



Lot 116321
Page 31 of 51
Prot. 1026/11

Identity of neuraminidase (Specification: Positive for B strain)

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

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

Identity of haemagglutinin (Specification: Positive for B strain)

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

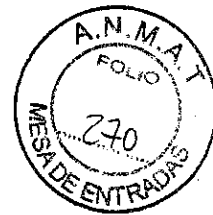
| Antigen | HI titre | | |
|---|---------------------------|---------------------------|---------------------|
| | Antiserum | | |
| | [A(H1N1)] X-181/10/118 | [A(H3N2)] X-187/10/182 | [B] BX-35/10/146 |
| NYMC BX-35 Working seed Lot WS-093-01 dil. (10 ⁻⁵) 10 ⁻⁶ | 20 | 20 | 640 |

Novartis Argentina S.A.
Dr. Lucio Jeroncio
Director Técnico
MN 14840

Novartis Argentina S.A.
Vaccines, Reproductive
Pharm. Area
Cte. Asesoría Regulatorias
Apoderada







Lot 116321
Page 33 of 51
Prot. 1026/11

| | |
|---|----------------------------------|
| Date of pooling of monovalent lots | December 24, 2010 |
| Method of disruption | Treatment with Tween 80 and CTAB |
| Date of disruption | December 27, 2010 |
| Date of sterile 0.2 µm final filtration | January 03, 2011 |
| Volume of monovalent pooled harvest | 61,731 mL |
| Storage conditions of monovalent pooled harvest | 2 - 8°C |

Tests on monovalent pooled harvest

Identity of neuraminidase (Specification: Positive for B strain)

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

Identity of haemagglutinin (Specification: Positive for B strain)

| | |
|--------------|-----------------------|
| Method | SRID |
| Date of test | January 13, 2011 |
| Result | Positive for B strain |

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

| | |
|--------------|---|
| Method | SDS-PAGE, reducing conditions |
| Date of test | January 12, 2011 |
| Result | Evidence of HA bands and absence or traces of NP and M components |

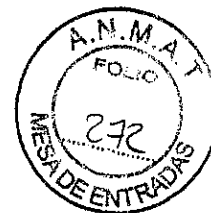
Residual CTAB (Specification: ≤ 12 mcg/60 mcg HA)

| | |
|--------------|-------------------|
| Method | Colorimetric |
| Date of test | January 10, 2011 |
| Result | < 3 mcg/60 mcg HA |

Novartis Argentina S.A.
Dr. Lucio Jeroncia
Director Técnico
MN 14840

Novartis Argentina S.A.
Vicepresidente de Investigación y Desarrollo
Dr. Lucio Jeroncia
Ej. Asesoría Regulatoria
Apoderada





Lot 116321
Page 35 of 51
Prot. 1026/11

Test for inactivation (Specification: Absence of live virus)

| | |
|--------------|-----------------------|
| Method | Hemagglutination |
| Date of test | January 07, 2011 |
| Result | Absence of live virus |

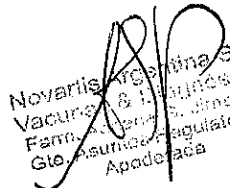
Endotoxin content (Specification: < 100 IU/60 mcg HA)

| | |
|--------------|------------------|
| Method | LAL test |
| Date of test | January 11, 2011 |
| Result | < 1 IU/60 mcg HA |

Haemagglutinin antigen content (Specification: Report result)

| | |
|--------------|------------------|
| Method | SRID |
| Date of test | January 10, 2011 |
| Result | 224 mcg HA/ml. |


Novartis Argentina S.A.
Dr. Lucio Jeroncio
Director Técnico
MN 14840


Novartis Argentina S.A.
Vacunas e Inyectivos
Farm. Lucio Jeroncio
Gto. Asunción Regulatorios
Aprobada





Lot 116321
Page 36 of 51
Prot. 1026/11

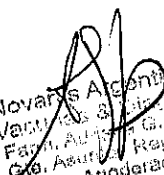
**SUMMARY PROTOCOL FOR PRODUCTION AND TESTING
OF INFLUENZA VACCINE (SUB - UNIT)
NYMC BX-35 MONOVALENT POOLED HARVEST**

Lot 1130/10

Summary

| | Page |
|---|------|
| - Seed virus: | |
| General information on seed virus | 37 |
| Tests on master seed | 38 |
| Tests on working seed | 38 |
| - Monovalent pooled harvest lot 1130/10: | |
| Production details of monovalent pooled harvest | 40 |
| Tests on monovalent pooled harvest | 41 |


Novartis Argentina S.A.
Dr. Lucio Jerssac
Director Técnico
MN 14840


Novartis Argentina S.A.
Vendedor de Productos Médicos
FARM. AUT. G. 10000000
C.A. Asur. Reguladoras
Apoderada






Lot 116321
Page 37 of 51
Prot. 1026/11

SEED VIRUS

General information on seed virus

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


Novartis Argentina S.A.
Dr. Lucio Jaramila
Director Técnico
MN 14840


Novartis Argentina S.A.
Vaccines and Diagnostics
Ente Administrativo de Regulación
de Alimentos y Medicamentos
Aprobada





Lot 116321
Page 38 of 51
Prot. 1026/11

Tests on master seed

Sterility test (Specification: Sterile)

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

Tests on working seed

Sterility test (Specification: Sterile)

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

Test for mycoplasma (Specification: Sterile)

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

Infectivity titre (Specification: $\geq 10^{5.0}$ EID₅₀/mL)

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


Novartis Argentina S.A.
Dr. Lucio Jeronimo
Director Técnico
MN 14840


Novartis Argentina S.A.
Vacunas y Productos Biológicos
Reg. Asesor. Reg. Sanitarios
Gte. Asesor. Regulatorias
Apoterapia



Lot 116321
Page 39 of 51
Prot. 1026/11

Identity of neuraminidase (Specification: Positive for B strain)

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


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

Identity of haemagglutinin (Specification: Positive for B strain)

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

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


Novartis Argentina S.A.
Dr. Lucio Jeroncia
Director Técnico
MN 14840


Novartis Argentina S.A.
Vacunas y Productos Biológicos
Farmacia y Laboratorio
Gto. Asesoría y Regulatorias
Apoderada



Lot 116321
Page 40 of 51
Prot. 1026/11

MONOVALENT POOLED HARVEST LOT 1130/10

Production details of monovalent pooled harvest

| | |
|--------------------------------------|---|
| Name and address of manufacturer | Novartis Vaccines and Diagnostics Srl Via Fiorentina, 1 - Siena (Italy) |
| B virus strain | NYMC BX-35 (B/ Brisbane/60/2008 - like virus) |
| Working seed lot used in manufacture | WS-093-01 dil. (10^{-5}) 10^{-6} |
| Date of inoculation: | |
| Monovalent lot : 399/10 | December 30, 2010 |
| Monovalent lot : 400/10 | December 31, 2010 |
| Monovalent lot : 401/10 | January 01, 2011 |
| Added antibiotics | Kanamycin sulphate and neomycin sulphate |
| Date of harvesting: | |
| Monovalent lot : 399/10 | January 03, 2011 |
| Monovalent lot : 400/10 | January 04, 2011 |
| Monovalent lot : 401/10 | January 05, 2011 |
| Method of inactivation | Treatment with formaldehyde |
| Date of inactivation: | |
| Monovalent lot : 399/10 | January 03, 2011 |
| Monovalent lot : 400/10 | January 04, 2011 |
| Monovalent lot : 401/10 | January 05, 2011 |
| Concentration/purification procedure | Continuous zonal centrifugation in sucrose gradient, adsorption with barium sulphate and elution with sodium citrate solution |


Novartis Argentina S.A.
Dr. Luis Jeronimo
Director Técnico
MN 14840


Novartis Argentina S.A.
Vaccines and Diagnostics
Parr. A. de la Plata
Gte. Asesoría Regulatoria
Apostada





Lot 116321
Page 41 of 51
Prot. 1026/11

| | |
|---|----------------------------------|
| Date of pooling of monovalent lots | January 07, 2011 |
| Method of disruption | Treatment with Tween 80 and CTAB |
| Date of disruption | January 10, 2011 |
| Date of sterile 0.2 µm final filtration | January 14, 2011 |
| Volume of monovalent pooled harvest | 60,231 mL |
| Storage conditions of monovalent pooled harvest | 2 - 8°C |

Tests on monovalent pooled harvest

Identity of neuraminidase (Specification: Positive for B strain)

| | |
|--------------|-----------------------|
| Method | ELISA |
| Date of test | January 20, 2011 |
| Result | Positive for B strain |

Identity of haemagglutinin (Specification: Positive for B strain)

| | |
|--------------|-----------------------|
| Method | SRID |
| Date of test | January 20, 2011 |
| Result | Positive for B strain |

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

| | |
|--------------|---|
| Method | SDS-PAGE, reducing conditions |
| Date of test | January 20, 2011 |
| Result | Evidence of HA bands and absence or traces of NP and M components |

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

| | |
|--------------|-------------------|
| Method | Colorimetric |
| Date of test | January 21, 2011 |
| Result | < 3 mcg/60 mcg HA |

Novartis Argentina S.A.
Dr. Lucio Jeronís
Director Técnico
MN 14840

Novartis Argentina S.A.
Vaccines Division
Farm. Avellaneda C. Avellaneda
Gte. Autor. Regulatorias
Apoderada





Lot 116321
Page 42 of 51
Prot. 1026/11

Residual barium (Specification: ≤ 1 mcg/mL)

| | |
|--------------|-------------------------|
| Method | A. A. Spectrophotometry |
| Date of test | January 21, 2011 |
| Result | < 1 mcg/mL |

Residual sodium citrate (Specification: ≤ 1 mg/60 mcg HA)

| | |
|--------------|---------------------|
| Method | HPLC |
| Date of test | January 21, 2011 |
| Result | < 0.02 mg/60 mcg HA |

Residual Tween 80 (Specification: ≤ 300 mcg/mL)

| | |
|--------------|------------------|
| Method | HPTLC |
| Date of test | January 19, 2011 |
| Result | < 300 mcg/mL |

Residual ovalbumin (Specification: Report result)

| | |
|--------------|--------------------|
| Method | ELISA |
| Date of test | January 18, 2011 |
| Result | 0.20 mcg/60 mcg HA |

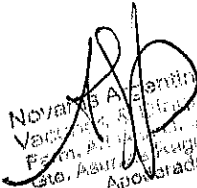
Residual formaldehyde (Specification: ≤ 1 mcg/60 mcg HA)

| | |
|--------------|--------------------|
| Method | Colorimetric |
| Date of test | January 18, 2011 |
| Result | 0.14 mcg/60 mcg HA |

Sterility test (Specification: Sterile)

| | |
|---------------|-------------------------------|
| Method | Eur. Ph., membrane filtration |
| Media | FTM and SCDM |
| Volume tested | 30 mL |
| Date of test | Jan. 14 – Jan. 28, 2011 |
| Result | Sterile |


Novartis Argentina S.A.
Dr. Lucio Jeroncio
Director Técnico
MN 14840


Novartis Argentina S.A.
Vaccines, Biopharmaceuticals
Farm. y Alimentos
Cto. Av. de Regulaciones
Aprobada





Lot 116321
Page 43 of 51
Prot. 1026/11

Test for inactivation (Specification: Absence of live virus)

| | |
|--------------|-----------------------|
| Method | Hemagglutination |
| Date of test | January 17, 2011 |
| Result | Absence of live virus |


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

| | |
|--------------|------------------|
| Method | LAL test |
| Date of test | January 18, 2011 |
| Result | < 1 IU/60 mcg HA |

Haemagglutinin antigen content (Specification: Report result)

| | |
|--------------|------------------|
| Method | SRID |
| Date of test | January 17, 2011 |
| Result | 228 mcg HA/mL |


Novartis Argentina S.A.
Dr. Lucio Jeroncio
Director Técnico
MN 14840


Novartis Argentina S.A.
Vaccines and Biologics
Farm. Avda. C. Ruanoz
Ge. Asuntos Regulatorios
Aprobada





Lot 116321
Page 44 of 51
Prot. 1026/11

**SUMMARY PROTOCOL FOR PRODUCTION AND TESTING
OF INFLUENZA VACCINE (SUB - UNIT) WITH MF59C.1 ADJUVANT**

FINAL LOT 116321

Summary

| | Page |
|---------------------------------|------|
| - Final bulk vaccine lot 1163: | |
| Information on blending | 45 |
| Tests on final bulk vaccine | 47 |
| - Final lot 116321: | |
| Production details of final lot | 48 |
| Tests on final lot | 48 |


Novartis Argentina S.A.
Dr. Lucio Jeroncio
Director Técnico
MN 14840


Novartis Argentina S.A.
Vaccines and Immunology
Patricia Adriaen
Gte. Asesor Regulatorio
Apoderada





 **NOVARTIS**
VACCINES

Lot 116321
Page 46 of 51
Prot. 1026/11

Adjuvant

Nature
Lot(s)
Volume

Microfluidized emulsion 59 (MF59C.1)
10103 and 11104
160,000 mL

Buffer A solution

Nature
Volume

Buffered saline solution
20,070 mL

Buffer B solution

Nature
Volume

MgCl₂ and CaCl₂ in distilled water
410 mL

Diluent solution

Nature
Volume

Water for injection
22,290 mL

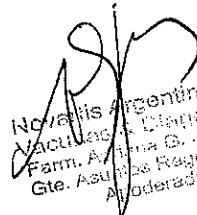
Final volume

320,000 mL

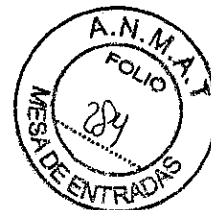
Storage conditions of final bulk vaccine

2 - 8°C


Novartis Argentina S.A.
Dr. Lucio Jeroncio
Director Técnico
MN 14840


Novartis Argentina S.A.
Vacunación Diploide
Farm. Av. J. B. Justo
Gte. Asesor Regulatorio
Aprobada





Lot 116321
Page 47 of 51
Prot. 1026/11

Tests on final bulk vaccine

Osmolarity (Specification: 240 – 360 mOsm/Kg)

| | |
|--------------|-------------------|
| Method | Eur. Ph. |
| Date of test | February 10, 2011 |
| Result | 306 mOsm/Kg |

Residual ovalbumin (Specification: ≤ 0.4 mcg/mL)

| | |
|--------------|-------------------|
| Method | ELISA |
| Date of test | February 11, 2011 |
| Result | 0.1 mcg/mL |

Sterility test (Specification: Sterile)


| | |
|---------------|--------------------------------------|
| Method | Eur. Ph., membrane filtration |
| Media | FTM and SCDM |
| Volume tested | 30 mL (<i>from each container</i>) |
| Date of test | Feb. 09 – Feb. 23, 2011 |
| Result | Sterile |

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

| | |
|--------------|-------------------|
| Method | LAL test |
| Date of test | February 15, 2011 |
| Result | < 1 IU/0.5 mL |

Note: Test for "Residual formaldehyde" has been performed on Monovalent Pooled Harvests.


Novartis Argentina S.A.
Dr. Lucio Jeronimo
Director Técnico
MN 14840


Novartis Argentina S.A.
Vaccines and Biologicals
Reg. Affairs and Regulatory
Gte. Asunción
Apoderada





Lot 116321
Page 48 of 51
Prot. 1026/11

FINAL LOT 116321

Production details of final lot

| | |
|-------------------------------------|--|
| Name and address of manufacturer | Novartis Vaccines and Diagnostics Srl Bellaria - Rosia, 53018 Sovicille - Siena (Italy) |
| Date of filling | February 11, 2011 |
| Filled volume | 0,545 mL |
| Type of container | Pre-filled syringe |
| No. of final containers | 134,742 |
| Expiry date | January 2012 |
| Storage conditions of final product | 2 - 8°C, do not freeze |

Tests on final lot


Haemagglutinin antigens content (Specification: LCL (§) \geq 12 mcg HA/0.5 mL for each strain)

| | |
|--------------|-------------------|
| Method | SRID |
| Date of test | February 16, 2011 |
| Result: | |

| Strain | mcg HA/0.5 mL | |
|------------|---------------|---------|
| | Mean | LCL (§) |
| NYMC X-181 | 16 | 15 |
| NYMC X-187 | 17 | 16 |
| NYMC BX-35 | 16 | 16 |

(§) - LCL = Lower Confidence Limit, P = 0,95


Novartis Argentina S.A.
Dr. Lucio Jeroncio
Director Técnico
MN 14840


Novartis Argentina S.A.
Vaccines and Diagnostics
S.A. Av. La G. J. J. J. J.
Cto. Av. Regulatorias
Apoderada



Lot 116321
Page 49 of 51
Prot. 1026/11

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

| | |
|--------------|--|
| Method | SRID |
| Date of test | February 16, 2011 |
| Result | Positive for A(H3N2), A(H1N1) and B strain |

pH (Specification: 6.9 - 7.7)

| | |
|--------------|-------------------|
| Method | Potentiometric |
| Date of test | February 21, 2011 |
| Result | 7.1 |

Appearance (Specification: Milky - white liquid)

| | |
|--------------|----------------------|
| Method | Visual examination |
| Date of test | February 21, 2011 |
| Result | Milky - white liquid |

Withdrawable content (Specification: ≥ 0.50 mL)

| | |
|--------------|-------------------|
| Method | Eur. Ph. |
| Date of test | February 16, 2011 |
| Result | 0.53 mL |

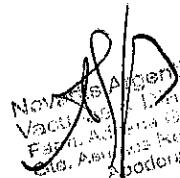
Identity of squalene (Specification: Positive)

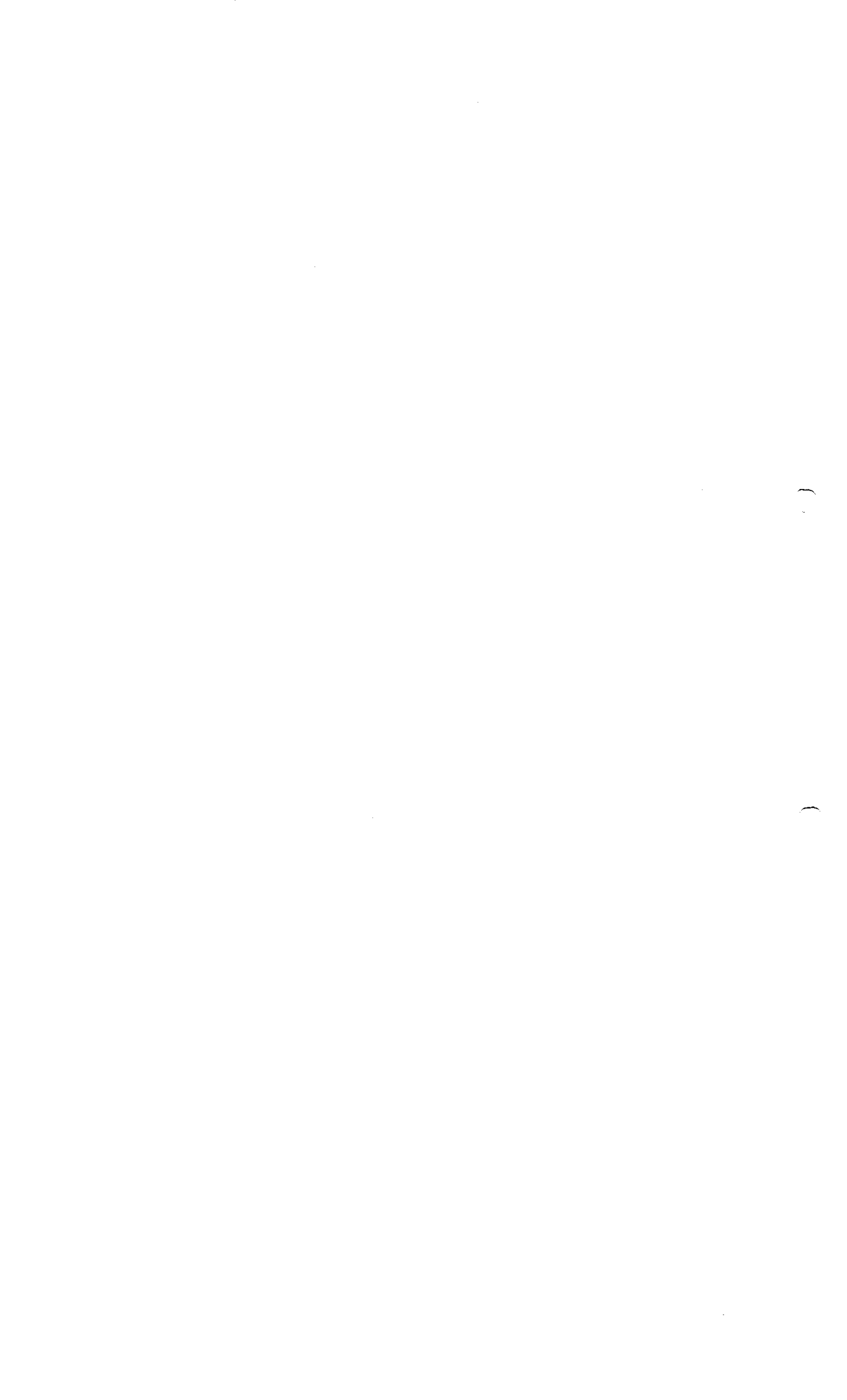
| | |
|--------------|----------------|
| Method | HPLC |
| Date of test | March 25, 2011 |
| Result | Positive |

Squalene content (Specification: 1.55 - 2.35 % w/w)

| | |
|--------------|----------------|
| Method | HPLC |
| Date of test | March 25, 2011 |
| Result | 1.78 % w/w |


Novartis Argentina S.A.
Dr. Lucio Jeroncio
Director Técnico
MN 14840


Novartis Argentina S.A.
Vaccines and Biologics
Fac. de Ciencias Exactas y Naturales
CIB. Avda. Corrientes 1247
Buenos Aires





Lot 116321
Page 50 of 51
Prot. 1026/11

Protein content less HA antigens (Specification: ≤ 120 mcg/0.5 mL)

| | |
|--------------|-------------------|
| Method | Micro BCA |
| Date of test | February 16, 2011 |
| Result | 28 mcg/0.5 mL |

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

| | |
|--------------|-------------------|
| Method | LAL test |
| Date of test | February 16, 2011 |
| Result | < 1 IU/0.5 mL |

Sterility test (Specification: Sterile)

| | |
|--------------------------|-------------------------------|
| Method | Eur. Ph., membrane filtration |
| Media | FTM and SCDM |
| No. of containers tested | 40 |
| Date of test | Feb. 15 - Mar. 01, 2011 |
| Result | Sterile |

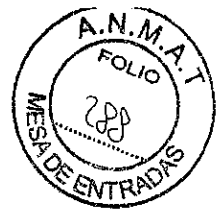
Emulsion particle size distribution (Specification: Particle ≥ 1.2 μ m: $\leq 1 \times 10^7$ /mL
Mean particle diameter: 130 - 180 nm)

| | |
|--------------|--|
| Method | Dynamic light scattering and Particle count |
| Date of test | February 16, 2011 |
| Result | Particles ≥ 1.2 μ m: 3.469310×10^6 /mL Mean particle diameter: 139 nm |


Novartis Argentina S.A.
Dr. Lucio Jeroncio
Director Técnico
MN 14840


Novartis Argentina S.A.
Vaccines Division
Calle Arce 1600, Almirante
Gra. Páramo, Montevideo
Apo. 11000





Lot 116321
Page 51 of 51
Prot. 1026/11

CERTIFICATION

I herewith certify that Final Lot No. 116321 of Influenza Vaccine (sub-unit) with MF59C.1 adjuvant was manufactured and tested according to the procedures approved by competent authorities and complies with the quality requirements.

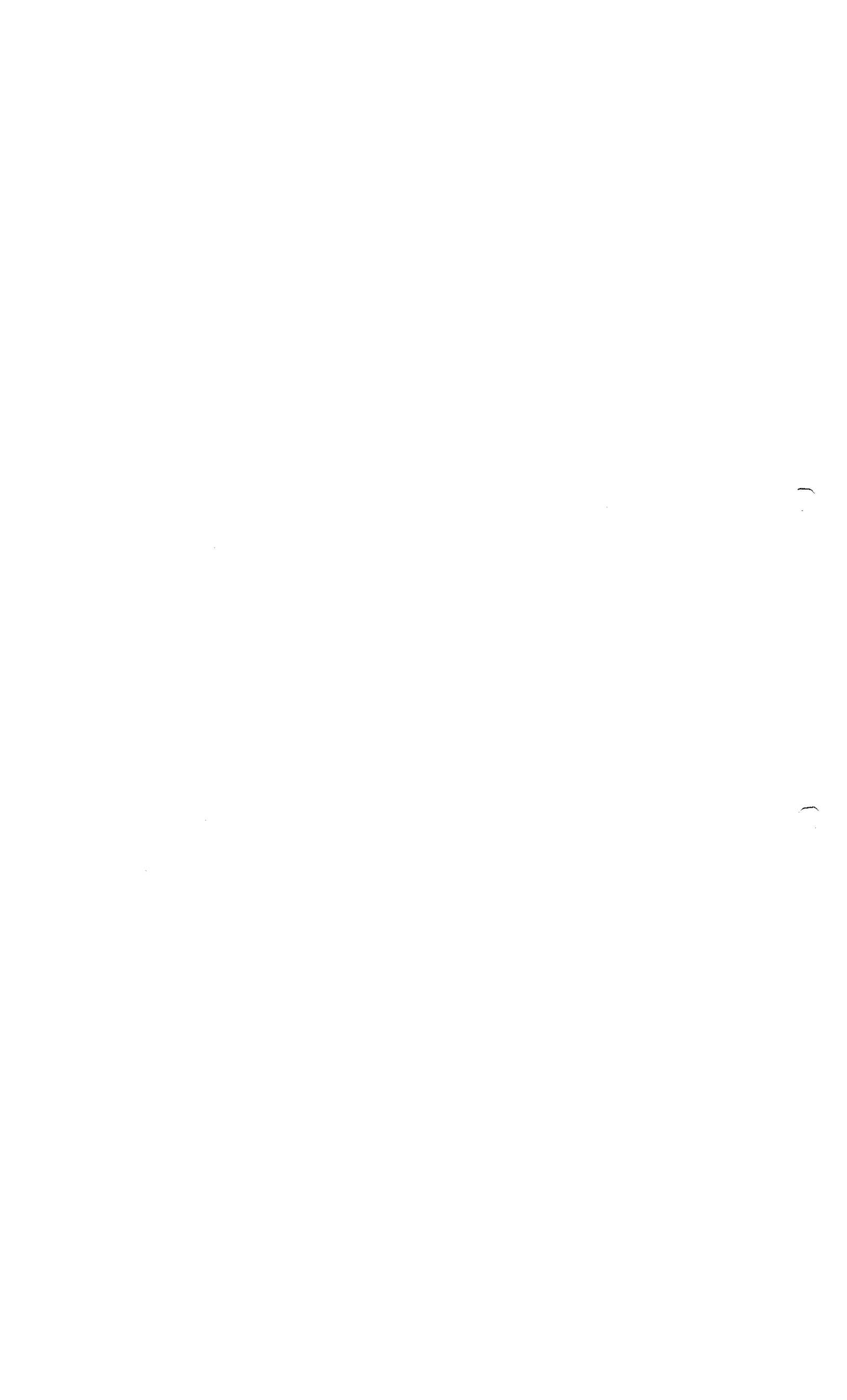
I also certify that no materials derived from ruminants (bovine, ovine, caprine), included within the scope of the current EMEA/CPMP "Note for Guidance on minimizing the risk of transmitting animal spongiform encephalopathy agents via medicinal products", were used in the manufacture and/or formulation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

Dr. Stefano Viti
Quality Assurance / Qualified Person

22 APR 11
Date

Novartis Argentina S.A.
Dr. Lucio Jeroncio
Director Técnico
MN 14840

Novartis Argentina S.A.
Vaccines & Biologicals
Farm. Adolfo C. Carreras
Gte. Asuntos Regulatorios
Apoderada





7.ARI. 2011 14:27

I.S.S. LAB. IMMUNOLOGIA

Nr.6809 P. 2/5



Istituto Superiore di Sanità
National Center for Immunobiologicals
Research and Evaluation

VIALE REGINA ELENA, 299
00161 ROMA
TELEGRAMMI: ISTISAN ROMA
TELEFONO 06 49901
TELEFAX: 06 49387118
<http://www.iss.it>

Certificate n° 101/11-V/WHO date of issue 07/04/2011

The following lot of Fluad vaccine filled in Pre-filled syringe produced by Novartis Vaccines and Diagnostics s.r.l., Sovicille Italy whose number appears on the labels of the final containers, meets all National Requirements and WHO Part A of Recommendations for the production and control of Influenza vaccine (inactivated), Annex III (TRS 927) and the Recommendation for good manufacturing practices and quality assurance for biological products.

| | | |
|------------|----------------------------|------------|
| LOT 116321 | Expiry date | 31/01/2012 |
| | N° of containers: | 134742 |
| | N° of doses per container: | 1 |

As a minimum, this certificate is based on an examination of the manufacturing protocol.

Carlo Pini
Dr. Carlo Pini
Head, National Center for Immunobiologicals
Research and Evaluation



Lucio Jeroncio
Novartis Argentina S.A.
Dr. Lucio Jeroncio
Director Técnico
MN 14840

[Signature]
Novartis Argentina S.A.
Vaccinas e Produtos
Farm. Arg. - Control
Gto. Asuncion - Regulatorias
Apodurada



INFORMACION PRECLINICA

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

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

1 Resumen preclínico

Fluxvir es una vacuna trivalente contra la influenza, de antígeno de superficie, inactivada. Es una suspensión para inyección estéril, en una jeringa prellenada de 0,5 ml. Una dosis única de 0,5 ml de Fluad está indicada para la inmunización activa contra la influenza en personas de 65 años de edad y mayores.

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

Una dosis individual de Fluxvir contiene 15 µg de antígeno hemaglutinina de cada una de las tres cepas de virus de la influenza, para un total de 45 µg de antígeno HA por dosis y 0.25 ml de MF59C.1.

La composición de la vacuna se muestra en la tabla a continuación.


Tabla 1 Composición de FLuxvir (por dosis de 0,5 ml)

| Componentes de la Vacuna | Cantidad | Propósito |
|---|--------------|--------------------------|
| Antígenos hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) | | |
| A (H1N1) | ≥ 15 µg * | Principio activo |
| A (H3N2) | ≥ 15 µg * | Principio activo |
| B | ≥ 15 µg * | Principio activo |
| Cloruro de sodio | 4,00 mg | auxiliar de isotonicidad |
| Cloruro de potasio | 0,10 mg | buffer |
| Fosfato diácido de potasio | 0,10 mg | buffer |
| Fosfato disódico dihidratado | 0,66 mg | buffer |
| Cloruro de magnesio hexahidratado | 0,05 mg | estabilizador |
| Cloruro de calcio dihidratado | 0,06 mg | estabilizador |
| Escualeno ** | 9,75 mg | Adyuvante |
| Polisorbato 80** | 1,175 mg | Adyuvante |
| Citrato de sodio** | 0,66 mg | Adyuvante |
| Ácido cítrico** | 0,04 mg | Adyuvante |
| Agua para inyección | hasta 0,5 ml | diluyente |

*Se incluye un excedente de hasta el 15% de la concentración de HA para cada cepa del virus

**Composición del adyuvante MF59C.1


Novartis Argentina S.A.
 Dr. Lucio Jerónimo
 Director Técnico
 MN 14840


Novartis Argentina S.A.
 Vicedirector Médico
 Farm. Adm. y Regulaciones
 Cel. Andrés Regulatorias
 Apoderada

2.4.1 Descripción de la estrategia de ensayos preclínicos

El programa de toxicología se diseñó sobre la base de los requerimientos regulatorios globales apropiados para la investigación preclínica de vacunas y adyuvantes:

- CPMP/SWP/465/95: Nota de orientación sobre investigación farmacológica y toxicológica preclínica de vacunas
- Informe técnico No. 927, 2005 de la OMS: Pautas de la OMS sobre evaluación preclínica de vacunas
- EMEA/CHMP/VEG/134716/2004: Pauta sobre adyuvantes de vacunas para uso humano

En cumplimiento de las diversas pautas aplicables, los estudios preclínicos que se realizaron con Fluad incluyen la investigación de liberación in vivo, los estudios de inmunogenicidad/desafío (ratones), la investigación de toxicidad por dosis repetidas (conejos) y la investigación de sensibilización (cobayos) requeridas. Además, se completaron los estudios preclínicos efectuados para caracterizar el adyuvante MF59.

A continuación, se ilustran las relaciones entre Fluad, vacunas antigripales relacionadas y MF59.

Tabla 2 Vacunas antigripales y formulaciones de MF59

| Nombre del producto | Composición |
|---------------------|--|
| Fluad | Agrippal + MF59C.1 |
| Agrippal | Vacuna antigripal trivalente, antígeno de superficie, inactivada (estacional, no adyuvantada) |
| Agriflu | Agrippal |
| Aflunov | Vacuna antigripal H5N1 monovalente, antígeno de superficie, inactivada, adyuvantada con MF59C.1 (antígeno fabricado utilizando el proceso para Fluad/Agrippal) |
| MF59C.1 | Escualeno, polisorbato 80, trioleato de sorbitán, ácido cítrico, citrato de sodio monohidratado, en agua |
| MF59W.1 | Escualeno, polisorbato 80, trioleato de sorbitán, en agua |
| MF59-0 | MF59W.1 |

Durante el desarrollo preclínico de Fluad, se investigaron diversas formulaciones del adyuvante, incluida una formulación basada en agua (denominada MF59 [agua], MF59W.1 o MF59-0). Más adelante, esta formulación se optimizó por el agregado de amortiguador citrato para lograr mayor estabilidad (MF59C.1). Los resultados con ambas formulaciones son relevantes, porque el amortiguador citrato no afecta la inmunogenicidad ni la seguridad.

El trabajo para dilucidar el mecanismo de acción de MF59 se describe en varias publicaciones (Mosca, 2008; O'Hagan, 2007; Seubert, 2008). Este trabajo en curso sugiere que MF59 induce un medio local dentro del músculo que promueve la inducción de potentes respuestas inmunitarias a vacunas coadministradas. Una publicación reciente (Khurana, 2010) demuestra que el adyuvante MF59 mejora la respuesta inmunitaria a una vacuna contra H5N1 al inducir expansión cualitativa y cuantitativa de los repertorios de anticuerpos con potencial protector.

El efecto farmacológico deseado de las vacunas antigripales consiste en el inducción de anticuerpos contra antígenos del virus de la gripe y protección contra la infección. Las respuestas de anticuerpos,

Novartis Argentina S.A.
Dr. Luis Jeroncia
Director Técnico
MN 14549

Novartis Argentina S.A.
Vladimir...
Farm. An...
Cta. Asunta Regulatorias
Aprobada



principalmente títulos de inhibición de la hemaglutinación (IH), se han correlacionado con protección en seres humanos. La inducción de la respuesta inmunitaria humoral en ratones fue el foco de muchos de los estudios farmacológicos primarios no GLP con Fluad. Estos estudios, practicados por vía subcutánea o intramuscular, demostraron que la inmunización de ratones con vacunas antigripales, solas (Agridpal, denominada también Agriflu) o en combinación con adyuvante MF59 (agua) (equivalente a Fluad), indujeron una respuesta de anticuerpos específica contra los antígenos, aun en ratones seropositivos. Otro efecto asociado con la vacunación fue la proliferación de linfocitos derivados del bazo.

Se estudió la eficacia preclínica en ratones que recibieron vacunas antigripales antes del desafío con virus de la gripe. Se demostró reducción de la carga viral pulmonar después del desafío con virus de la gripe estacional y, más importante aún, la protección contra el desafío con dosis letales del virus de la gripe en ratones controlados hasta 200 días posvacunación. En todos los casos, la presencia de adyuvante MF59 aumentó significativamente la respuesta inmunitaria, tanto en ratones jóvenes como mayores (Higgins, 1996).

La inmunogenicidad se evaluó en conejos durante los estudios de toxicología GLP de dosis repetidas. En estos estudios, los animales recibieron dos o tres dosis de Fluad administradas por vía intramuscular con dos semanas de intervalo. Fluad fue bien tolerada e inmunógena.

Los estudios practicados con la vacuna H5N1 monovalente Aflunov también aportan información relevante. Aflunov y Fluad contienen la misma cantidad de MF59, y los antígenos de ambas vacunas son fabricados con el mismo proceso. Se demostró la inmunogenicidad de Aflunov en ratones, conejas nulíparas y después preñadas, y hurones. Aflunov protegió a ratones y hurones contra un desafío letal con virus altamente patógenos homólogos y heterólogos a la cepa de la vacuna. Se demostró reactividad cruzada serológica por análisis de IH y microneutralización. En las siguientes secciones, se resumen sucintamente los estudios con Aflunov, y se puede acceder a los informes si se los solicita.

El programa de estudios que avalan a Fluxvir/Fluad cumple con las pautas vigentes para la evaluación preclínica de vacunas y adyuvantes. Como Fluxvir/Fluad es una vacuna, no se requieren o no son apropiados muchos de los estudios estándares requeridos para otros tipos de productos farmacéuticos biológicos o de moléculas pequeñas. No se justifican estudios farmacológicos secundarios, de seguridad farmacológica, farmacocinéticos (absorción, distribución, metabolismo o excreción) o toxicocinéticos. Sin embargo, hay información pertinente sobre el adyuvante MF59 que aporta datos farmacológicos secundarios o de seguridad de aval para Fluxvir/Fluad. Durante el desarrollo inicial del adyuvante MF59, se efectuaron dos estudios de dosis repetidas en perros para evaluar la toxicidad de las formulaciones de la vacuna con antígenos que no están relacionados con este dossier. Ambos estudios tenían un grupo de MF59 y un grupo control de solución salina/amortiguador, e incluyeron la evaluación de parámetros cardiovasculares y neurológicos. No se detectó ninguna anomalía en ninguno de los sistemas orgánicos en uno u otro estudio.

El programa de toxicología se diseñó sobre la base de los requerimientos regulatorios globales apropiados. Se evaluó Fluad en estudios GLP de dosis repetidas en conejos, y se investigó el


Novartis Argentina S.A.
Dr. Lucio Jeroncio
Director Técnico
MN 14840


Novartis Argentina S.A.
Patricia...
Cta. Buenos Aires
Argentina



potencial de hipersensibilidad por contacto retardada en un estudio GLP en cobayo (Prueba de Maximización de Magnusson-Kligman). Fluxvir/Fluad fue bien tolerada, tanto local- como sistémicamente, en estudios que evaluaron la tolerabilidad local, la toxicidad por dosis repetidas, y la recuperación o las respuestas diferidas en conejos. Fluxvir/Fluad no fue un sensibilizante cutáneo cuando se lo investigó en cobayos. No se efectuaron estudios de genotoxicidad ni carcinogenicidad con Fluad.

No se realizaron estudios de toxicidad reproductiva ni para el desarrollo con Fluxvir/Fluad porque, en la actualidad, Fluxvir/Fluad se indica en adultos de 65 y mayores. Un estudio de aval demostró que Aflunov no afectaba los parámetros maternos, embriofetales ni de desarrollo. Asimismo, se generaron datos pertinentes con adyuvante MF59. Se efectuaron estudios de toxicidad embriofetal y perinatal con MF59, porque se lo desarrolló como adyuvante para ser usado con diversos antígenos. MF59 no fue tóxico para la madre, no fue un tóxico embriofetal ni del desarrollo en ratas ni fue embrio/fetotóxico en conejos, cuando se lo investigó en dosis que superan las usadas en seres humanos.

El adyuvante MF59 solo se caracterizó con respecto a la toxicidad local y sistémica, no fue genotóxico (prueba de Ames) ni clastogénico (pruebas de micronúcleos en ratones) y no indujo sensibilización en cobayos.

El programa preclínico de Fluad caracterizó la inmunogenicidad, eficacia (estudios de desafío), reactogenicidad local y toxicidad sistémica. En el estudio GLP definitivo de toxicología en conejos, se utilizaron la dosis clínica de Fluad (45 µg en 0,5 ml) y la vía de administración clínica (intramuscular). Se evaluó la seguridad de 3 dosis (separadas por 14 días); este esquema supera (por dos) la cantidad de dosis empleadas clínicamente. Sobre la base del peso corporal, cada dosis de Fluad administrada a conejos es equivalente a alrededor de 20 veces la dosis administrada a adultos humanos (usando 60 kg para el hombre y 3 kg para el conejo). El programa GLP de toxicología completo llevado a cabo con el adyuvante MF59 también avala la seguridad de Fluad, y estudios con Aflunov (desafío en hurones y toxicidad reproductiva en conejos) aportan información adicional.

En resumen, se evaluaron la inmunogenicidad, la eficacia, la toxicidad y la tolerabilidad preclínicas de Fluxvir/Fluad. Los datos preclínicos, en conjunto con los datos clínicos, avalan la seguridad e inmunogenicidad de Fluxvir/Fluad en adultos de 65 años de edad y mayores.

2.4.2 Farmacología

Respuestas de anticuerpos con vacunas antigripales en ratones jóvenes y mayores

En este estudio (Estudio No. 94-0184), se inmunizó dos veces a grupos de 9 ratones jóvenes (3 meses de edad) y mayores (18 meses de edad) con vacuna (que contenía 9 µg de HA total de 3 cepas de virus de la gripe, A/Beijing (X-117)/32/92, A/Texas (X-113)/36/91 y B/Panama 45/90, en un volumen de 200 µl). La vacuna se administró por vía subcutánea, sola o en combinación con adyuvante MF59 (formulación en agua). Los animales de control fueron tratados con PBS. Se dosaron los títulos de anticuerpos específicos contra los antígenos después de la segunda inmunización.


Novartis Argentina S.A.
Dr. Lucio Seroncio
Director Técnico
MN 14840


Novartis Argentina S.A.
Vend. P.A. S. 1000000000
Pan. P.A. S. 1000000000
Cib. Asunto. Regulaciones
Apoderada



La siguiente información no se presenta en el informe del estudio: raza y sexo de los ratones usados, composición exacta de la vacuna y el adyuvante MF59 (agua) usados, la relación adyuvante:vacuna usada en la combinación, el cronograma de las dos inyecciones, el momento del muestreo de sangre y el método empleado para analizar los títulos de anticuerpos.

Sin embargo, los resultados indican que la vacunación con Agriflu indujeron una respuesta de anticuerpos específica contra los antígenos en los ratones tanto jóvenes como mayores. La respuesta de los ratones jóvenes fue de 21 a 72 veces más alta que en los ratones mayores, lo que dependía del antígeno. El agregado de adyuvante MF59 (agua) a la vacuna potenció de 12 a 31 veces la respuesta de los ratones jóvenes y de 19 a 253 veces, la de los ratones mayores, según el antígeno. No hubo respuesta de anticuerpos en los animales de control tratados con PBS.

Respuesta linfoproliferativa con virus de la gripe en ratones jóvenes y mayores

En una continuación del estudio previo (Estudio No. 94-0184), dos semanas después de la segunda vacunación subcutánea, se practicó eutanasia de todos los animales, se resecaron los bazo, y se prepararon y cultivaron in vitro suspensiones de células aisladas. Durante 6 días, se estimularon con virus de la gripe (cepa no especificada) células de todos los grupos. Las muestras de células control de todos los grupos también se trataron con ovoalbúmina durante 6 días o con PHA durante 3 días. Luego, se evaluó la proliferación celular midiendo la incorporación de timidina radiomarcada, que se agregó a los pocillos durante 24 horas. Se calculó el Índice de Estimulación como el cociente de los recuentos medios por minuto, por pocillo en presencia y ausencia del estímulo por virus de la gripe.

Los ratones ancianos tuvieron una respuesta linfoproliferativa a Agriflu no adyuvantada 3 veces más baja que los ratones jóvenes, y una respuesta 2 veces más baja a Agriflu administrada con MF59 (agua; $p < 0,26$) que los ratones jóvenes. El adyuvante aumentó la respuesta linfoproliferativa en ratones jóvenes en 1,85 veces, en promedio, y la triplicó, en promedio (lo que alcanzó significación estadística), en los ratones mayores. Los valores P para A/Beijing, A/Texas and B/Panama fueron de 0,0596; 0,0351; y 0,0215, respectivamente.

Respuesta de anticuerpos en ratones jóvenes y mayores seropositivos

La gripe es una enfermedad generalizada, y por consiguiente, las poblaciones humanas se tornan seropositivas a una edad temprana. Por lo tanto, en este estudio (Estudio No. 93-847), se investigó la respuesta de anticuerpos a Agriflu (con y sin adyuvante MF59 agua) en ratones seropositivos previamente infectados por virus de la gripe.

Se infectó por vía intranasal a grupos de 10 ratones jóvenes y mayores (de raza y edad no especificadas) con una cepa de virus de la gripe adaptada a ratón (A/Taiwan/1/86), y se permitió que se recuperaran durante 10 semanas. Después, se los inmunizó una vez con vacuna Agriflu (que contenía 9 μg de HA total de 3 cepas de virus de la gripe A/Beijing 353/89, A/Taiwan 1/86 y B/Panama 45/90, en un volumen de 200 μl). La vacuna se administró por vía subcutánea, sola o en combinación con adyuvante MF59 (agua). Se trató un grupo control con PBS. Se extrajeron muestras de sangre el

Novartis Argentina S.A.
Dr. Lucio Jeroncio
Director Técnico
MN 14840

Novartis Argentina S.A.
Vladimir C. Jeroncio
Ph.D., M.D., M.Sc., M.P.H.
Cta. Pública Regulatoria
Apodotecario

día previo a la inmunización y 2 semanas después de ésta, y se analizaron los sueros mediante ELISA para investigar anticuerpos contra los 3 antígenos del virus de la gripe.

Los títulos séricos prevacunación (posinfección) contra A/Taiwan en animales jóvenes fueron alrededor de seis veces más altos que los observados en ratones mayores. Ni los animales jóvenes ni los mayores previamente infectados presentaban títulos de reacción cruzada contra A/Beijing o B/Panama antes de la inmunización.

La vacunación con Agriflu potenció los títulos de anticuerpos contra A/Taiwan en ratones seropositivos tanto jóvenes como mayores (en 5 y 3 veces, respectivamente) y generó títulos de anticuerpos contra A/Beijing y B/Panama. Los ratones jóvenes presentaron una respuesta inmunógena significativamente mayor contra los tres antígenos que los ratones mayores.

El agregado de MF59 (agua) a la vacuna no ejerció ningún efecto sobre las respuestas a los tres antígenos en ratones jóvenes, pero aumentó significativamente ($P = 0,0287$) la respuesta en ratones mayores, en 2,5-7 veces según el antígeno.

Respuestas de anticuerpos a diversas dosis de vacuna antigripal en ratones

En este estudio (Nos. 94-0307, 94-0214 y 94-0215), se vacunó a grupos de 15 ratones Balb/C de ocho semanas de edad el día 0 y el día 28 con distintas dosis de Agriflu (denominada 'Biocine Influenza Vaccine' en el informe del estudio) que contenían antígeno HA de cada una de las siguientes cepas de virus de la gripe: A/Texas 36/91 (X-113), A/Beijing 32/32 (X-117) y B/Panama 18-19/93A). Todas las dosis de antígeno se administraron por vía intramuscular en un volumen de 0,025 ml mezclado con 0,025 ml de PBS o adyuvante MF59 (agua). Las dosis de antígeno variaron de 0,4 a 0,002 μg de HA, cuando se administraron con PBS, y de 0,04 a 0,0002 μg de HA, cuando se administraron con MF59 (agua). Los días 42, 98 y 182, se extrajeron muestras de sangre, y se analizaron los sueros por ELISA para investigar anticuerpos contra cada antígeno. Este estudio no incluyó ningún grupo control.


En el caso de los tres antígenos, las respuestas de anticuerpos aumentaron con la dosis de antígenos administrada, y el efecto se mantuvo hasta el día 182. Para los tres antígenos, fue evidente un límite de 0,0006 μg de HA; la vacunación con dosis inferiores a ésta no indujeron una respuesta inmunitaria. Por lo general, la presencia de MF59 (agua) en la vacuna aumentó las respuestas de anticuerpos en 20-300 veces según el antígeno.

Como se muestra en los experimentos anteriores, el aumento de la respuesta de anticuerpos es más evidente en ratones mayores; sin embargo, también se observa un intenso efecto adyuvante de MF59 en animales jóvenes.

El estudio No. MF-1/MF-2 2003/04 evaluó la dosis-respuesta cuando se combinaron diversas cantidades de vacuna antigripal trivalente de subunidades con cantidades fijas de MF59C.1 (relación 1:1 volumen-volumen), con mantenimiento del volumen de inyección constante. Asimismo, el estudio evaluó la capacidad de MF59 de aumentar la respuesta de anticuerpos, medidos por ELISA y análisis



Novartis Argentina S.A.
Dr. Lucio Jeroncia
Director Técnico
MN 14840



Novartis Argentina S.A.
Vendedor de Farmacéutico
Farm. Domingo E. Jimenez
Cta. Asunt. Regulatoria
Aporada



de inhibición de la hemaglutinación (IH), en ratones BALB/c adultos jóvenes (8 semanas de edad) y mayores (18 meses de edad).

Se inmunizó por vía subcutánea a ratones jóvenes y mayores (10 por grupo) con una vacuna antigripal trivalente de subunidades que contenían los siguientes antígenos: A/New Caledonia/20/99 (H1N1), A/Panama/2007/99 (H3N2) y B/Shandong/7/97 (B), solos o combinados con MF59. Se investigaron las siguientes dosis de vacuna: 0,4; 0,13; 0,04; 0,01; 0,003; y 0,001 μ g. Cada ratón fue vacunado los días 1 y 21, y se le extrajo sangre el día 35. Se determinaron los títulos de anticuerpos específicos contra los antígenos por ELISA y por IH (no se practicó IH contra H1N1 debido a sueros insuficientes).

MF59 aumentó los títulos de anticuerpos específicos contra HA de H1N1, H3N2 y B en ratones tanto jóvenes como mayores. Más específicamente, el agregado de MF59 a la formulación de la vacuna permitió reducir en 100 veces (o más) la cantidad de antígeno HA, pero los títulos de anticuerpos fueron similares a los inducidos por vacuna no adyuvantada. En ratones mayores, la respuesta de anticuerpos inducida por vacuna no adyuvantada fue extremadamente escasa, a menudo sólo detectable con la dosis máxima de vacuna investigada (0,13 μ g). MF59 aumentó la respuesta de anticuerpos con dosis de antígeno que eran alrededor de 100 veces más bajas.

El aumento de la respuesta de anticuerpos por MF59 respecto de la vacuna no adyuvantada también fue evidente en los análisis de IH para la cepa H3N2 y para la cepa B.

Estos datos confirman resultados de inmunogenicidad previos en ratones. Además, la inmunogenicidad aumentada por MF59 se asoció con eficacia protectora en ratones (véase más adelante). La inclusión de MF59 determinó protección completa de los ratones contra un desafío letal y redujo la cantidad de antígeno requerida.

Carga viral relativa posdesafío en pulmones de ratones vacunados


En una continuación del trabajo descrito antes (Estudios Nos. 94-0307, 94-0214 y 94-0215), se desafió a los mismos ratones por vía intranasal con el quintuple de la DL_{50} de la cepa de virus de la gripe A/Taiwan/86 el día 56 o con 9 veces la DL_{50} de la misma cepa los días 126 ó 200. Se practicó eutanasia a cinco ratones por grupo de 3 a 5 días después de cada desafío, y se analizaron preparados de lisado pulmonar de estos animales para determinar títulos virales relativos mediante un análisis in vitro.

Se desafió de manera similar a grupos control de 2 ó 3 ratones sin tratamiento previo (naïve) los días 56, 126 y 200, y se evaluaron las cargas virales pulmonares.

La vacunación previa con Agriflu (denominada 'Biocine Influenza vaccine' en el informe del estudio) causó una disminución dosis-dependiente de la carga viral presente en los pulmones de los animales desafiados con virus de la gripe (cepa A/Taiwan/86) 56, 186 y 200 días más tarde.

La vacunación con una dosis de antígeno no adyuvantado de 13 μ g o más alta determinó títulos antivirales pulmonares medios inferiores a 50, mientras que cuando se administraron con adyuvante MF59 (agua), dosis de antígeno de 0,005 μ g dieron títulos antivirales pulmonares medios inferiores a


Novartis Argentina S.A.
Dr. Lucio Jeronice
Director Técnico
MN 14840


Novartis Argentina S.A.
Vaccines and Biologics
Paraná, Argentina
Gto. Administración Apodaca

50. Así, la presencia del adyuvante redujo la cantidad de antígeno requerido para inducir una reducción similar de la carga viral pulmonar de 26 veces.

Eficacia protectora de las vacunas antigripales en ratones

En una continuación adicional del trabajo descrito antes (Estudios Nos. 94-0307, 94-0214 y 94-0215), se controló la supervivencia de 10 ratones por grupo durante 14 días después del desafío con virus de la gripe los días 56, 126 ó 200. El estudio también incluyó grupos de control de 10 ratones no vacunados (naïve).

La protección contra el desafío fue dosis-dependiente, aumentó con la dosis de antígeno, y el efecto se mantuvo hasta el día 200. La inmunización con vacuna más adyuvante MF59 (agua) mejoró la supervivencia y permitió una protección del 100% con dosis de antígeno de 65 a 80 veces más bajas que las de la vacuna no adyuvantada. Los ratones control (naïve) no mostraron protección los días 56 y 200; en cambio, se observó una protección del 20% el día 126. Esto puede haber sido un artefacto del estudio o el resultado de inmunidad adquirida naturalmente.

Inmunogenicidad en conejos

Se evaluó la inmunogenicidad de Fluad durante tres estudios GLP de toxicología en conejos. Grupos de 8 animales/sexo por grupo recibieron 2 ó 3 administraciones intramusculares de Fluad con 2 semanas de intervalo. Se recolectaron muestras para análisis antes de la iniciación de la dosificación, durante la vida y en la necropsia. Se analizaron los sueros no GLP mediante un análisis de IH estándar. En las muestras de cada estudio, se investigaron anticuerpos contra por lo menos una de las tres cepas contenidas en la vacuna trivalente Fluad para confirmar la inmunogenicidad. En los tres estudios, Fluad indujo anticuerpos específicos contra los antígenos después de una sola dosis.

Datos de aval con Aflunov

Estudios preclínicos realizados para evaluar la inmunogenicidad y eficacia de Aflunov aportan aval adicional para Fluad. El proceso de fabricación de antígenos es el mismo para Aflunov y Fluad, y ambas vacunas contienen la misma cantidad de adyuvante MF59. Aflunov es monovalente (H5N1), y las dosis investigadas en contexto preclínico varían de 0,2 a 15 µg de HA por dosis. A continuación, se resume el programa de Aflunov.


Novartis Argentina S.A.
Dr. Ludio Jeronola
Director Técnico
MN 14840

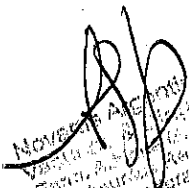

Novartis Argentina S.A.
Vista de los Estudios
Farm. de los Antígenos
Gub. Asunción, Paraguay
Apoderado

Tabla 3 Estudios de aval de inmunogenicidad y/o desafío

| Número de estudio | Tipo de estudio | Especie | Vacuna |
|-------------------|--|---------|---------------------------------------|
| NIH Mouse Study | Desafío con virus silvestre homólogo y heterólogo | Ratón | Aflunov (Vietnam) |
| UBA00021 | Datos de inmunogenicidad de toxicidad reproductiva y para el desarrollo (GLP) | Conejo | Aflunov (Vietnam) |
| 780-N007104 | Desafío ~4 meses posvacunación con virus de tipo silvestre homólogo y heterólogo a la cepa vacunal | Hurón | Aflunov (Vietnam) Aflunov (Turkey) |
| 765-N106857 | Desafío con virus de tipo silvestre homólogo y heterólogo a la cepa vacunal | Hurón | Aflunov (Vietnam) Aflunov (Turkey) |
| 673-N106850 | Desafío con virus homólogo de tipo silvestre | Hurón | Aflunov (Vietnam) |
| CBI-PCS-008 | Desafío con virus homólogo de genética inversa (GLP) | Hurón | Aflunov (Vietnam) |

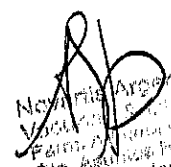
Estudios con formulaciones de Aflunov mostraron que las vacunas antigripales monovalentes adyuvantadas con MF59 que contenían antígeno fabricado con el proceso para Fludad son inmunógenas (ratones, conejos y hurones) y protectoras (ratones y hurones) contra el desafío con virus homólogo o heterólogo a la cepa vacunal.

2.4.3 Farmacocinética

No se realizaron estudios clásicos de absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME) con Fludad porque estos estudios no son relevantes para las vacunas.

Se investigó la distribución de MF59 tras la inyección intramuscular a ratones (Dupuis, 1999). El objetivo del estudio fue determinar la distribución de MF59 inyectado con antígeno soluble gD2 del virus de herpes simple tipo 2 (HSV) y comparar su distribución cuando se lo inyectaba con o sin MF59. A las 4 horas, el 36% de la dosis inyectada de MF59 marcado se encontraba en el músculo cuádriceps, y alrededor del 50%, en la grasa inguinal alrededor del músculo. A las 42 horas posinyección, se detectó la mitad de la cantidad inicial de MF59 marcado en el músculo. La cantidad de MF59 marcado en los ganglios linfáticos de drenaje fue máxima 2 días después de la inyección, lo que representó $0,1 \pm 0,3\%$ de la dosis inyectada. A las 4 horas, se observó el 12% de la dosis inyectada de gD2 marcado en el músculo. La presencia de MF59 no modificó significativamente la distribución de gD2. Los resultados indican que MF59 y gD2 se distribuyen y depuran de manera independiente después de la inyección intramuscular.


Novartis Argentina S.A.
 Dr. Lucio Jeroncio
 Director Técnico
 MN 14846


 Novartis Argentina S.A.
 Votación Sanjurjo
 Farm. Análisis de Control
 Cto. Asesoría Hospitalaria
 Apoderada

Estudios de depuración en conejos que recibieron inyecciones intramusculares de MF59 marcado con ¹²⁵I-escualeno demostraron que el adyuvante se depura con rapidez (Ott, 1995). Sólo el 10% del escualeno administrado permanecía en el sitio de inyección a las 6 horas posinyección y disminuyó al 5% a las 120 horas después de la inyección.

2.4.4 Toxicología

El programa de toxicología con Flud consiste en estudios GLP en cobayos y conejos. Se evaluó la hipersensibilidad por contacto retardada en cobayos, y se completaron cuatro estudios de toxicidad por dosis repetidas con Flud. A continuación, se presenta el programa de toxicología de Flud.

Tabla 4 Programa de toxicología con Flud

| Tipo, duración y número de estudio | Vía de administración | Especie | Compuesto administrado |
|--|-----------------------|---------|------------------------|
| Estudio GLP No. 564110 de hipersensibilidad por contacto retardada | Intradérmica y tópica | Cobayo | Flud |
| Estudios no fundamentales de dosis repetidas | | | |
| GLP Estudio GLP No. 486688 de (2) dosis repetidas | Intramuscular | Conejo | Flud |
| Estudio GLP No. 6560-106 de (2) dosis repetidas | Intramuscular | Conejo | Flud |
| Estudios fundamentales de dosis repetidas | | | |
| Estudio GLP No. 940292 de (2) dosis repetidas | Intramuscular | Conejo | Equivalente de Flud |
| Estudio GLP No. 488182 de (3) dosis repetidas | Intramuscular | Conejo | Flud |

Se investigó el potencial de hipersensibilidad por contacto retardada de Flud utilizando la Prueba de Maximización de Magnusson-Kligman (Estudio No. 564110). En este estudio, se usaron cobayos hembra Dunkin-Hartley (10/grupo). Sobre la base del hallazgo de rango, se administró Flud sin dilución. Este estudio mostró que Flud no fue un sensibilizador cutáneo en cobayo.

En todos los estudios de toxicidad por dosis repetidas, se realizaron evaluaciones completas de toxicidad local y sistémica, y se incluyó un período de recuperación para evaluar los efectos diferidos y la reversibilidad. En tres de los cuatro estudios, se evaluó la inmunogenicidad mediante análisis de IH. Dos de los cuatro estudios se designan no fundamentales, porque su propósito fue evaluar los efectos de la adición de los adyuvantes CpG y IC31® a Flud. Cada uno de estos estudios evaluó sólo dos grupos, Flud y Flud en combinación con CpG (Estudio No. 6560-106) o IC31® (Estudio No. 486688). Aunque no hubo ningún grupo control con solución salina (o equivalente), estos estudios aportan datos

Novartis Argentina S.A.
 Dr. Luis Jeronimo
 Director Técnico
 MN 14840

Novartis Argentina S.A.
 Vaccines and Biologics
 Farm. Argentina S.A. - Tucumán
 Cta. Asist. Soc. Reg. Sanitario
 Autorizada



adicionales sobre la toxicidad local y sistémica de Fluad. En ambos estudios, Fluad fue inmunógena y bien tolerada, y los resultados fueron compatibles con el perfil de seguridad establecido.

En los dos estudios fundamentales de toxicología por dosis repetidas, se compararon diversas formulaciones de Fluad con un grupo control de solución salina. En el estudio No. 940292, los animales recibieron dos dosis intramusculares de antígeno del virus de la gripe adyuvantado con MF59 con dos semanas de intervalo. Este estudio se llevó a cabo con una formulación equivalente a Fluad (Agrippal + MF59). En el estudio No. 488182, los conejos recibieron tres inyecciones intramusculares de Fluad, una formulación similar a Fluad que contenía 15 µg adicionales de antígeno HA de la cepa B o una formulación similar a Fluad que contenía 15 µg adicionales de antígeno HA de la cepa H3N2, así como el adyuvante nuevo, IC31®. En ambos estudios, las formulaciones vacunales fueron bien toleradas local- y sistémicamente. A continuación, se presentan resúmenes de los estudios.

Estudios fundamentales de toxicidad por dosis repetidas de Fluad

Estudio de toxicidad subaguda a 30 días en conejos por vía intramuscular

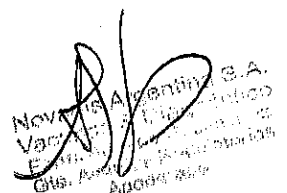
Este estudio se llevó a cabo de acuerdo con las GLP de la OECD (Estudio No. 940292). Se estudiaron la toxicidad sistémica y la tolerabilidad local de dos dosis intramusculares de vacuna en conejos Nueva Zelanda Blanco de uno y otro sexo. Los grupos de tratamiento fueron vacuna antigripal no adyuvantada (Agrippal/Agriflu) y Agrippal + MF59W.1 (equivalente a Fluad). El grupo de control recibió adyuvante MF59W.1 solo (equivalente a MF59C.1 pero sin amortiguador citrato).

Grupos de 6 conejos por sexo recibieron dos inyecciones intramusculares de 0,5 ml con 14 días de intervalo en patas traseras alternas. Cada inyección de 0,5 ml contenía la dosis clínica de vacuna trivalente (15 µg de HA de cada una de las cepas H1N1, H3N2 y B del virus). Sobre la base de peso corporal, cada dosis es equivalente a alrededor de 15 veces la dosis administrada a adultos humanos (utilizando 60 kg para hombres y 4 kg para conejos).

Se evaluaron a intervalos regulares los siguientes parámetros a fin de detectar posibles efectos relacionados con el tratamiento: aspecto físico, comportamiento, signos clínico, puntuación de Draize de las reacciones en los sitios de inyección, temperatura rectal, aumento de peso corporal, oftalmología, hematología, química clínica, patología macroscópica e histopatología de determinados órganos y tejidos, incluidos los sitios de inyección. Se efectuaron análisis estadísticos sobre aumento de peso, temperatura corporal, hematología, química clínica y pesos de órganos. Para evaluar la recuperación, se practicó la necropsia de la mitad de los animales (3/sexo/grupo) el día 17, y de los animales restantes, el día 31.

La primera y segunda dosis se administraron en las patas traseras izquierda (día 1) y derecha (día 15), respectivamente. Por lo tanto, los sitios de inyección izquierdos se evaluaron a los 2 y 16 días posdosis (necropsia del día 17), y los sitios de inyección derechos se evaluaron a los 16 y 30 días posdosis (necropsia del día 31).


Novartis Argentina S.A.
Dr. Lucio Jaramila
Director Técnico
MN 14640


Novartis Argentina S.A.
Vicepresidente Ejecutivo
Gus. Asociado a la Investigación
Audiencia

