



NOVARTIS



Ningún animal murió en este estudio. No hubo signos clínicos de toxicidad sistémica después de una sola dosis ni reacciones detectables en los sitios de inyección en ninguno de los animales. Después de dos dosis, no hubo efectos relacionados con el tratamiento sobre ninguno de los parámetros de estudio que indicara toxicidad local o sistémica en ninguno de los grupos de tratamiento. Se observaron algunas diferencias estadísticamente significativas en algunos parámetros hematológicos y de química clínica entre los grupos. Sin embargo, las diferencias fueron de pequeña magnitud, y dentro de los rangos normales previstos para conejos no tratados (controles históricos), de manera que no se los consideró relacionados con el tratamiento.

No hubo diferencias relevantes entre los grupos respecto del peso de los órganos en ninguna de las dos necropsias programadas, y los valores individuales cayeron todos dentro de límites normales. No hubo ninguna observación macroscópica, excepto para los sitios de inyección. Los hallazgos macroscópicos en los sitios de inyección tratados dos días antes indicaron mayor frecuencia de hemorragia focal leve en el grupo de Agripal + MF59W.1 en comparación con los otros dos grupos. No se detectaron hallazgos macroscópicos en los sitios de inyección tratados 16 ó 30 días antes de la necropsia.

El examen histológico del sitio de inyección a los 2 días postinyección reveló inflamación intersticial (principalmente aguda), hemorragia intersticial y/o degeneración de fibras musculares en casi todos los animales. Estas observaciones fueron más notables en el grupo de Agripal + MF59W.1, seguido del grupo de Agripal y, después, del grupo de MF59W.1. Dieciséis días después de la inyección, todavía había cambios inflamatorios y degenerativos, pero de menor grado, en la mayoría de los animales. Treinta días después de la inyección, se observó recuperación de parcial a completa en la mayoría de los animales. A los 16 y 30 días postinyección, no hubo diferencias en los sitios de inyección entre los grupos. No hubo ningún otro tejido que mostrara hallazgos relacionados con el tratamiento, y todos los cambios observados fueron comparables en frecuencia e intensidad con los hallados habitualmente en conejos Nueva Zelanda de edad similar del Centro de Investigación.

En conclusión, no se observó ningún efecto adverso local o sistémico en conejos que recibieron dos inyecciones intramusculares de adyuvante MF59W.1, Agripal o equivalente de Fiuad Agripal + MF59W.1.

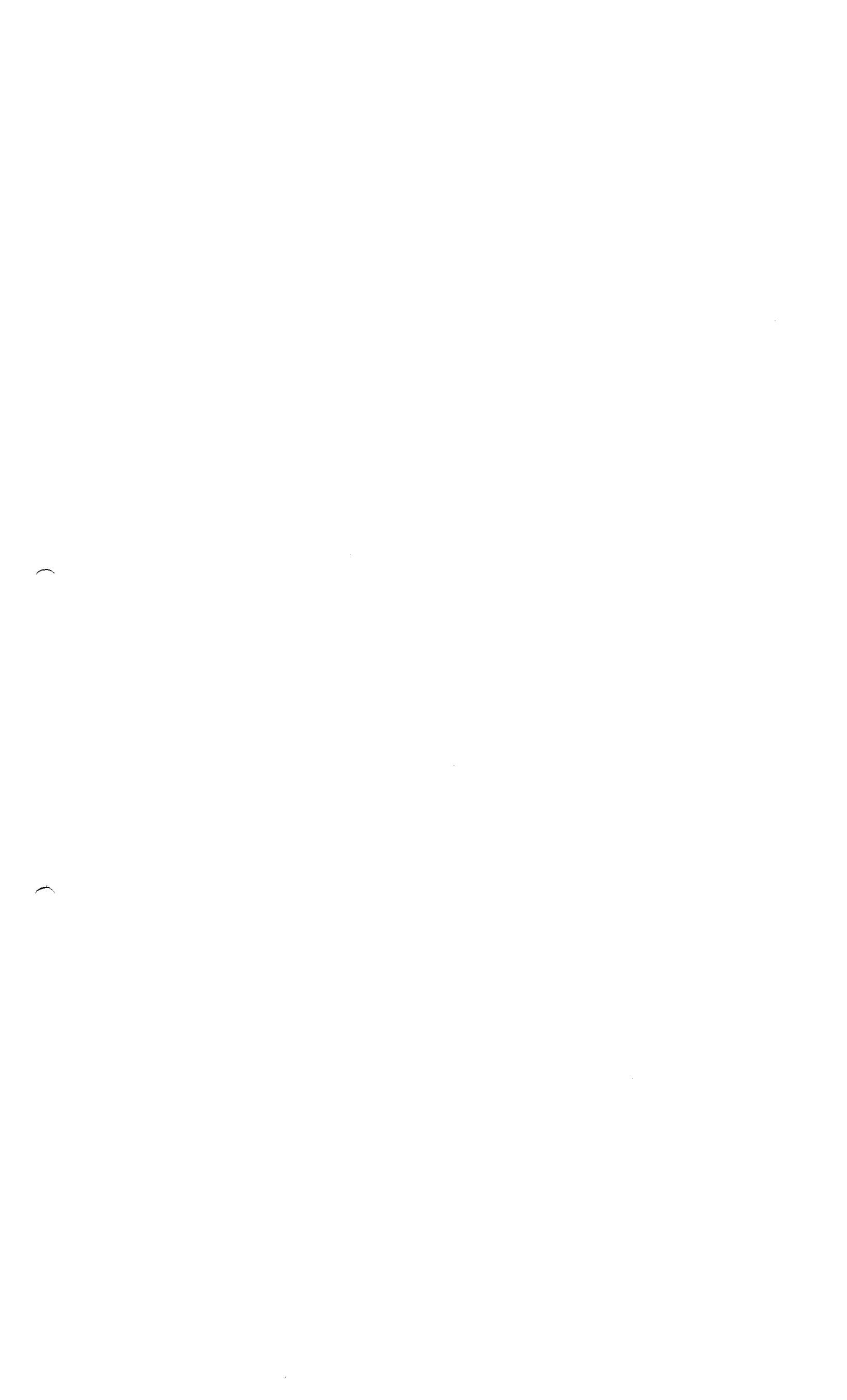
Estudio de toxicidad a 4 semanas con formulaciones de vacuna antigripal Fiuad®, Fiuad High B y Fiuad High H3+IC31® administradas mediante 3 inyecciones intramusculares a conejos Nueva Zelanda Blanco, seguido de un período de recuperación de 2 semanas

Este estudio GLP de toxicología se efectuó en conejos, un modelo animal aceptado para la investigación de toxicidad de vacuna (Estudio No. 488182). Grupos de 8 animales por sexo recibieron tres inyecciones intramusculares de 0,5 ml con 14 días de intervalo. Las inyecciones se administraron en patas traseras alternas.

El grupo control recibió 0,5 ml de solución salina en cada ocasión de dosificación. Otros dos grupos recibieron 0,5 ml de Fiuad (denominada TIV + MF59 en este informe) o TIV + B alta + MF59, una

NOVARTIS ARGENTINA S.A.
VACUNA ANTIGRIPAL
FOLIO 301
MESA DE ENTRADAS

NOVARTIS ARGENTINA S.A.
Dr. Lucio Zelanda
Director Técnico
MN 14840





formulación similar a Fludad que contiene 30 µg de HA de la cepa B en lugar de los 15 µg de HA convencionales. El cuarto grupo recibió TIV + H3N2 alta + MF59 + IC31 en un volumen de 1,0 ml. Esta formulación se preparó como una 'mezcla en el campo' inmediatamente antes de la inyección. IC31 es un adyuvante nuevo; los componentes activos son un péptido catiónico de 11-mer (KLK) y un oligodesoxinucleótido de 26-mer (ODN1a) en una solución acuosa amortiguada.

Se evaluaron los parámetros toxicológicos convencionales, como mortalidad, signos clínicos, evaluaciones del sitio de inyección dérmico después de la inyección y hasta la resolución si era necesario, peso corporal, consumo de alimentos y agua, exámenes oftalmológicos, exámenes físicos (frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria y parámetros de patología clínica) (hematológicos y de química clínica). Se practicaron necropsias los días 31 (grupo principal) y 43 (grupo de recuperación), que incluyeron pesos de órganos terminales y exámenes macroscópicos post mortem completos. Se efectuó estudio microscópico de determinados tejidos/órganos. Además, se evaluó la inmunogenidad en muestras recolectadas antes de la prueba, antes de la dosificación de los días 15 y 29, y en la necropsia del día 43. Se usó el análisis de inhibición de la hemaglutinación (IH) para detectar la presencia de anticuerpos séricos contra el virus de la gripe.

No hubo mortalidad. No se observaron efectos relacionados con el tratamiento respecto del peso corporal, el aumento de peso corporal, el consumo de alimentos o los signos clínicos en ninguno de los grupos. No hubo ninguna irritación dérmica ni hallazgos oftalmoscópicos en vida.

No se detectaron efectos relacionados con el tratamiento en cuanto a temperatura corporal, frecuencia cardíaca y frecuencia respiratoria, sobre la base de datos evaluables. Sin embargo, debido a un error técnico (se tomaron las determinaciones después de haber colocado a los animales bajo una lámpara de calor para facilitar la extracción de sangre), algunos de los datos no se consideraron confiables.

Los efectos relacionados con el tratamiento sobre los parámetros hematológicos en los grupos 2, 3 y 4 incluyeron aumento de los niveles de fibrinógeno y ligera disminución del tiempo de protrombina (TP). En las hembras que recibieron TIV + MF59 o TIV + B alta + F59, disminuyó ligeramente el tiempo de trombotastina parcial activada (TPA). En animales tratados, las evaluaciones de química clínica mostraron un aumento de las globulinas totales, con la correspondiente disminución de la relación albúmina: globulina; esto es esperable después de la administración de una sustancia inmunológicamente activa. Todos los valores regresaron a los rangos preprueba hacia el final de la recuperación. Los hallazgos observados en este estudio son compatibles con los observados en otros estudios toxicológicos en conejos con vacunas adyuvantadas con MF59.

En la necropsia principal (día 31), las observaciones macroscópicas en los grupos tratados consistieron en agrandamiento de los ganglios linfáticos en todos los machos y en 3 hembras del grupo 2, 3 del grupo 3 y 1 del grupo 4. Además, 2 hembras del grupo 2 presentaban agrandamiento de los ganglios linfáticos popliteos. En la necropsia postrecuperación (día 43), un macho del grupo 3 y una hembra del grupo 4 tenían agrandamiento de los ganglios linfáticos iliacos. Los efectos sobre los ganglios linfáticos de drenaje son compatibles con la vacunación, y todos los

NOVARTIS ARGENTINA S.A.
Gerente General
Gral. Antonio G. Rodríguez
Mendoza 8

NOVARTIS ARGENTINA S.A.
Dr. Lucio Jernic
Director Técnico
MN 14840





Tabla 5 Programa de toxicología con MF59

Tipo y duración del estudio	Vía de administración	Especie	Compuesto administrado
Toxicidad por dosis única	Intramuscular	Conejo	1-2x MF59
Toxicidad por dosis repetidas (2-14 dosis)	Intramuscular	Conejo	1-2x MF59
Genotoxicidad	In vitro	N/A	N/A
	Intraperitoneal	Ratón	Hasta 5000 mg/kg
Toxicidad reproductiva (5-23 dosis)	Intramuscular	Rata, conejo	0,25-2x MF59
Tolerabilidad local (2-3 dosis)	Intramuscular	Conejo, perro	1-2x MF59
Otra toxicidad (3 dosis)	Intradérmica y tópica	Cobayo	0,25-2x MF59
Otros (otro) estudios (2-6 dosis)	Intramuscular, intradérmica y tópica	Rata, cobayo, conejo, marmota americana, chimpancé	Diversos antígenos adelantados con MF59

*La dosis clínica estándar de MF59 es de 0,25 ml (combinado con 0,25 ml de antígeno). En estudios preclínicos, una dosis 1 x o 2x de MF59 es de 0,25 o 0,5 ml, respectivamente.

El paquete preclínico de MF59 es sustancial; por lo tanto, en este dossier, se presentan sólo los estudios fundamentales y un subgrupo de estudios no fundamentales. Los considerados fundamentales son estudios de toxicidad por dosis repetidas, genotoxicidad, sensibilización y toxicidad embrifetal y para el desarrollo. Los estudios no fundamentales son aquellos realizados con formulaciones vacunales compuestas por antígenos adelantados con MF59, con un grupo de MF59 solo; estos estudios aportan datos de seguridad adicionales. Por lo general, los estudios no fundamentales presentados son aquellos en los que la dosis y/o la duración de la dosificación supera el uso clínico actual. Véase una lista completa de estudios no fundamentales en 2.6.7.1. Este dossier no incluye los informes de estudios no fundamentales, pero se los remitió al Archivo Maestro de Biofarmacos BB-MF 13858 (emulsión adyuvante MF59C.1).

Toxicidad por dosis repetidas: estudio intramuscular de 14 días en conejos

En este estudio GLP (Estudio No. 90-6081), conejos Nueva Zelanda Blanco recibieron inyecciones intramusculares diarias de 0,5 ml de solución salina o MF59 durante 14 días. Se practicó la necropsia de la mitad de los animales el día 15, y del resto, el día 22 después de un período de recuperación de

NOVARTIS
 Gerente General
 Dr. Luis A. ...
 Director Técnico
 MN 14840

NOVARTIS Argentina S.A.
 Dr. Luis A. ...
 Director Técnico
 MN 14840



7 días. Los parámetros de estudio incluyeron observaciones clínicas, peso corporal, consumo de alimento, examen oftalmológico, determinaciones de química clínica, hematológicas, análisis de orina y temperatura corporal. Se efectuaron exámenes macroscópicos completos y se pesaron determinados órganos. Se recolectó una lista completa de tejidos, y se pesaron determinados órganos.

Se evaluaron microscópicamente los siguientes tejidos: corazón con aorta, riñones, pulmón, hígado con vesícula biliar, cápsula de la articulación de la rodilla, ganglios linfáticos ilíacos y paraaórticos, timo, bazo, ojos, hipófisis, médula ósea, sitios de inyección y lesiones macroscópicas.

No hubo mortalidad ni signos clínicos de toxicidad. No hubo ningún efecto sobre el peso corporal, el consumo de alimentos, la temperatura corporal, los parámetros oftalmológicos, de química clínica ni sobre el análisis de orina. Se observó un ligero aumento de los niveles de fibrinógeno en las hembras tratadas con MF59 al final del período de dosificación, pero éstos se normalizaron durante el período de recuperación.

No hubo observaciones macroscópicas compatibles con toxicidad sistémica. Desde el punto de vista microscópico, se observaron leve atrofia tímica, reversible; ligero aumento de neutrófilos y células precursoras en la pulpa roja esplénica (más marcado en las hembras); y leve hiperplasia de la médula ósea en el grupo de MF59.

En los sitios de inyección de MF59, los hallazgos macroscópicos fueron hemorragia, edema y cambio de coloración de los tejidos subcutáneos. Estos hallazgos fueron más frecuentes después de las últimas 4 inyecciones, con reducción de la incidencia y severidad en los animales en recuperación, lo que indicó resolución.

Seis de los 14 sitios de inyección de cada animal se evaluaron por microscopía. En los animales tratados con MF59, los hallazgos al día 1 posinyección eran, en general, de mínimos a leves y consistían en infiltración de neutrófilos y macrófagos, edema, hemorragia y necrosis de micocitos. Las observaciones a los 7 días posinyección consistían en infiltrados de células inflamatorias, macrófagos y fibroblastos, con necrosis, regeneración y calcificación de micocitos ocasional. A los 12 días posinyección, las observaciones eran focos mínimos de macrófagos y células mononucleares, acompañados de regeneración de micocitos.

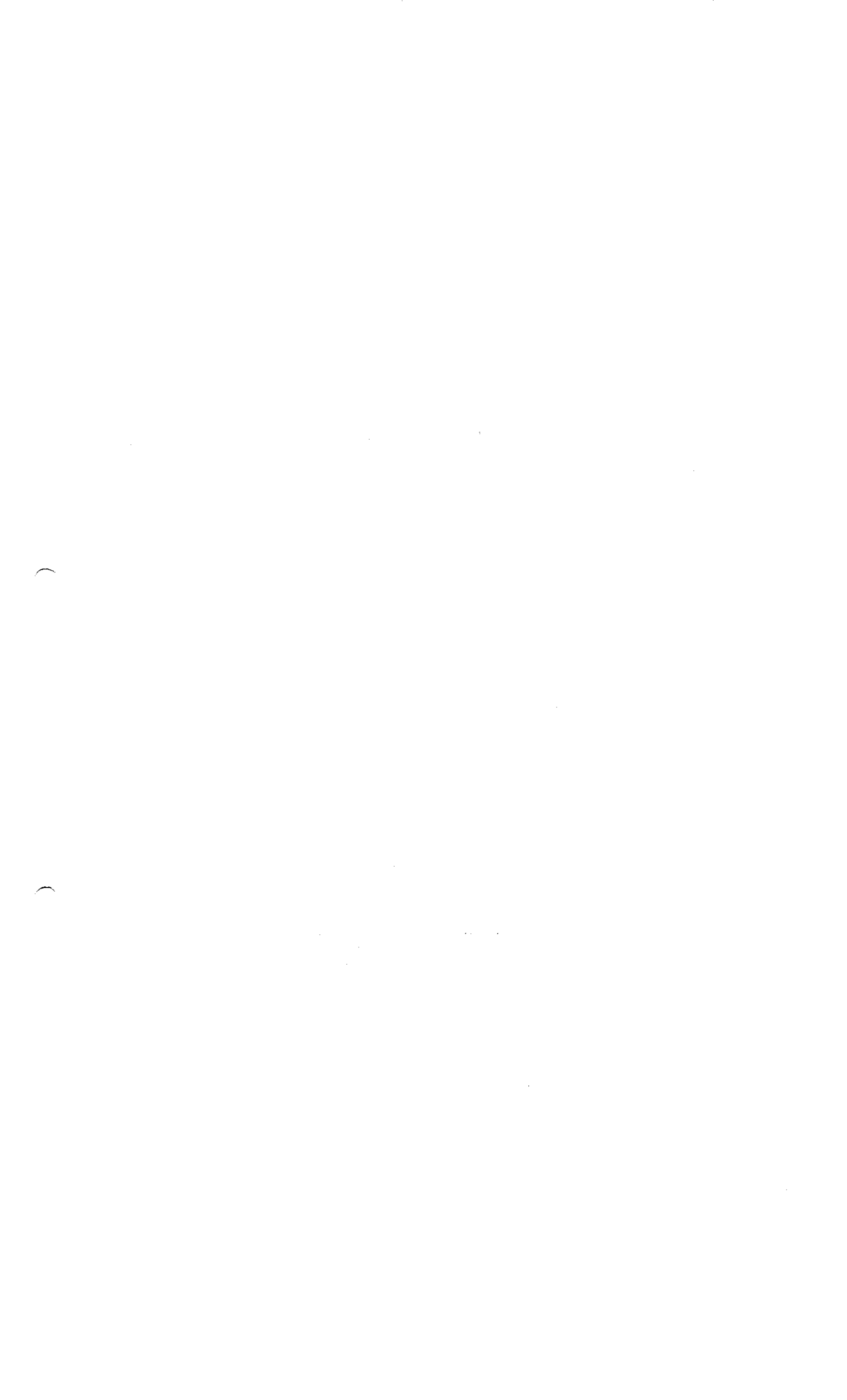
La administración intramuscular diaria de MF59 durante 14 días fue bien tolerada en los conejos. No hubo observaciones compatibles con toxicidad sistémica, y la reactividad local fue de bajo orden de magnitud. Los hallazgos en el sitio de inyección fueron leves y reversibles. En este estudio, el esquema de tratamiento fue mucho más intenso que el previsto para cualquier uso humano de la vacuna.

Genotoxicidad

Como MF59 contiene un producto natural con contaminantes inherentes (escualeno), se consideró criterioso investigar la acción mutágena del adyuvante. Se investigó el adyuvante MF59, en formulaciones tanto acuosa como en citrato, mediante el análisis citogenético de micronúcleos en

NOVARTIS ARGENTINA S.A.
Dr. Luchio Gerbasi
Director Técnico
MN 14840

NOVARTIS ARGENTINA S.A.
Gerente General
Gerente de Recursos Humanos
Gerente de Marketing
Gerente de Operaciones
Gerente de Ventas





ratones y el análisis de mutación inversa bacteriana (prueba de Ames) utilizando diseños de estudio estándares. Ambas formulaciones de MF59 fueron negativas en las pruebas de mutación inversa bacteriana y de micronúcleos en ratones.

Análisis de mutación inversa bacteriana

El propósito de estos estudios GLP (Estudios Nos. G96AQ61.502 y G96AQ62.502) fue evaluar el potencial mutágeno de MF59 (tanto de la formulación en agua como en citrato) y/o sus metabolitos determinando su capacidad de inducir mutaciones inversas en determinados loci de varias cepas de *Salmonella typhimurium* y una cepa de *E. coli* en presencia y ausencia de activación por S9 (prueba de Ames). El análisis se llevó a cabo según protocolos estándares publicados.

Se investigaron MF59C.1 y MF59W.1 usando las cepas de prueba TA98, TA100, TA1535 y TA1537 de *S. typhimurium*, así como la cepa de prueba WP2 uvrA de *E. coli* tanto en presencia como en ausencia de hígado de rata inducido por Aroclor 1254, S9 (como sistema de activación metabólica). El análisis se realizó aplicando el método de incorporación en placa.

Se utilizaron dosis de 100, 333, 1000, 3333, y 5000 µg de MF59/placa. Se empleó solución salina como control negativo, y se incluyeron controles positivos para cada cepa bacteriana. Los controles positivos usados fueron los siguientes: con activación por S9, 2-aminoantraceno; sin activación por S9, TA98 = 2-nitrofluoreno; TA100 y TA1535 = azida de sodio; TA1537 = 9-aminoacridina; y WP2 uvrA = metilmetanosulfonato. No se observó ninguna respuesta positiva ni precipitado ni toxicidad apreciable. En las condiciones de este estudio, tanto la formulación MF59C.1 como MF59W.1 fueron negativas en el Análisis de Mutación Inversa Bacteriana.

Análisis citogénético de micronúcleos en ratones

El propósito de estos estudios GLP (Estudios Nos. G96AQ61.122 y G96AQ62.122) fue evaluar el potencial clastogénico de las formulaciones MF59C.1 y MF59W.1, medido por su capacidad de inducir eritrocitos policromáticos micronucleados en la médula ósea de ratones macho y hembra. El análisis se llevó a cabo de acuerdo con protocolos estándares publicados.

En el análisis de micronúcleos, ratones ICR machos y hembras recibieron vehículo o 1250, 2500 o 5000 mg/kg de MF59 (MF59C.1 o MF59W.1) en un volumen constante de 20 ml/kg por vía intraperitoneal. Se usó solución salina como control negativo y ciclofosfamida como control positivo. Se sacrificaron animales (5/sexo por grupo) a las 24, 48 y 72 horas de la administración de la dosis, excepto en los controles positivos, en los que se sacrificaron cinco animales por sexo 24 horas después de la administración de la dosis.

No hubo mortalidad. Los signos clínicos después de la administración de la dosis consistieron en letargo de ratones machos y hembras a 5000 mg/kg. Se prepararon y tñieron con May-Grunwald-Giemsa portaobjetos de células de médula ósea recolectadas 24, 48 y 72 horas después del tratamiento, y se los estudió microscópicamente para investigar eritrocitos policromáticos micronucleados. Se observaron ligeras reducciones (hasta del 11% para la formulación de MF59 en citrato y hasta del 13% para la formulación en agua) del cociente entre eritrocitos policromáticos y

NOVARTIS Argentina S.A.
Dr. Lucio Jeronimo
Director Técnico
M.N. 14840

NOVARTIS Argentina S.A.
Vesparto, 1300
Buenos Aires, Argentina
Facturas, Remesas, Pagos
Escribir a: Modelada

