM/ml) y los del animal sin adyuvante (233 mUM/ml), es obvio que todos los animales experimentaron seroconversión, y que en general los títulos fueron más

  
Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.  
Jose Berone  
Aprobado

  
MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.  
Farm. Sebastian Dario Galdenzi  
DIRECTOR TÉCNICO  
MATRICULA NACIONAL 15436



altos en el grupo que recibió la vacuna con adyuvante. En conclusión, la inyección intramuscular de tres dosis de vacuna monovalente de partículas parecidas a virus de L1 del VPH de tipo 16, con y sin adyuvante de aluminio de Merck, fue bien tolerada en chimpancés. No hubo muertes ni signos físicos adversos. El estudio demuestra la inmunogenicidad de las partículas parecidas a virus de L1 del VPH 16 en los chimpancés, una segunda especie de primates no humanos.

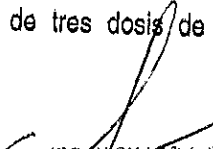
**2.1.3 Tercer estudio de inmunogenicidad en primates no humanos: monos verdes africanos**

Se administraron partículas parecidas a virus de L1 del VPH de tipo 18, formuladas con el adyuvante de aluminio de Merck, por inyección intramuscular a cuatro monos verdes africanos en tres ocasiones en el curso de seis meses, para demostrar la seroconversión contra el VPH de tipo 18 en primates no humanos. El estudio se llevó a cabo en condiciones no sujetas a las buenas prácticas de laboratorio (GLP). Los cuatro monos verdes fueron albergados en salas con control ambiental. Para cada dosis, se administraron aproximadamente 0.5 ml de la vacuna en el músculo deltoides izquierdo o derecho de cada animal (0. ml por mono por dosis). La concentración de las partículas parecidas a virus de L1 del VPH de tipo 18 era de 4 µg/ml (2 µg/dosis).

Los animales fueron observados diariamente, y se observaron los signos físicos relativos a la administración de la vacuna el día de la administración de esta, desde 1 hasta 5 horas después de la administración, y en los días en que se registró el peso corporal y se tomaron las muestras de suero. Para los análisis de inmunogenicidad, se obtuvieron muestras de suero a las 0, 2, 8, 10, 12, 24 y 26 semanas. Los sueros se analizaron en busca de anticuerpos específicos de tipo contra el VPH 18 usando un método de ELISA competitivo para el VPH 18 (EIAc). Los resultados se presentan en la Sec. 2.6.3.2C.

Se obtuvo una respuesta característica de sensibilización y refuerzo, con una elevación de los títulos hasta 10 veces su valor inicial, cuando menos, dos semanas después de la primera dosis, dos semanas después de la segunda dosis y dos semanas después de la tercera dosis. En conclusión, la administración intramuscular de tres dosis de vacuna monovalente de

  
Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.  
José Merone  
Apoderado

  
MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.  
Sebastián Darío Goldentur  
DIRECTOR TÉCNICO  
MATRICULA NACIONAL 15436




partículas parecidas a virus de L1 del VPH de tipo 18 con adyuvante de aluminio de Merck fue bien tolerada en monos verdes africanos. No hubo muertes ni signos físicos adversos. El estudio demuestra la inmunogenicidad de las partículas parecidas a virus de L1 del VPH 18 en los monos verdes africanos, una tercera especie de primates no humanos.

#### 2.1.4 Cuarto estudio de inmunogenicidad en primates no humanos: monos verdes africanos

Se administraron partículas parecidas a virus de L1 monovalentes de VPH de los tipos 6, 11, 16 y 18 o GARDASIL® (vacuna tetravalente), todos formulados con adyuvante de aluminio de Merck, por inyección intramuscular a 34 monos verdes africanos de entre 3 y 5 años de edad. Cada animal recibió tres dosis (a las 0, 8 y 24 semanas) y se tomaron muestras de suero a lo largo del estudio, de un año de duración. El estudio se realizó para evaluar la respuesta de anticuerpos contra las partículas parecidas a virus de cada tipo de VPH administradas por separado o combinadas en una formulación tetravalente. El estudio no estuvo sujeto a las condiciones de buenas prácticas de laboratorio (GLP). Los 34 monos verdes fueron albergados en salas con control ambiental. Para cada dosis, se administraron aproximadamente 0.5 ml del material de prueba en el músculo deltoides izquierdo o derecho de cada animal (0.5 ml por mono por dosis). La concentración de las partículas parecidas a virus de L1 de cada tipo de VPH administrado fue de 4 µg/ml; así pues, los monos que recibieron las vacunas monovalentes recibieron 2 µg/dosis, en tanto que los vacunados con GARDASIL® recibieron un total de 8 µg/dosis (2 µg por tipo de VPH por dosis).

Los animales fueron observados diariamente, y los signos físicos relativos a la administración de la vacuna se observaron el día de la administración de la vacuna, desde 1 hasta 5 horas después de la administración, y en los días en que se registró el peso corporal y se tomaron muestras de suero. Hubo una muerte por timpanitis (indigestión gaseosa), la cual se determinó que no tuvo relación alguna con la vacuna. Se sacrificó a dos animales en la semana 28 para exsanguinarlos. Otros ocho animales, dos por cada grupo de vacuna monovalente, recibieron una cuarta dosis después de concluir el estudio de un año y fueron sacrificados 4 semanas después para exsanguinarlos, a fin de obtener suero positivo de control que se emplearía en


  
Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.  
JOSE PEDRO  
Aprobado

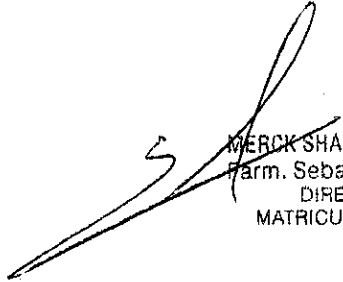
  
MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.  
Farm. Sebastián Dario Goldentul  
DIRECTOR TECNICO  
MATRICULA NACIONAL 15436



los estudios clínicos como patrones de referencia y controles para medir los anticuerpos específicos contra el VPH. Para los análisis de inmunogenicidad, se obtuvieron muestras de suero de los monos a las 0, 8, 10, 14, 24, 26 y 52 semanas. Los sueros se analizaron en busca de anticuerpos específicos de cada tipo contra el VPH usando ELISA y radioinmunoanálisis competitivos (Ref. 4.3: 3). Los resultados se presentan en la Sec. 2.6.3.2D. Además, un subgrupo de los sueros obtenidos a las 14 semanas de los animales que recibieron las vacunas monovalentes se analizó para determinar si los anticuerpos generados en respuesta a la vacuna podían neutralizar la infección por pseudovirus (partículas parecidas a virus) *in vitro*. Los anticuerpos neutralizantes inhibirían el ingreso de las partículas parecidas a virus en las células C33A, según lo indicaría la expresión de un gen indicador de la  $\beta$ -lactamasa (Ref. 4.3: 17). Todos los animales vacunados demostraron neutralización del VPH específica para cada tipo (Sec. 2.6.3.2D).

Se obtuvo una característica respuesta inmune de sensibilización y refuerzo, con una elevación de los títulos hasta 10 veces su valor inicial, cuando menos, dos semanas después de la segunda dosis y dos semanas después de la tercera dosis. En términos generales, la respuesta de anticuerpos desencadenada por cada vacuna monovalente contra el VPH fue ligeramente más intensa que la obtenida con la vacuna tetravalente, GARDASIL® (Cuadro 2.6.2: 2).

  
Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.  
José Nerone  
Apoderado

  
MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.  
Farm. Sebastián Darío Goldentul  
DIRECTOR TÉCNICO  
MATRICULA NACIONAL 15436



Cuadro 2.6.2: 2

Media geométrica de los títulos (mUM/ml) en monos verdes africanos vacunados con GARDASIL® o con partículas parecidas a virus de L1 de VPH monovalentes (de los tipos 6, 11, 16 o 18) formuladas con adyuvante de aluminio

	Semana 10 (2 sem post 2a. dosis)	Semana 26 (2 sem post 3a. dosis)	Semana 52 (6 meses post 3a. dosis)
<b>MGT VPH 6</b>			
GARDASIL®	55,049	146,992	ND
PPV monovalentes tipo 6	299,282	513,821	ND
<b>MGT VPH 11</b>			
GARDASIL®	6,867	20,199	654
PPV monovalentes tipo 11	83,869	63,412	2,769
<b>MGT VPH 16</b>			
GARDASIL®	20,462	41,313	1,950
PPV monovalentes tipo 16	63,862	137,141	5,750
<b>MGT VPH 18</b>			
GARDASIL®	116,662	40,230	ND
PPV monovalentes tipo 18	102,175	148,063	ND
ND = no se determinó			

[Sec. 2.6.3.2D]

En conclusión, la administración intramuscular de tres dosis de vacuna monovalente de partículas parecidas a virus de L1 del VPH con adyuvante de aluminio, o de GARDASIL® formulado con adyuvante de aluminio, fue bien tolerada en monos verdes africanos. Hubo una muerte, no asociada con la vacunación, y no se observaron signos físicos adversos. Se sacrificó a diez animales y se obtuvo el suero. Los sueros fueron positivos para los anticuerpos contra el VPH del tipo empleado en la vacuna y se usaron como controles positivos en otros estudios. El presente estudio demuestra la inmunogenicidad de las partículas parecidas a virus de L1 monovalentes de los cuatro tipos de VPH (6, 11, 16 y 18) por separado y en una vacuna

Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.  
Jose Verone  
Apoderado

MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.  
Eduardo Sebastián Darío Goldentul  
DIRECTOR TÉCNICO  
MATRICULA NACIONAL 15436



tetravalente formulada, GARDASIL®, en los primates no humanos. Se generaron títulos elevados de anticuerpos séricos específicos por tipo para las partículas parecidas a virus de cada tipo de VPH. Además, se demostró que el suero policlonal contenía anticuerpos neutralizantes específicos contra las partículas parecidas a virus del VPH. Estos datos respaldan la hipótesis de que GARDASIL® generará protección contra la infección por VPH mediante inmunidad humoral en los estudios clínicos en seres humanos.

#### 2.1.5 Quinto estudio de inmunogenicidad en primates no humanos: monos rhesus

Se administró por inyección intramuscular la vacuna tetravalente contra el virus del papiloma humano (de partículas parecidas a virus recombinantes de VPH de los tipos 6, 11, 16, 18), formulada con y sin el adyuvante de aluminio de Merck, a 10 monos rhesus de entre 2 y 6 años de edad. Cada animal recibió tres dosis (a las 0, 8 y 24 semanas), y se tomaron muestras de suero a las 0, 2, 4, 8, 10, 12, 16, 20, 24, 26, 28 y 52 semanas. El estudio se realizó para evaluar la respuesta de anticuerpos a las partículas parecidas a virus de cada tipo de VPH (6, 11, 16 y 18) administradas juntas en la formulación tetravalente, con y sin el adyuvante de aluminio. El estudio no estuvo sujeto a las condiciones de buenas prácticas de laboratorio (GLP). Los 34 monos verdes fueron albergados en salas con control ambiental. Para cada dosis, se administraron aproximadamente 0.5 ml del material de prueba en el músculo deltoides izquierdo o derecho de cada animal (0.5 ml por mono por dosis). La concentración de las partículas parecidas a virus de L1 de cada tipo de VPH administrado fue de 2 µg/dosis; así pues, cada dosis de vacuna tetravalente contenía un total de 8 µg (2 µg por tipo de VPH por dosis).

Los animales se mantuvieron bajo vigilancia, y los signos físicos relativos a la administración de la vacuna se observaron el día de la administración y en los días en que se registró el peso corporal y se tomaron muestras de suero. Para los análisis de inmunogenicidad, se obtuvieron muestras de suero de los monos y se analizaron en busca de anticuerpos contra el VPH específicos de tipo usando un inmunoanálisis competitivo con Luminex® (IALc) cuádruple (Ref. 4.3: 4). El inmunoanálisis de VPH con Luminex® cuádruple permite la cuantificación simultánea


Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.  
Jose Verone  
Apoderado

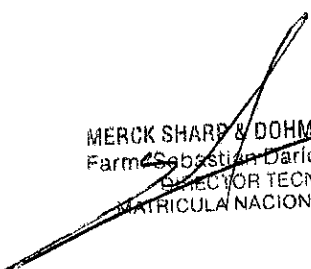
MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.  
Farm. Sebastián Darío Goldentul  
DIRECTOR TECNICO  
MATRICULA NACIONAL 16436



de los anticuerpos neutralizantes contra el VPH de los tipos 6, 11, 16 y 18 en una sola muestra de suero. El análisis emplea partículas parecidas a virus (PPV) derivadas de levadura que se acoplaron con cuatro tipos distintos de microesferas fluorescentes de Luminex® (las cuales se identifican por sus propiedades fluorescentes particulares). Los títulos de anticuerpos se determinaron en un formato competitivo, donde los anticuerpos monoclonales neutralizantes conocidos específicos de cada tipo, marcados con ficoeritrina (FE), competían por unirse a los epítomos neutralizantes de las partículas parecidas a virus, sensibles a la conformación. Para cada serotipo, la inhibición relativa de la unión de los anticuerpos monoclonales se comparó con un suero estándar de referencia, usando una curva logística de cuatro parámetros. El suero de referencia era suero obtenido de varios monos verdes africanos (inmunizados con partículas parecidas a virus del VPH de los tipos 6, 11, 16 o 18) que se acumuló y al cual se le asignaron valores arbitrarios, expresados en miliunidades Merck (mUM) por mililitro. Los datos, en unidades medianas de intensidad de la fluorescencia, se procesaron mediante el programa de computadora StatLIA y se expresan en mUM/ml. Además, se aplicó la plataforma de Luminex® de manera no competitiva para evaluar la IgG específica total contra las partículas parecidas a virus en el suero y el perfil de isotipos específicos contra las PPV.

Se obtuvo una respuesta característica de sensibilización y refuerzo, con una elevación de los títulos hasta 10 veces su valor inicial, cuando menos, dos semanas después de cada inmunización (Sec. 2.6.3.2E). En términos generales, la respuesta de anticuerpos neutralizantes específicos contra las PPV del VPH desencadenada por la vacuna tetravalente de partículas parecidas a virus de L1 de VPH formulada con adyuvante de aluminio fue más intensa que la provocada por la vacuna tetravalente formulada sin adyuvante (Cuadro 2.6.2: 3).

  
Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.  
**José Verone**  
Apoderado

  
MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.  
Farm. Sebastián Darío Goldentul  
DIRECTOR TÉCNICO  
MATRICULA NACIONAL 15436



**Cuadro 2.6.2: 3**

**Media geométrica de los títulos de anticuerpos contra el VPH, medidos por IALc dos semanas y seis meses después de la tercera dosis de vacuna tetravalente de PPV de L1 del VPH, con y sin adyuvante de aluminio**

	Media geométrica de los títulos de anticuerpos contra el VPH, medidos por IALc							
	VPH 6		VPH 11		VPH 16		VPH 18	
	Sem 26	Sem 52	Sem 26	Sem 52	Sem 26	Sem 52	Sem 26	Sem 52
<b>Tetravalente con adyuvante</b>	7,035	472	6,654	469	17,871	3,416	5,978	692
<b>Tetravalente sin adyuvante</b>	309	110	361	89	3,702	537	892	34

[Sec. 2.6.3.2E]

En general, las respuestas de IgG a las partículas parecidas a virus de los cuatro tipos de VPH en la vacuna tetravalente fueron similares para todos los tipos. Los resultados se presentan en la Sec. 2.6.3.2E; en cambio, los resultados de las medias geométricas de los títulos de IgG total dos semanas y seis meses después de la tercera dosis se resumen en el Cuadro 2.6.2: 4. Es evidente que la formulación de la vacuna que contiene adyuvante de aluminio de Merck indujo una respuesta considerablemente más intensa de IgG total específica para las partículas parecidas a virus.

**Cuadro 2.6.2: 4**

**Media geométrica de los títulos de IgG total en la dilución del punto final, 2 semanas y 6 meses después de la tercera dosis**

	Media geométrica de los títulos de anticuerpos contra el VPH, medidos por IALc							
	VPH 6		VPH 11		VPH 16		VPH 18	
	Sem 26	Sem 52	Sem 26	Sem 52	Sem 26	Sem 52	Sem 26	Sem 52
<b>Tetravalente con adyuvante</b>	297,446	82,079	297,446	59,489	410,395	82,079	215,583	113,247
<b>Tetravalente sin adyuvante</b>	8,623	4,530	8,623	3,283	31,250	3,283	4,530	1,250

[Sec. 2.6.3.2E]

*JH*  
 Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.  
**Jose Herone**  
 Apoderado

*[Signature]*  
 MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.  
 FARM. Sebastián Darío Goldentul  
 DIRECTOR TÉCNICO  
 MATRICULA NACIONAL 15496



La vacuna tetravalente contra el VPH que contiene el adyuvante de aluminio induce títulos más altos de los isotipos de los anticuerpos específicos contra las PPV, IgG1, IgG4, IgA e IgM, en comparación con la vacuna tetravalente formulada sin adyuvante (Sec. 2.6.3.2E) (Cuadro 2.6.2: 5).

Cuadro 2.6.2: 5

Media geométrica de los títulos en la dilución del punto final -  
Perfil de los isotipos 2 semanas y 6 meses después de la tercera dosis

	Media geométrica de los títulos de anticuerpos IgG1 contra el VPH							
	VPH 6		VPH 11		VPH 16		VPH 18	
	Sem 26	Sem 52	Sem 26	Sem 52	Sem 26	Sem 52	Sem 26	Sem 52
Tetravalente con adyuvante	476	345	1,250	60	657	95	476	95
Tetravalente sin adyuvante	36	8	36	4	32	9	14	2
	Media geométrica de los títulos de anticuerpos IgG4 contra el VPH							
	VPH 6		VPH 11		VPH 16		VPH 18	
	Sem 26	Sem 52	Sem 26	Sem 52	Sem 26	Sem 52	Sem 26	Sem 52
Tetravalente con adyuvante	906	3	906	3	1,250	14	476	10
Tetravalente sin adyuvante	23	1	23	1	50	1	12	1
	Media geométrica de los títulos de anticuerpos IgA contra el VPH							
	VPH 6		VPH 11		VPH 16		VPH 18	
	Sem 26	Sem 52	Sem 26	Sem 52	Sem 26	Sem 52	Sem 26	Sem 52
Tetravalente con adyuvante	113,247	11,898	113,247	3,283	113,247	11,898	43,117	6,250
Tetravalente sin adyuvante	6,250	345	8,623	181	6,250	657	3,283	95
	Media geométrica de los títulos de anticuerpos IgM contra el VPH							
	VPH 6		VPH 11		VPH 16		VPH 18	
	Sem 26	Sem 52	Sem 26	Sem 52	Sem 26	Sem 52	Sem 26	Sem 52
Tetravalente con adyuvante	476	50	114	19	906	95	3	52
Tetravalente sin adyuvante	44	19	23	10	32	4	8	2

(Sec. 2.6.3.2E)

*jm*  
Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.  
Jose Nerone  
Apoderado

MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.  
Farré, Sebastián Darío Goldentul  
DIRECTOR TÉCNICO  
MATRICULA NACIONAL 15438



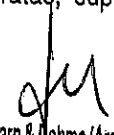
En conclusión, la inmunización con la vacuna tetravalente de partículas parecidas a virus de L1 contra el VPH indujo una vigorosa respuesta inmune serológica específica contra las PPV del VPH. Los títulos de los anticuerpos específicos se incrementaron considerablemente al emplear la vacuna tetravalente formulada con el adyuvante de aluminio de Merck, en comparación con la vacuna tetravalente formulada sin adyuvante. Se examinaron los perfiles de los anticuerpos totales y los isotipos generados por la administración de la vacuna tetravalente. Esta induce títulos elevados de IgG total, además de concentraciones significativas de IgA y concentraciones mensurables de IgM, IgG1 e IgG4 (Ref. 4.3: 18). La IgA es un importante isotipo de los anticuerpos que está presente en las secreciones cervicouterinas, ubicación de las infecciones por el VPH de los tipos 6, 11, 16 y 18, además de la IgG (Ref. 4.3: 8). La vacuna fue bien tolerada, y no se observaron efectos adversos.

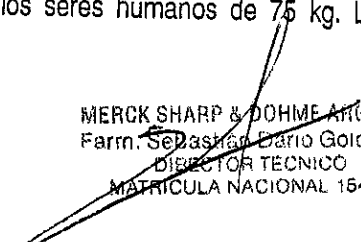
### PARTE C

#### 1 Síntesis de los Estudios Toxicológicos

Los estudios no clínicos de toxicología que respaldan la seguridad de GARDASIL® (L-000931225 o L-931225), también conocido como vacuna recombinante contra el virus del papiloma humano (tipos 6, 11, 16, 18), fueron un estudio de toxicidad de dosis única en ratones, un estudio de toxicidad de dosis única en ratas, un estudio de toxicidad de dosis repetidas en ratones, un estudio de toxicidad reproductiva y del desarrollo en ratas y un estudio de tolerancia local en conejos (Sec. 2.6.7.1). Los cinco estudios de toxicología se realizaron en condiciones de buenas prácticas de laboratorio (GLP), y cumplen con las recomendaciones de la EMEA (Agencia Europea para la Evaluación de Productos Medicinales), de la OMS (Organización Mundial de la Salud) y del Centro para Evaluación e Investigación sobre Biológicos, de la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (CBER/FDA, por sus siglas en inglés) (Ref. 4.3: 1, 2, 15). Además, se realizaron dos estudios exploratorios de inmunogenicidad en ratas, no sujetos a las buenas prácticas de laboratorio (no GLP) (Sec. 2.6.7.1).

La toxicidad de las dosis únicas de GARDASIL® se evaluó en dos estudios en ratones y ratas, en condiciones de buenas prácticas de laboratorio (GLP), (Sec. 2.6.7.3). La dosis administrada representa un múltiplo de aproximadamente 1200 veces en los ratones y 300 veces en las ratas, suponiendo un peso corporal de los seres humanos de 75 kg. La vacuna fue bien

  
Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.  
José Narone  
Adequado


  
MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.  
Farrn. Sebastián Darío Goldentui  
DIRECTOR TÉCNICO  
MATRÍCULA NACIONAL 15438

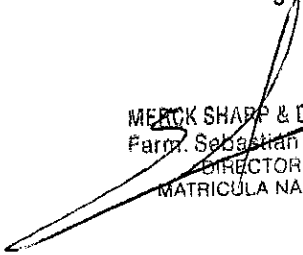


tolerada y no hubo efectos relacionados con el tratamiento sobre mortalidad, signos físicos ni cambios en el peso corporal durante un periodo de observación de 14 días.

La toxicidad de las dosis repetidas de GARDASIL® se evaluó en un estudio en ratones en condiciones de buenas prácticas de laboratorio (GLP). La vacuna se administró como un esquema de 1 o 3 dosis a lo largo de aproximadamente 10 semanas; cada dosis correspondió aproximadamente a 1,450 veces la dosis para humanos en proporción al peso corporal. No hubo hallazgos premórtem relacionados con el tratamiento. Se observó hiperplasia relacionada con el tratamiento en los ganglios linfáticos ilíacos e inguinales, e inflamación muscular relacionada con el tratamiento en los sitios de inyección. Sin embargo, no hubo un aumento relacionado con el tratamiento en el daño global en los sitios de inyección, en comparación con un control que recibió el adyuvante de aluminio como placebo. Estas observaciones son de esperarse con una vacuna, e indican una respuesta inmune activa. No hubo indicios de toxicidad sistémica inducida por el aluminio en los animales del citado estudio (Ref. 4.3: 14).

La toxicidad reproductiva y del desarrollo de GARDASIL® se evaluó en un estudio con buenas prácticas de laboratorio (GLP) en ratas hembra. El estudio de toxicidad reproductiva y del desarrollo fue una parte importante de la evaluación global no clínica de seguridad para esta vacuna, ya que su uso está indicado en mujeres en edad reproductiva. El diseño del estudio fue acorde a las directrices del CBER/FDA y de la Comisión Internacional de Armonización, o ICH (Ref. 4.3: 15, 16). Se administró a las ratas el equivalente a una dosis para humanos completa de GARDASIL®, lo cual representa un múltiplo de aproximadamente 300 veces, en proporción al peso corporal. La vacuna se administró durante la gestación y la lactancia y, en un grupo de ratas, también se administró la vacuna dos veces antes del apareamiento. En las ratas hembra F<sub>0</sub>, no hubo efectos relacionados con el tratamiento sobre mortalidad, signos físicos, aumento del peso corporal medio o consumo de alimento durante el estudio (periodo previo al apareamiento, gestación y lactancia), ni se observaron cambios macroscópicos relacionados con el tratamiento en la autopsia. GARDASIL® no mostró indicio alguno de toxicidad del desarrollo, evaluada con base en la supervivencia embrionaria y fetal, el peso corporal fetal y la morfología externa, visceral, coronal y esquelética de los fetos. Asimismo, no hubo efecto alguno relacionado con el tratamiento sobre los signos del desarrollo, la conducta,

  
**Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.**  
**Jose Herone**  
**Apoderado**

  
**MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.**  
**Farm. Sebastian Darío Goldentui**  
**DIRECTOR TECNICO**  
**MATRÍCULA NACIONAL 15436**



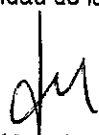
el desempeño reproductivo o la fertilidad de las crías. Los anticuerpos contra los cuatro tipos de VPH se transfirieron a las crías durante la gestación y, posiblemente, durante la lactancia. Los anticuerpos transferidos de manera pasiva persistían hasta el día 77 de vida extrauterina, cuando se les midió por última vez.

La tolerancia local a GARDASIL® se evaluó en un estudio en condiciones de buenas prácticas de laboratorio mediante administración intramuscular de la vacuna en conejos (Sec. 2.6.7.6). Se administró el equivalente a una dosis para humanos completa, lo cual representa un múltiplo de hasta 40 veces en proporción al peso corporal con respecto a la dosis propuesta para humanos. La vacuna fue generalmente bien tolerada, sin efectos relacionados con el tratamiento sobre mortalidad, signos físicos o peso corporal a lo largo de un periodo de observación de 14 días. La intensidad de la reacción histopatológica local fue de muy ligera a ligera, y se asemejó estrechamente a la que causó el placebo de adyuvante de aluminio del grupo control.

Otros estudios de toxicidad de GARDASIL® fueron dos estudios exploratorios de inmunogenicidad en ratas (Sec. 2.6.7.7), no sujetos a las buenas prácticas de laboratorio. El objetivo de dichos estudios fue confirmar que GARDASIL® induciría una respuesta inmune en el modelo animal empleado para las pruebas de toxicología reproductiva y del desarrollo. En ambos estudios exploratorios, se demostró que la vacuna fue inmunogénica en las ratas, y se observó una respuesta de anticuerpos anti-VPH contra cada tipo de VPH presente en la vacuna. Estos resultados demuestran que la rata es un modelo animal apropiado para investigar los posibles efectos tóxicos relacionados con la administración de GARDASIL®.

## 2. Toxicidad de las dosis únicas

La toxicidad de las dosis únicas de GARDASIL® se evaluó en un estudio en condiciones de buenas prácticas de laboratorio (GLP) en ratones CD1 y un estudio GLP en ratas Sprague-Dawley. Además, un estudio de toxicidad de dosis únicas de GARDASIL® en ratones BALB/c, el cual incluyó una evaluación completa en la autopsia, se analizó dentro de un estudio de toxicidad de las dosis repetidas (Sec. 2.6.7.4).

  
Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.  
Jose Corone  
Apoderado

  
MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.  
Farm. Sebastian Dario Goldentul  
DIRECTOR TECNICO  
MATRICULA NACIONAL 15436



## 2.1 Estudio de toxicidad de las dosis únicas en ratones

Diez ratones CD-1 (5 de cada sexo) recibieron una dosis intramuscular única de 0.1 ml (0.05 ml por cuadriceps) de GARDASIL®, a una concentración de 160/160/80/160 µg/ml de PPV del VPH de los tipos 6, 11, 16 y 18 (Sec. 2.6.7.2). Esto corresponde aproximadamente a un múltiplo de 1,200 veces en proporción al peso corporal, en comparación con la dosis para humanos.

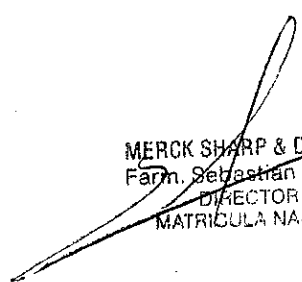
Los parámetros premórtem estudiados incluyeron observaciones diarias de mortalidad y signos físicos, con exámenes menos detallados durante los fines de semanas y los días feriados. Se midió el peso corporal antes de la prueba y una vez por semana durante el estudio. No hubo efectos relacionados con el tratamiento sobre la mortalidad, los signos físicos ni el peso corporal durante un periodo de observación de 14 días. Así pues, la DL<sub>50</sub> aproximada para los ratones es >0.1 ml de esta concentración particular de la vacuna (Sec. 2.6.7.3).

## 2.2 Estudio de toxicidad de las dosis únicas en ratas

Diez ratas Sprague-Dawley (5 de cada sexo) recibieron una dosis intramuscular única de 0.2 ml (0.1 ml por cuadriceps) de GARDASIL®, a una concentración de 160/160/80/160 µg/ml de PPV del VPH de los tipos 6, 11, 16 y 18 (Sec. 2.6.7.2). Esto corresponde aproximadamente a un múltiplo de 300 veces en proporción al peso corporal en comparación con la dosis para humanos.

Los parámetros premórtem estudiados incluyeron observaciones diarias de mortalidad y signos físicos, con exámenes menos detallados durante los fines de semanas y los días feriados. Se midió el peso corporal antes de la prueba y una vez por semana durante el estudio. La vacuna fue bien tolerada. No hubo efectos relacionados con el tratamiento sobre la mortalidad, los signos físicos ni el peso corporal durante un periodo de observación de 14 días. Así pues, la DL<sub>50</sub> aproximada para las ratas es >0.2 ml de esta concentración particular de la vacuna (Sec. 2.6.7.3).

  
Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.  
Jose Ferone  
Apodador

  
MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.  
Farm. Sebastian Dario Goldentul  
DIRECTOR TECNICO  
MATRICULA NACIONAL 15436




### 3. Toxicidad de las dosis repetidas

Se realizó un estudio de 10 semanas de toxicidad de las dosis repetidas en ratones BALB/c, en condiciones de buenas prácticas de laboratorio, para investigar la posible toxicidad derivada de la administración intramuscular única y repetida de GARDASIL® (Sec. 2.6.7.4).

Los ratones tratados con la vacuna (30 de cada sexo) recibieron ya fuera una o tres dosis de GARDASIL®, a una concentración de 160/160/80/160 µg/ml de PPV del VPH de los tipos 6, 11, 16 y 18 (Sec. 2.6.7.2). Los ratones de control (30 de cada sexo) recibieron una o tres dosis de adyuvante de aluminio de Merck como placebo de control. Para cada dosis, se administraron aproximadamente 50 µl de la vacuna o del placebo en los músculos cuádriceps derecho e izquierdo de cada ratón (100 µl por ratón por dosis). En proporción al peso corporal, la dosis de vacuna administrada a los ratones tenía un margen de seguridad de aproximadamente 1,450 veces con relación a la dosis propuesta para seres humanos.

Todos los animales (30 ratones de cada sexo por grupo) recibieron ya fuera vacuna o placebo el día 1 del estudio. Una semana después de la primera dosis (día 8 del estudio), se desangró a 15 ratones de cada sexo por grupo para hacer estudios de hematología (7 ratones de cada sexo por grupo) y de bioquímica sérica (8 ratones de cada sexo por grupo), y a continuación se les practicó la autopsia ("autopsias intermedias"). Los animales restantes (15 ratones de cada sexo por grupo) recibieron la vacuna o el placebo los días 29 y 57 del estudio, para un total de tres dosis por cada animal. El día 64 del estudio, los 15 ratones de cada sexo restantes por grupo fueron desangrados para hacer estudios de hematología (7 ratones de cada sexo por grupo) y de bioquímica sérica (8 ratones de cada sexo por grupo), y a continuación se les practicó la autopsia ("autopsias finales").

Los animales se sometieron a observaciones diarias de mortalidad y signos físicos, con exámenes menos detallados durante los fines de semanas. Se registró el peso corporal antes de la prueba y una vez por semana durante el estudio. El consumo de alimento se midió una vez por semana durante un lapso de tres días. Todos los ratones fueron anestesiados y sacrificados por exsanguinación antes de realizar la autopsia. Se efectuó una autopsia completa a todos los animales, que incluyó el examen y la toma de muestras de una extensa

  
Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.  
Jose Merone  
Apoderado

  
MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.  
Farm. Sebastian Dario Goldentul  
DIRECTOR TECNICO  
MATRICULA NACIONAL 15436



lista de tejidos. Se registraron el peso corporal final y el peso de los siguientes órganos de todos los animales sacrificados durante las autopsias programadas: cerebro, corazón, riñones, hígado, bazo y testículos. Después de fijar y procesar los tejidos de manera convencional, los cortes de diversos tejidos de los animales de control y vacunados con dosis altas se tiñeron con hematoxilina y eosina y se examinaron bajo el microscopio. Además, a discreción del patólogo, los tejidos con cambios macroscópicos se procesaron de igual manera, se tiñeron y se examinaron al microscopio.

Todos los animales sobrevivieron hasta las autopsias programadas. No hubo cambios relacionados con el tratamiento en signos físicos, aumento de peso corporal, consumo de alimento, citología hemática o análisis bioquímicos del suero. No hubo cambios relacionados con el tratamiento en el peso de los órganos. Macroscópicamente, hubo un aumento de volumen de los ganglios linfáticos iliacos relacionado con el tratamiento, tanto en las autopsias intermedias como en las finales. Se observaron cambios microscópicos relacionados con el tratamiento en los ganglios linfáticos y en los músculos del sitio de inyección, como se menciona en el Cuadro 2.6.6: 1.

**Cuadro 2.6.6: 1**  
**Cambios histomorfológicos observados en un estudio de toxicidad de las dosis repetidas en ratones**

Incidencia, n = 15  
(Estudio número TT # 01-026-0)

	Hembras		Machos	
	Control adyuvante como placebo	con GARDASIL® Vacuna tetravalente contra VPH 6, 11, 16 y 18	Control adyuvante como placebo	con GARDASIL® Vacuna tetravalente contra VPH 6, 11, 16 y 18
Ganglios linfáticos iliacos				
Hiperplasia				
Autopsias intermedias	1	15 <sup>a</sup>	0	14 <sup>a</sup>
Autopsias finales	1	15 <sup>a</sup>	0	15 <sup>a</sup>
Ganglios linfáticos inguinales				
Hiperplasia				
Autopsias intermedias	2	12 <sup>a</sup>	1	9 <sup>a</sup>
Autopsias finales	0	9 <sup>a</sup>	0	8 <sup>a</sup>
Sitio de inyección				
Inflamación mixta				
Autopsias intermedias	15	15 <sup>a</sup>	15	13
Autopsias finales	15	15 <sup>a</sup>	15	15 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Cambio relacionado con el tratamiento, basado en la incidencia, la intensidad o ambas.

Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.  
Jose Ferrone  
Aprobado

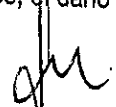
MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.  
Firm. Sebastián Darío Goldentul  
DIRECTOR TÉCNICO  
MATRÍCULA NACIONAL 15436



(Sec. 2.6.7.4)

La hiperplasia de los ganglios linfáticos iliacos e inguinales relacionada con el tratamiento, en los animales que recibieron la vacuna contra el VPH, fue muy ligera o ligera, y se observó tanto en las autopsias intermedias como en las finales. Se caracterizó por la presencia de folículos corticales con centros germinales prominentes, y a menudo por cordones medulares engrosados e hipercelulares.

Como se indica en el Cuadro 2.6.6: 1, se presentó inflamación en el músculo de los sitios de inyección en casi todos los animales del estudio. Sin embargo, la intensidad de la inflamación fue mayor, al momento de la autopsia intermedia, en las hembras que recibieron la vacuna, y tanto en hembras como en machos al momento de la autopsia final, en comparación con los animales de control, que recibieron el adyuvante de aluminio como placebo. En los controles, la inflamación fue muy ligera o ligera, excepto en un animal en la autopsia final, en el que fue moderada. En las hembras que recibieron la vacuna, al momento de las autopsias intermedias, y en los animales de ambos sexos que recibieron la vacuna, en las autopsias finales, la intensidad de la inflamación muscular en los sitios de inyección fue ligera o moderada. En las autopsias intermedias, tanto en los animales de control como en los vacunados, la inflamación muscular en los sitios de inyección consistió en células inflamatorias mixtas, principalmente macrófagos y neutrófilos. Estas células rodeaban la sustancia inyectada, la cual tenía el aspecto de una masa de material granuloso eosinofílico. En las autopsias finales, tanto en los animales de control como en los vacunados se encontraron zonas de inflamación en el músculo de los sitios de inyección, que fueron histológicamente similares a las observadas en los animales en las autopsias intermedias. Dichos focos quizá representaban las inyecciones más recientes. Además, había otros focos en el músculo, en los cuales todo el material inyectado había sido fagocitado por los macrófagos. Estos focos consistían de manera casi exclusiva en macrófagos grandes con material granuloso en su interior. Dichas áreas quizá representaban los sitios de las primeras inyecciones. Pese a la intensidad ligeramente mayor de la infiltración celular en el músculo de algunos de los animales que recibieron la vacuna, el daño global en los sitios de inyección no fue mayor en estos animales que en los controles. Tanto en los controles como en los ratones vacunados, tanto en las autopsias intermedias como en las finales, el daño global fue muy ligero o ligero.

  
Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.  
Jose Berone  
Apoderado

  
MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.  
Farm Sebastian Darío Goldentul  
DIRECTOR TECNICO  
MATRICULA NACIONAL 15436




Aparte de los cambios observados en los sitios de inyección y sus zonas circundantes, o en los ganglios linfáticos regionales, no hubo cambios histológicos significativos en ninguno de los tejidos examinados de los animales del presente estudio. Esto se refiere tanto a las autopsias intermedias como a las finales y a los grupos con la vacuna como a los de control, todos los cuales recibieron el adyuvante de aluminio. Así pues, no hay indicio alguno de toxicidad sistémica inducida por el adyuvante de aluminio (en particular, ningún indicio de toxicidad para el encéfalo o la médula espinal) en los animales del estudio (Ref. 4.3: 14).

En conclusión, la administración intramuscular de 1 o 3 dosis (con un intervalo de 4 semanas) de GARDASIL® en ratones BALB/c fue bien tolerada a lo largo de 8 días (dosis única, sacrificio intermedio) o 64 días (3 dosis, sacrificio terminal) de duración del estudio. No hubo muertes ni cambios relacionados con el tratamiento en signos físicos, aumento de peso corporal, consumo de alimento, citología hemática o análisis bioquímicos del suero. No hubo cambios relacionados con el tratamiento en el peso de los órganos. Tanto en las autopsias intermedias como en las finales se observó un aumento de volumen relacionado con el tratamiento en los ganglios linfáticos iliacos. Microscópicamente, se descubrió hiperplasia relacionada con el tratamiento en los ganglios linfáticos iliacos e inguinales, tanto en las autopsias intermedias como en las finales. Además, se observó inflamación relacionada con el tratamiento en el músculo de los sitios de inyección en las autopsias en ambos puntos; sin embargo, no hubo un mayor daño relacionado con el tratamiento en comparación con el grupo de control, que recibió adyuvante de aluminio como placebo.

#### 4. Genotoxicidad

No se evaluó el potencial mutagénico o de toxicidad genética de GARDASIL®. Según la "Nota sobre directrices relativas a las pruebas farmacológicas y toxicológicas preclínicas de las vacunas" (CPMP/SWP/465/95) de la EMEA (Ref. 4.3: 1) y las "Directrices sobre la evaluación no clínica de las vacunas", de la OMS (Ref. 4.3: 2), generalmente no se requieren estudios de genotoxicidad para las vacunas.

#### 5. Carcinogenicidad

  
Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.  
José Perone  
ApoDERADO

  
MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.  
Fabr. Sebastián Darío Goldent  
DIRECTOR TÉCNICO  
MATRICULA NACIONAL 15438



No se evaluó el potencial oncogénico o carcinogénico de GARDASIL®. Según la "Nota sobre directrices relativas a las pruebas farmacológicas y toxicológicas preclínicas de las vacunas" (CPMP/SWP/465/95) de la EMEA (Ref. 4.3: 1) y las "Directrices sobre la evaluación no clínica de las vacunas", de la OMS (Ref. 4.3: 2), generalmente no se requieren estudios de carcinogenicidad para las vacunas.

## 6 Toxicidad reproductiva y del desarrollo

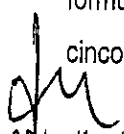
### 6.1 Fertilidad y desarrollo embrionario temprano

El efecto de GARDASIL® sobre la fertilidad y el desarrollo embrionario se evaluó en un estudio que se describe en la próxima sección, bajo "Desarrollo embrionario y fetal" (Sec. 2.6.6.6.2).

### 6.2 Desarrollo embrionario y fetal

El efecto de GARDASIL® sobre el desarrollo embrionario y fetal se evaluó en un estudio con buenas prácticas de laboratorio (GLP) en ratas hembra. El objetivo de dicho estudio fue evaluar los efectos potenciales de la vacuna sobre el desarrollo, el crecimiento, la conducta, el desempeño reproductivo y la fertilidad de las crías (la generación F<sub>1</sub>), y medir los anticuerpos anti-VPH en las hembras F<sub>0</sub> y en la generación F<sub>1</sub>, después de la administración intramuscular a ratas hembra F<sub>0</sub> ya expuestas a la vacuna (se administró la vacuna cinco y dos semanas antes del apareamiento y los días 6° de la gestación y 7° de la lactancia) y a ratas hembra F<sub>0</sub> inmunológicamente "vírgenes", es decir, no expuestas a la vacuna (se administró la vacuna los días 6° de la gestación y 7° de la lactancia). El estudio se diseñó de conformidad con el borrador de las directrices "Consideraciones sobre los estudios de toxicidad reproductiva para las vacunas preventivas indicadas contra las enfermedades infecciosas", del Centro para Evaluación e Investigación sobre Biológicos, de la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (CBER/FDA, por sus siglas en inglés) (Ref. 4.3: 15).

Un grupo de 65 ratas hembra recibió GARDASIL® los días 6° de la gestación y 7° de la lactancia (grupo 1 con vacuna). Tres grupos, cada uno de 65 ratas, recibieron GARDASIL® (grupo 2 con vacuna), solución salina amortiguada con fosfato (grupo de control 1) o una formulación de adyuvante de aluminio de Merck de control como placebo (grupo de control 2) cinco semanas y dos semanas antes de aparearse, el 6° día de la gestación y el 7° día de la

  
Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.  
José Nerone  
Apuerado

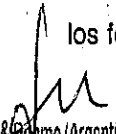
  
MERCK SHARP & DOHME ARG. INC  
Farm. Sebastián Darío Goldentú  
DIRECTOR TÉCNICO  
MATRICULA NACIONAL 15438



lactancia. Para cada dosis, se administró aproximadamente 250 µl del material de prueba o de control en los músculos cuádriceps derecho e izquierdo de cada rata (500 µl por rata por dosis). Cada grupo de 65 hembras incluyó a seis hembras adicionales, que se usaron a fin de contar con 44 hembras apareadas y 15 hembras para la obtención de muestras de sangre. La formulación de la vacuna contenía 40/80/80/40 µg/ml de PPV del VPH de los tipos 6, 11, 16 y 18 (Sec. 2.6.7.2). Así pues, con base en el peso corporal, la dosis de vacuna administrada a las ratas tenía un margen de seguridad de aproximadamente 300 veces con respecto a la dosis proyectada para seres humanos.

Los animales fueron observados diariamente por posibles muertes. Se observaron los signos físicos una vez por semana durante los periodos previo al apareamiento y de cohabitación, el día 0 de la gestación, y diariamente desde el 6° día de la gestación hasta el sacrificio. Se hizo una observación adicional entre 1 y 5 horas después de la administración de las sustancias del estudio. Se registró el peso corporal una vez por semana durante el periodo previo al apareamiento; los días 0, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 y 21 de la gestación (y también 22 y 24, cuando fue necesario); y los días 0, 3, 7, 10, 14, 17 y 21 de la lactancia. Se midió el consumo de alimento en los siguientes intervalos: días 3-5, 6-8, 10-12, 14-16 y 18-20 de la gestación, y días 1-5 y 8-12 de la lactancia. Se realizó una exploración oftálmica en todos los animales una vez antes del tratamiento, a fin de excluir a aquellos animales con posibles anomalías hereditarias.

Veintidós hembras por grupo, elegidas para cesárea, fueron sacrificadas en forma indolora mediante asfixia con CO<sub>2</sub> el día 21 de la gestación. El útero de cada hembra se examinó para determinar el estado de la gestación y se contaron los cuerpos lúteos. En todas las hembras sujetas a cesárea se realizó una exploración macroscópica de las vísceras torácicas y abdominales. Se registró la ubicación y el número de implantaciones y cada una se clasificó como feto vivo, feto muerto o resorción. Todos los fetos fueron pesados y examinados externamente, y se examinaron las placentas en busca de anomalías macroscópicas. Todos los fetos fueron sacrificados mediante administración oral de pentobarbital sódico. La mitad de los fetos de cada camada fueron examinados en busca de anomalías viscerales por disección

  
Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.  
José Nerone  
Apoderado

  
MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.  
Fam. Sebastián Darío Goldentul  
DIRECTOR TÉCNICO  
MATRICULA NACIONAL 15438

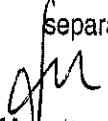


en fresco, que incluyó cortes coronales libres de la cabeza fijada con medio de Bouin. Se examinó a todos los fetos en busca de alteraciones esqueléticas.

Veintidós hembras por grupo, elegidas para dar a luz de manera natural, fueron observadas en busca de signos de trabajo de parto desde el día 21 de la gestación hasta el final del parto. Las crías  $F_1$  se contaron y examinaron en busca de anomalías externas; se les pesó, se determinó su sexo y se les identificó mediante tatuajes en el extremo de la pata el día del nacimiento (día posnatal 0). El día posnatal 3, se determinó el sexo de las camadas y se les redujo a 4 crías tatuadas de cada sexo (cuando fue posible); las demás crías fueron sujetas a eutanasia y desechadas. Se registró el peso corporal y se verificó el sexo los días posnatales 7, 14 y 21. El día posnatal 21, se separó de las madres a dos crías de cada sexo por camada y se les albergó por pares de cada sexo, en tanto que las crías restantes fueron sacrificadas y desechadas. Todas las hembras  $F_0$  fueron sometidas a un examen macroscópico de las vísceras torácicas y abdominales; se revisó el útero de todas ellas en términos de una posible gestación y para contar las glándulas metriales, si las había.

Para los análisis de inmunogenicidad, se tomaron muestras del seno orbitario de 15 ratas hembra  $F_0$  de cada grupo, sin ayuno, el día previo a la administración de la dosis de 5 semanas antes del apareamiento y el primer día de la cohabitación. El día 21 de la gestación, se obtuvieron muestras de la vena cava inferior de estas mismas hembras. Además, se tomaron muestras de sangre fetal de 10 de estas hembras por grupo. La sangre fetal se obtuvo de los vasos umbilicales cortados y subsecuentemente se acumuló por camada.

Los animales  $F_1$  seleccionados para después del destete se identificaron con microchips implantados y se sometieron a observaciones de mortalidad diarias y de signos físicos dos veces por semana. Se registró el peso corporal una vez por semana, desde el destete hasta el apareamiento o el final del estudio. Se realizaron observaciones de la abertura vaginal el día posnatal 28 y en días alternos en lo subsecuente hasta el día posnatal 38, o hasta que se observó y registró la abertura vaginal. La separación del prepucio se registró el día posnatal 38 y en días alternos en lo subsecuente hasta el día posnatal 50 o hasta que se observó la separación. Se realizó una exploración oftálmica en todos los animales una vez, entre los días

  
Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.  
Jose Perone  
Apoderado


  
MERCK SHARP & DOHME ARG. INC.  
Farm. Sebastián Darío Goldentu  
DIRECTOR TÉCNICO  
MATRICULA NACIONAL 15436



posnatales 47 y 52. En una hembra y un macho F<sub>1</sub> de cada camada se hicieron pruebas de evitación pasiva entre los días posnatales 34 y 36 y una semana después, y se sometió a los mismos animales a pruebas de habituación al sobresalto auditivo una vez entre los días posnatales 61 y 65. Otro par de animales de cada camada se sometió a pruebas de actividad motora en campo abierto una vez entre los días posnatales 68 y 70.

Una hembra y un macho del mismo grupo de dosis, pero de diferentes camadas, fueron apareados durante la 12<sup>a</sup> semana posnatal, hasta un máximo de 20 noches. Las hembras F<sub>1</sub> que se aparearon fueron pesadas los días 0, 6, 14 y 20 de gestación, y después del parto natural el día 0 de la lactancia. Todos los machos F<sub>1</sub> y las hembras que no se usaron para aparearse fueron sacrificados mediante asfixia con CO<sub>2</sub> y desechados sin más exámenes durante las semanas posnatales 15 o 16. Las hembras F<sub>1</sub> que dieron a luz fueron sacrificadas mediante asfixia con CO<sub>2</sub> entre los días 0 y 4 de la lactancia (semanas posnatales 14 a 17), y se examinó el útero de cada una para contar las glándulas metriales. Las crías F<sub>2</sub> fueron contadas y pesadas; se determinó su sexo, se les examinó en busca de malformaciones externas y se registró la mortalidad el día posnatal 0. Todas las crías F<sub>2</sub> fueron sacrificadas y desechadas sin más exámenes el día posnatal 0.

Para los análisis de inmunogenicidad, se obtuvieron muestras de sangre de las crías sin ayuno el día posnatal 21 (10 camadas y una cría de cada sexo por camada de todos los grupos). El día posnatal 77, se obtuvieron muestras de sangre de 10 animales de cada sexo por grupo (generalmente, de las mismas camadas usadas el día posnatal 21, y animales que no estaban empleándose para evaluar el desempeño reproductivo). Las muestras de sangre fueron analizadas mediante el inmunoanálisis Luminex<sup>®</sup> cuádruple para VPH, un inmunoanálisis competitivo que permite la cuantificación simultánea de los anticuerpos neutralizantes contra el VPH de los tipos 6, 11, 16 y 18 en una sola muestra de suero. El análisis emplea partículas parecidas a virus (PPV) derivadas de levadura que se acoplaron con cuatro tipos distintos de microesferas fluorescentes de Luminex<sup>®</sup> (las cuales se identifican por sus propiedades fluorescentes particulares). Los títulos de anticuerpos se determinaron en un formato competitivo, donde los anticuerpos monoclonales neutralizantes conocidos específicos de cada tipo, marcados con ficoeritrina (FE), competían con cada muestra de suero de las ratas por

  
Merck Sharp & Dohme (Argentina) Inc.  
José Verone  
APC

  
MERCK SHARP & DOHME ARG. INC  
Farrn. Sebastián Darío Goldentur  
DIRECTOR TÉCNICO  
MATRICULA NACIONAL 15436

