

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 Agrippal + 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 posinyección 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 Agrippal + MF59W.1, seguido del grupo de Agrippal 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 posinyección, 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.

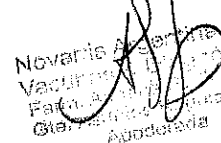
En conclusión, no se observó ningún efecto adverso local o sistémico en conejos que recibieron dos inyecciones intramusculares de adyuvante MF59W.1, Agrippal o equivalente de Fluad Agrippal + MF59W.1.

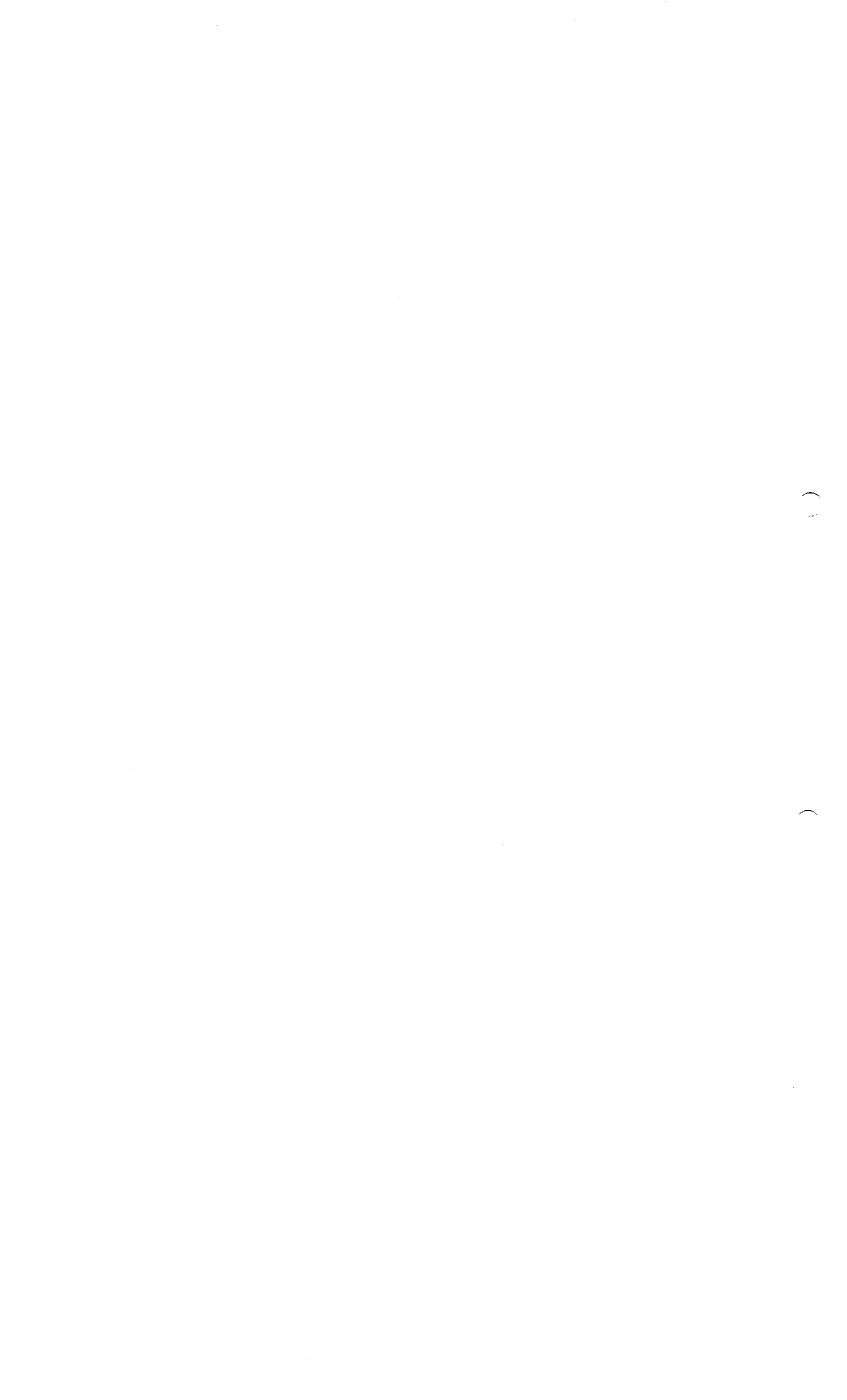
Estudio de toxicidad a 4 semanas con formulaciones de vacuna antigripal Fluad®, Fluad High B y Fluad High H3+IC31® administradas mediante 3 inyecciones intramusculares a conejos Nueva Zelanda Blanco, seguido de un período de recuperación de 2 semanas

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 Fluad (denominada TIV + MF59 en este informe) o TIV + B alta + MF59, una


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


Novartis Argentina S.A.
Vacunas y Productos Biológicos
Pavón 14840
Génova, Buenos Aires
Argentina



formulación similar a Fluad 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 temperatura corporal) 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 mórtem completos. Se efectuó estudio microscópico de determinados tejidos/órganos. Además, se evaluó la inmunogenicidad 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.

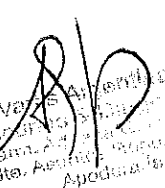
No hubo mortalidad. No se observaron efectos relacionados con el tratamiento respecto del peso corporal, el aumento de peso corporal, el consumo de alimentos o los signos clínicos en ninguno de los grupos. No hubo ninguna irritación dérmica ni hallazgos oftalmoscópicos en vida.

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 tromboplastina parcial activada (TTPA). 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 ilíacos 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 poplíteos. En la necropsia posrecuperación (día 43), un macho del grupo 3 y una hembra del grupo 4 tenían agrandamiento de los ganglios linfáticos ilíacos. Los efectos sobre los ganglios linfáticos de drenaje son compatibles con la vacunación, y todos los


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


Novartis Argentina S.A.
Vicepresidente de Investigación y Desarrollo
Farm. Arg.
Cto. Asesor. Investigación y Desarrollo
Apodada



demás hallazgos se consideraron incidentales y dentro del rango normal de variación para esta especie.

Hubo un ligero aumento del peso absoluto y relativo de las glándulas suprarrenales en las hembras del grupo 3, en la necropsia del día 31; no se detectaron cambios histopatológicos ni diferencias respecto de los controles el día 43. El peso del hígado aumentó en un macho y dos hembras del grupo 4 el día 31, pero no se alcanzó significación estadística ni se observó un correlato histopatológico. No se observaron diferencias respecto de los controles el día 43.

La histopatología de los sitios de inyección reveló que la administración de las formulaciones vacunales se asociaba con un bajo grado de inflamación en los sitios de inyección y cambios reactivos de los ganglios linfáticos locales. No parecía haber diferencias significativas en la incidencia o intensidad de estos cambios entre las tres formulaciones de vacuna. El aumento de los niveles totales de antígeno de 45 a 60 µg no aumentó la toxicidad local ni la reactividad en conejos. No se observaron cambios histopatológicos asociados con el tratamiento ni indicativos de toxicidad sistémica en ningún otro tejido.

El análisis de muestras séricas (no GLP) para investigar anticuerpos contra la cepa A (H3N2) y/o la cepa B de virus de la gripe reveló que todos los animales tratados tenían títulos detectables después de la primera dosis. Por lo general, los títulos aumentaron después de la segunda dosis y se mantuvieron estables durante todo el período de recuperación que finalizó el día 43.


Sobre la base de los datos en vida, las observaciones post mórtem y la histopatología, las formulaciones vacunales TIV + H3N2 alta + MF59 + IC31 y TIV + B alta + MF59 eran comparables a TIV + MF59 (la vacuna Fluad autorizada). Todas las vacunas fueron bien toleradas, y no se observó ninguna evidencia de toxicidad.

Adyuvante MF59

Se completó un paquete completo de estudios toxicológicos GLP con MF59. Hasta la fecha, MF59 no se ha asociado con toxicidad sistémica y tiene un bajo orden de reactividad local. En estudios de dosis repetidas en conejos, los hallazgos de patología clínica de aumento del fibrinógeno, y cambios inflamatorios y degenerativos menores en el sitio de inyección son compatibles con los efectos de las inyecciones intramusculares de un adyuvante inmunológico. Estos hallazgos son fácilmente reversibles en el término de días a 1-2 semanas. En estudios toxicológicos de dosis repetidas en perros, no se observaron efectos sobre parámetros del sistema cardiovascular ni del sistema nervioso central (seguridad farmacológica). El MF59 no es genotóxico (prueba de Ames) ni clastogénico (micronúcleo en ratones), no es un sensibilizante dérmico (cobayo) ni fue teratógeno (rata y conejo) o tóxico para el desarrollo (rata). La siguiente tabla presenta una reseña del programa preclínico.



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



Novartis Argentina S.A.
Vacunas y Productos Biológicos
Farm. Adm. y Control de Calidad
Gte. Asesoría Regulatoria
Buenos Aires



Tabla 5 Programa de toxicología con MF59

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

^aLa dosis clínica estándar de MF59 es de 0,25 ml (combinado con 0,25 ml de antígeno). En estudios preclínicos, una dosis 1× o 2× 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 embriofetal y para el desarrollo. Los estudios no fundamentales son aquellos realizados con formulaciones vacunales compuestas por antígenos adyuvantados 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 Biofármacos 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 Argentina S.A.
Dr. Ludovico Mancini
Director Técnico
MN 14840

Novartis Argentina S.A.
Módulo de Asesoría Técnica
Paseo de la Independencia 1500
Cte. Avenida Hospitalarios
Buenos Aires

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 hiper celularidad 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 subfasciales y 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 miocitos. Las observaciones a los 7 días posinyección consistían en infiltrados de células inflamatorias, macrófagos y fibroblastos, con necrosis, regeneración y calcificación de miocitos ocasional. A los 12 días posinyección, las observaciones eran focos mínimos de macrófagos y células mononucleares, acompañados de regeneración de miocitos.

La administración intramuscular diaria de MF59 durante 14 días fue bien tolerada en los conejos. No hubo observaciones compatibles con toxicidad sistémica, y la reactogenicidad 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. Ludovico Jeronaci
Director Técnico
MIN 14840

Novartis Argentina S.A.
V. C. 14840
Farm. Av. Santa Fe 14840
Gte. Asistencia Regulatoria
Apoderada



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.

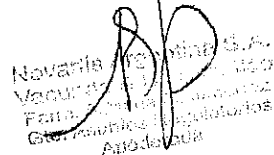
Análisis citogenético de micronúcleos en ratones

El pronóstico 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 tiñeron 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
MN 14840


Novartis Argentina S.A.
Vacuna
Farm. Gen. y Especializ.
Gen. y Especializ.
Apod. 14840

