

sanofi pasteur
Antígeno de superficie de la hepatitis B

Tabla 1: Estudio de estabilidad 1: Resultados del lote de uniformidad AC004

Pruebas	Criterios de aceptación	T0	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses	18 meses	24 meses	26 meses*	30 meses	36 meses
Aspecto	Solución opalescente, levemente turbia y amarillenta	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	NR†	Cumple	Cumple
Medición del pH	6,0 – 8,0	6,9	6,9	6,9	6,9	6,8	6,7	6,8	NR	6,8	6,8
Contenido proteico	0,75 – 1,75 mg/ml	1,46	1,55	1,60	1,67	1,54	1,64	1,62	NR	1,55	1,53
Contenido de HBsAg	≥ 0,7 mg de HBsAg/mg de proteínas totales	1,09	1,07	1,06	0,95	1,11	1,02	0,83‡	0,88	0,91	0,87‡
Pureza	≥ 95%	97	96	96	97	97	96	97	NR	95	96
Porcentaje de monómero libre de HBsAg	≤ 3%	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	NR	< 2	< 2
Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica	Ausencia de crecimiento microbiano	Cumple	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	Cumple

*
†
‡

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.

Momentos de medición adicionales para confirmar el resultado obtenido de contenido de HBsAg luego del cambio del estándar de referencia de HBsAg a los T24 meses.
NR = No realizado
El estándar de referencia de contenido de HBsAg se cambió a los 24 meses y 36 meses.





sanofi pasteur
Antígeno de superficie de la hepatitis B

Tabla 2: Estudio de estabilidad 1: Resultados del lote de uniformidad AC005

Pruebas	Criterios de aceptación	T0	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses	18 meses	24 meses	26 meses*	30 meses	36 meses
Aspecto	Solución opalescente, levemente turbia y amarillenta	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	NR†	Cumple	Cumple
Medición del pH	6,0 - 8,0	6,9	6,9	6,9	6,9	6,8	6,8	6,8	NR	6,7	6,8
Contenido proteico	0,75 - 1,75 mg/ml	1,45	1,47	1,54	1,66	1,52	1,60	1,61	NR	1,50	1,53
Contenido de HBsAg	≥ 0,7 mg de HBsAg/mg de proteínas totales	0,98	1,05	0,99	0,96	0,97	1,03	0,80‡	0,83	0,84	0,79‡
Pureza	≥ 95%	96	95	96	98	98	95	96	NR	95	95
Porcentaje de monómero libre de HBsAg	≤ 3%	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	NR	<2	<2
Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica	Ausencia de crecimiento microbiano	Cumple	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	Cumple

*
†
‡
ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

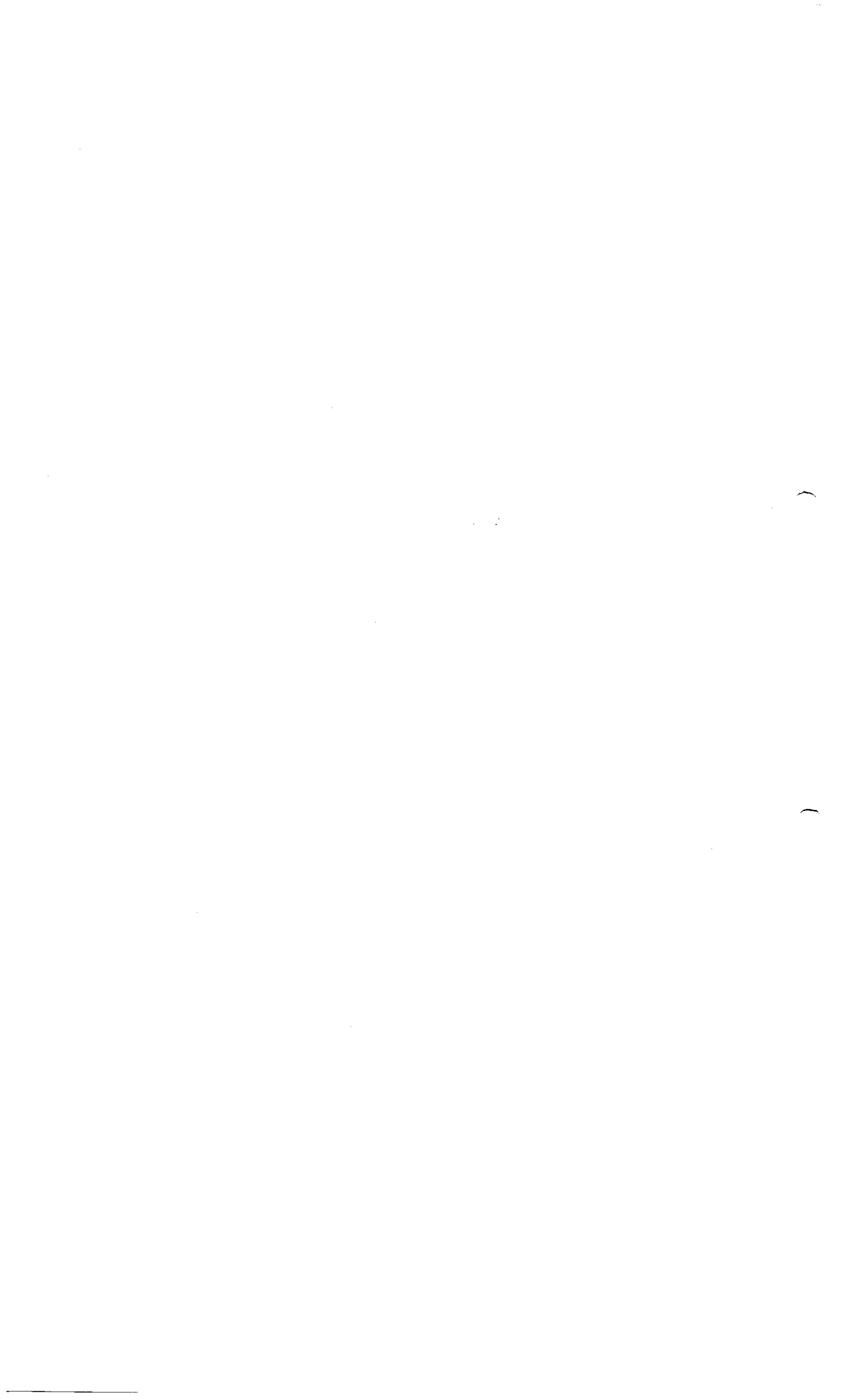
CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.

Momentos de medición adicionales para confirmar el resultado obtenido de contenido de HBsAg luego del cambio del estándar de referencia de HBsAg a los T24 meses.

NR = No realizado

El estándar de referencia de contenido de HBsAg se cambió a los 24 meses y 36 meses.





sanofi pasteur
Antígeno de superficie de la hepatitis B

Tabla 3: Estudio de estabilidad 1: Resultados del lote de uniformidad AC007

Pruebas	Criterios de aceptación	T0	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses	18 meses	24 meses	26 meses*	28 meses*	30 meses	36 meses
Aspecto	Solución opalescente, levemente turbia y amarillenta	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	NR†	NR	Cumple	Cumple
Medición del pH	6,0 – 8,0	6,9	6,9	6,9	6,9	6,8	6,8	6,8	NR	NR	6,8	6,8
Contenido proteico	0,75 – 1,75 mg/ml	1,45	1,49	1,44	1,49	1,43	1,48	1,58	1,53	1,61	1,50	1,50
Contenido de HBsAg	≥ 0,7 mg de HBsAg/mg de proteínas totales	1,23	1,16	1,20	1,08	1,22	0,87‡	0,79	0,87	0,95	1,00	0,86‡
Pureza	≥ 95%	97	97	98	98	96	97	96	NR	NR	97	97
Porcentaje de monómero libre de HBsAg	≤ 3%	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	NR	NR	<2	<3
Prueba de esterilidad bacteriana y fungica	Ausencia de crecimiento microbiano	Cumple	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	Cumple

* Momentos de medición adicionales para confirmar el resultado obtenido de contenido de HBsAg luego del cambio del estándar de referencia de HBsAg a los T18 meses.

† NR = No realizado

‡ El estándar de referencia de contenido de HBsAg se cambió a los 18 meses y 36 meses.

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.

RA_0299478

Información confidencial/proprietaria
Página 8 de 21







2.2 Estudio de estabilidad 2: condiciones aceleradas a $+25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 6 meses

Los resultados del estudio de estabilidad 2 que incluye tres lotes de uniformidad de la tercera tanda de producción de HBsAg almacenados en matraces de vidrio a $+25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 6 meses se presentan en la Tabla 4 a la Tabla 6.

Tabla 4: Estudio de estabilidad 2: Resultados de estabilidad del lote de uniformidad AC004

Pruebas	Criterios de aceptación	T0	1 mes	3 meses	6 meses
Aspecto	Solución opalescente, levemente turbia y amarillenta	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Medición del pH	6,0 - 8,0	6,9	6,9	6,9	6,9
Contenido proteico	0,75 - 1,75 mg/ml	1,46	1,46	1,57	1,62
Contenido de HBsAg	$\geq 0,7$ mg de HBsAg/mg de proteínas totales	1,09	1,10	0,99	0,95
Pureza	$\geq 95\%$	97	97	94	93
Porcentaje de monómero libre de HBsAg	$\leq 3\%$	< 2	< 2	< 2	< 2

Tabla 5: Estudio de estabilidad 2: Resultados del lote de uniformidad AC005

Pruebas	Criterios de aceptación	T0	1 mes	3 meses	6 meses
Aspecto	Solución opalescente, levemente turbia y amarillenta	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Medición del pH	6,0 - 8,0	6,9	6,9	6,9	6,8
Contenido proteico	0,75 - 1,75 mg/ml	1,45	1,41	1,53	1,60
Contenido de HBsAg	$\geq 0,7$ mg de HBsAg/mg de proteínas totales	0,98	1,01	0,94	0,99
Pureza	$\geq 95\%$	96	96	96	ND*
Porcentaje de monómero libre de HBsAg	$\leq 3\%$	< 2	< 2	< 2	< 2

* ND = No hay datos (vea la explicación en la sección 3.2.S.7.1 Resumen y conclusiones de estabilidad)

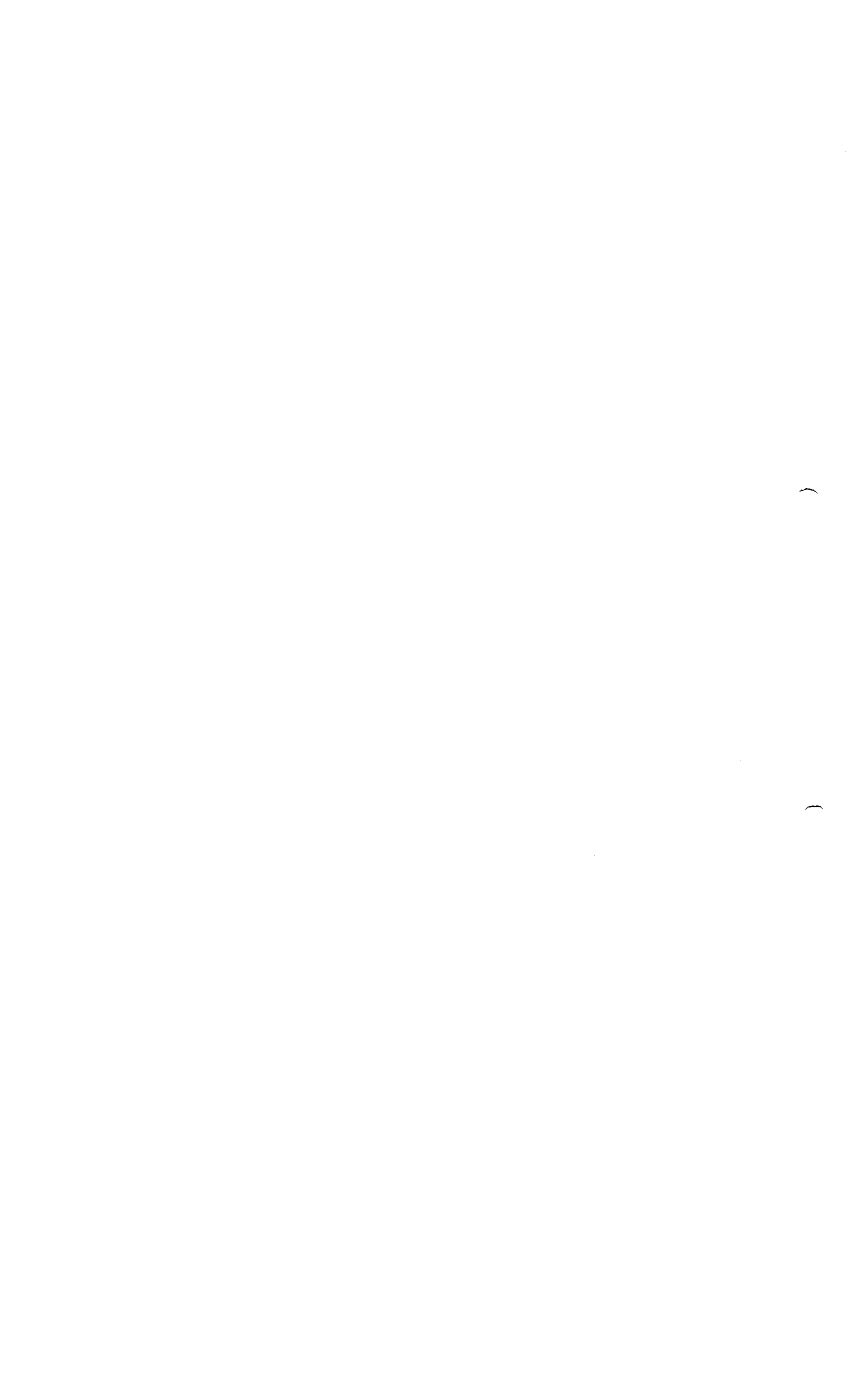




Tabla 6: Estudio de estabilidad 2: Resultados del lote de uniformidad AC007

Pruebas	Criterios de aceptación	T0	1 mes	3 meses	6 meses
Aspecto	Solución opalescente, levemente turbia y amarillenta	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Medición del pH	6,0 - 8,0	6,9	6,9	6,8	6,9
Contenido proteico	0,75 - 1,75 mg/ml	1,45	1,48	1,53	1,52
Contenido de HBsAg	≥ 0,7 mg de HBsAg/mg de proteínas totales	1,23	1,17	1,10	0,97
Pureza	≥ 95%	97	96	96	96
Porcentaje de monómero libre de HBsAg	≤ 3%	< 2	< 2	< 2	< 2

2.3 Estudio de estabilidad 3: condiciones aceleradas a +37°C ± 2°C durante 3 meses

Los resultados del estudio de estabilidad 3 que incluye tres lotes de uniformidad de la tercera tanda de producción de HBsAg almacenados en matraces de vidrio a +37°C ± 2°C durante 3 meses se presentan en la Tabla 7 a la Tabla 9.

Tabla 7: Estudio de estabilidad 3: Resultados de estabilidad del lote de uniformidad AC004

Pruebas	Criterios de aceptación	T0	1 mes	3 meses
Aspecto	Solución opalescente, levemente turbia y amarillenta	Cumple	Cumple	Cumple
Medición del pH	6,0 - 8,0	6,9	6,9	6,7
Contenido proteico	0,75 - 1,75 mg/ml	1,46	1,45	1,61
Contenido de HBsAg	≥ 0,7 mg de HBsAg/mg de proteínas totales	1,09	0,95	0,85
Pureza	≥ 95%	97	97	ND*
Porcentaje de monómero libre de HBsAg	≤ 3%	< 2	< 2	< 2

* ND = No hay datos (vea la explicación en la sección 3.2.S.7.1 Resumen y conclusiones de estabilidad)

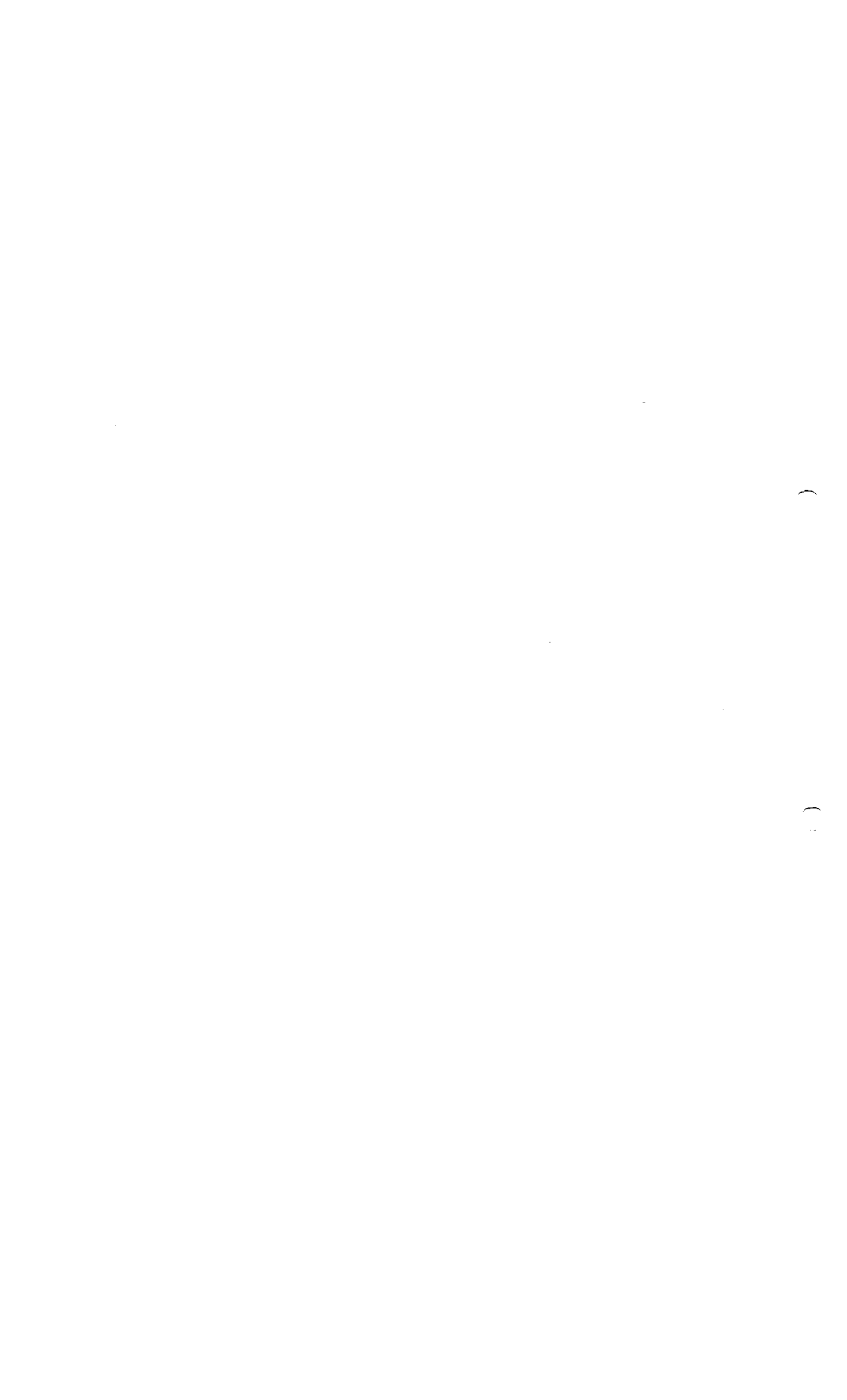




Tabla 8: Estudio de estabilidad 3: Resultados del lote de uniformidad AC005



Pruebas	Criterios de aceptación	T0	1 mes	3 meses
Aspecto	Solución opalescente, levemente turbia y amarillenta	Cumple	Cumple	Cumple
Medición del pH	6,0 - 8,0	6,9	6,9	6,7
Contenido proteico	0,75 - 1,75 mg/ml	1,45	1,46	1,60
Contenido de HBsAg	≥ 0,7 mg de HBsAg/mg de proteínas totales	0,98	0,85	0,82
Pureza	≥ 95%	96	ND*	ND*
Porcentaje de monómero libre de HBsAg	≤ 3%	< 2	< 2	< 2

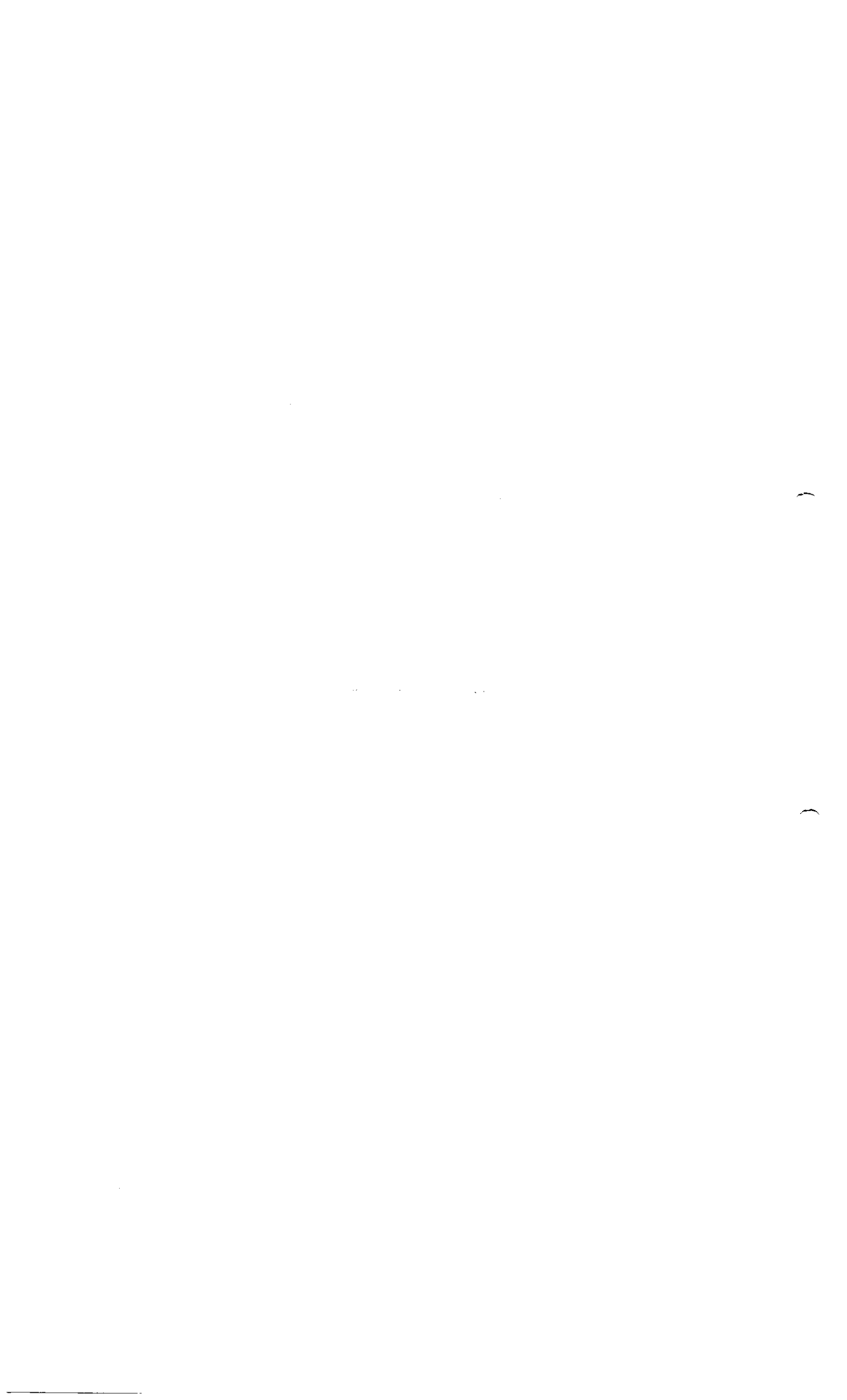
* ND = No hay datos (vea la explicación en la sección 3.2.S.7.1 Resumen y conclusiones de estabilidad)

Tabla 9: Estudio de estabilidad 3: Resultados del lote de uniformidad AC007

Pruebas	Criterios de aceptación	T0	1 mes	3 meses
Aspecto	Solución opalescente, levemente turbia y amarillenta	Cumple	Cumple	Cumple
Medición del pH	6,0 - 8,0	6,9	6,9	6,7
Contenido proteico	0,75 - 1,75 mg/ml	1,45	1,48	1,54
Contenido de HBsAg	≥ 0,7 mg de HBsAg/mg de proteínas totales	1,23	0,98	1,05
Pureza	≥ 95%	97	96	ND*
Porcentaje de monómero libre de HBsAg	≤ 3%	< 2	< 2	< 2

* ND = No hay datos (vea la explicación en la sección 3.2.S.7.1 Resumen y conclusiones de estabilidad)



 ROXANA MONTEMILÓN CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
 DIRECTORA TÉCNICA APODERADO
 SANOFI PASTEUR S.A. SANOFI PASTEUR S.A.





3 Datos de respaldo, estudios de caracterización

3.1 Método de caracterización

El método analítico para determinar la oxidación de los lípidos de la partícula, que no se describe en la sección 3.2.S.3.1 Elucidación de la estructura y otras características, se presenta a continuación.

3.1.1 Oxidación de los lípidos

Con el fin de documentar la parte de lípidos de la partícula de HBsAg, se analizaron los distintos tipos de lípidos (fosfolípidos, ácidos grasos totales, ácidos grasos libres, esteroides totales, triglicéridos) según se informa en la sección 3.2.S.3.1 Elucidación de la estructura y otras características. Debido a la gran cantidad de material necesario para los distintos métodos, no fue posible implementar estos análisis para el seguimiento de estabilidad. Por consiguiente, se decidió seguir una oxidación potencial de los lípidos a través de la liberación de hexanal.

El hexanal es un aldehído proveniente de la oxidación del ácido linoleico (18:2 n-6). El ácido linoleico es el segundo ácido graso más abundante en el HBsAg. Por ende, la liberación de hexanal podría ser un buen marcador de la oxidación de los lípidos.

La estabilidad oxidativa del HBsAg se evaluó determinando el contenido de hexanal del HBsAg utilizando una cromatografía de gas (GC) capilar con espacio de aire. Se almacenaron muestras a diferentes temperaturas y con distinta duración y luego se insertaron en el muestreador con espacio de aire calentado a +30°C durante 30 min. El hexanal se identificó comparando el tiempo de retención con el de un compuesto de referencia y se cuantificó (por triplicado) a partir de una curva estándar realizada en las mismas condiciones experimentales que las muestras.

El porcentaje de oxidación se calculó en base a la concentración de ácido linoleico de cada lote y la concentración de hexanal liberado de la siguiente manera:

$$\text{Porcentaje de oxidación} = [\text{hexanal}] / [\text{ácido linoleico } 18:2] * 2/3 * 100$$

La concentración de ácido linoleico en los 3 lotes de uniformidad se indica a continuación:

AC004: [ácido linoleico 18:2] = 273 µg/ml

AC005: [ácido linoleico 18:2] = 290 µg/ml

AC007: [ácido linoleico 18:2] = 216 µg/ml

3.2 Resultados

Se desarrollaron métodos bioquímicos, inmunoquímicos y biofísicos para caracterizar y documentar la estructura de la partícula de HBsAg (vea la sección 3.2.S.3.1 Elucidación de la estructura y otras características).





Algunos de estos métodos de caracterización se eligieron para hacer un seguimiento de la estabilidad de los lotes de la tercera tanda de producción en distintos momentos de medición y con distintas temperaturas.

A continuación se informan los resultados obtenidos.

3.2.1 Peso molecular y tamaño de las partículas

3.2.1.1 Cromatografía de exclusión por tamaño de alta resolución / dispersión de luz

El peso molecular de los lotes de la tercera tanda de producción se determinó mediante HPSEC/LS en distintos momentos de medición de estabilidad y con distintas temperaturas.

Los resultados obtenidos después de un almacenamiento a $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ se informan en la Tabla 10 y los resultados obtenidos en condiciones aceleradas a $+37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ se informan en la Tabla 11.

Tabla 10: Peso molecular en kDa de los lotes de la tercera tanda de producción (AC004, AC005 y AC007) almacenados a $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$

Lote	T0	6 meses	18 meses	25 meses	30 meses
AC004	3747 kDa	3962 kDa	3986 kDa	4245 kDa	5168 kDa
AC005	3618 kDa	3884 kDa	4597 kDa	3590 kDa	4903 kDa
AC007	3753 kDa	NR*	4596 kDa	4454 kDa	4682 kDa

* NR = No realizado

Tabla 11: Peso molecular en kDa de los lotes de la tercera tanda de producción (AC004, AC005 y AC007) almacenados a $+37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

Lote	T0	1 mes	3 meses	6 meses
AC004	3747 kDa	NR*	5923 kDa	6397 kDa
AC005	3618 kDa	NR	4947 kDa	5652 kDa
AC007	3753 kDa	4837 kDa	4757 kDa	NR

* NR = No realizado

3.2.1.2 Microscopía electrónica (EM)

El tamaño de lote de los lotes de la tercera tanda de producción se determinó mediante EM en distintos momentos de medición de estabilidad y con distintas temperaturas. Los resultados obtenidos a $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ se presentan en la Tabla 12. Los resultados obtenidos en condiciones aceleradas a $+37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ se presentan en la Tabla 13.

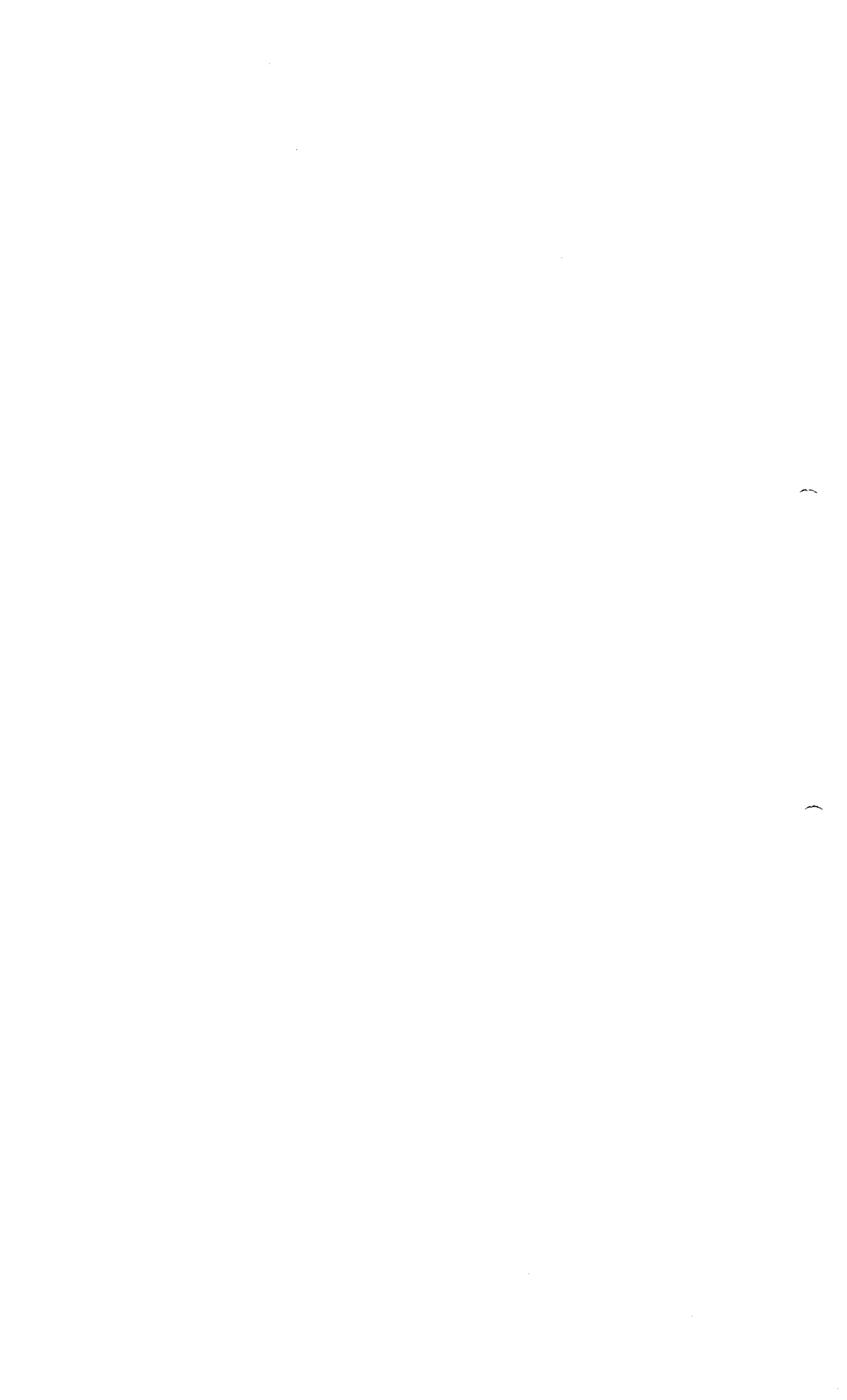




Tabla 12: Distribución en tamaño (nm) de los lotes de la tercera tanda de producción (AC004, AC005 y AC007) almacenados a +5°C ± 3°C determinados mediante microscopía electrónica

Periodo	Lote	18 nm	19 nm	20 nm	21 nm	22 nm	23 nm	24 nm	25 nm	26 nm	27 nm
T0	AC004	-	-	3%	24%	35%	29%	-	9%	-	-
	AC005	-	14%	35%	38%	11%	2%	-	-	-	-
	AC007	-	1%	-	27%	-	41%	-	27%	4%	-
6 meses	AC004	-	-	14%	35%	26%	-	21%	4%	-	-
	AC005	-	-	-	12%	33%	28%	-	21%	-	6%
24 meses	AC004	-	-	11%	41%	30%	15%	3%	-	-	-
	AC005	-	14%	49%	-	29%	7%	1%	-	-	-
	AC007	-	9%	39%	37%	-	13%	2%	-	-	-
30 meses	AC004	-	-	-	19	42	27	11	11	1	-
	AC005	-	-	-	10	39	33	16	16	2	-
	AC007	-	-	8	39	35	16	2	2	-	-

Tabla 13: Distribución en tamaño (nm) de los lotes de la tercera tanda de producción (AC004 y AC005) almacenados 3 meses a +37°C determinados mediante microscopía electrónica

Lote	18 nm	19 nm	20 nm	21 nm	22 nm	23 nm	24 nm	25 nm	26 nm	27 nm
AC004	-	5%	33%	39%	21%	2%	-	-	-	-
AC005	-	11%	35%	39%	14%	1%	-	-	-	-

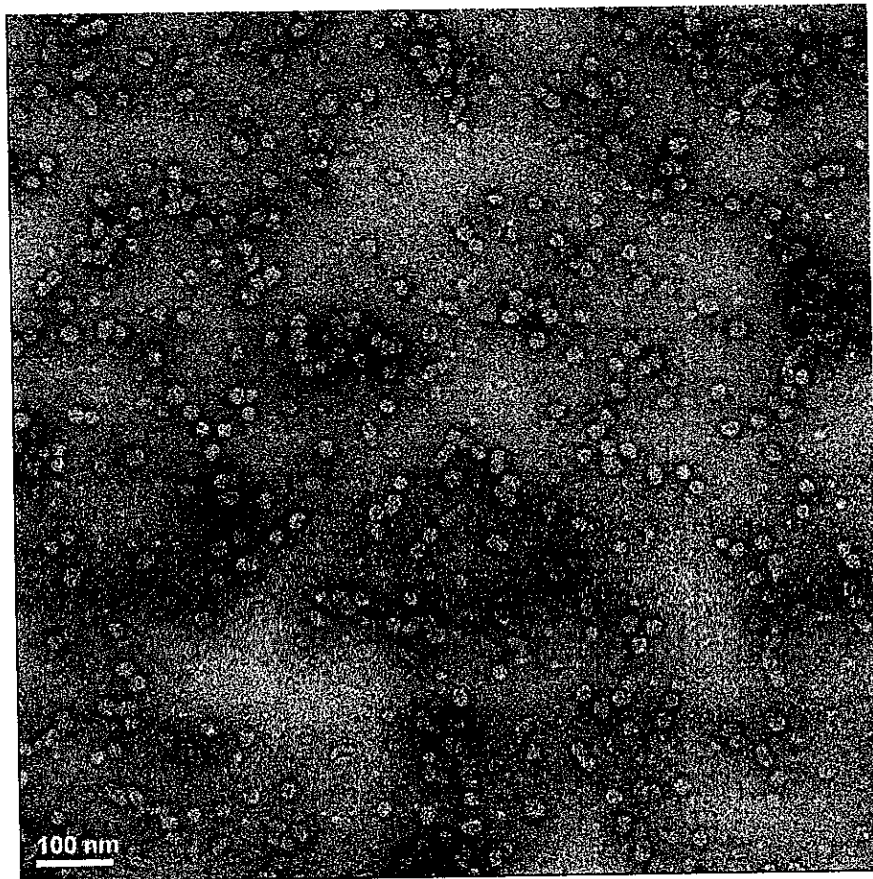
ROXANA MONTEMILONE
 DIRECTORA TÉCNICA
 SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINGUEZ
 APODERADO
 SANOFI PASTEUR S.A.





Figura 1: Análisis de microscopía electrónica mediante tinción negativa del lote AC005 después de 3 meses de almacenamiento a $+37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$



3.2.2 Lípidos de la partícula

3.2.2.1 Proporción lípidos/proteínas totales

Se hizo un seguimiento de la proporción lípidos/proteínas totales de los lotes de la tercera tanda de producción en distintos momentos de medición de estabilidad a $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.

Los resultados se presentan en la Tabla 14.





Tabla 14: Proporción lípidos/proteínas totales de los lotes de la tercera tanda de producción (AC004, AC005 y AC007) almacenados a +5°C ± 3°C

Lote	T0	6 meses	9 meses	12 meses	18 meses	24 meses	30 meses
AC004	0,80	NR*	0,64	0,70	0,70	0,67	0,71
AC005	0,81	NR	0,63	0,69	0,70	0,63	0,75
AC007	0,75	0,69	0,69	0,77	0,72	0,70	0,68

* NR = No realizado

3.2.2.2 Oxidación de los lípidos de la partícula

Se hizo un seguimiento de la concentración de hexanal de los lotes de la tercera tanda de producción almacenados a distinta temperatura. La concentración de hexanal y el porcentaje de oxidación resultante a +5°C ± 3°C y a +37°C ± 2°C se informan en la Tabla 15 y la Tabla 16, respectivamente, para el lote AC004. La concentración de hexanal y el porcentaje de oxidación resultante a +5°C ± 3°C y a +37°C ± 2°C se informan en la Tabla 17 y la Tabla 18, respectivamente, para el lote AC005. La concentración de hexanal y el porcentaje de oxidación resultante a +5°C y a +37°C se informan en la Tabla 19 y la Tabla 20, respectivamente, para el lote AC007.

Tabla 15: Concentración de hexanal y porcentaje de oxidación del lote AC004 almacenado a +5°C ± 3°C

AC004 – Período	Hexanal nmol/ml	% de oxidación
T0	0,2	0,01
2 meses	0,1	0,01
5 meses	0,3	0,02
18 meses	0,2	0,01
26 meses	0,1	0,01

Tabla 16: Concentración de hexanal y porcentaje de oxidación del lote AC004 almacenado a +37°C ± 2°C

AC004 – Período	Hexanal nmol/ml	% de oxidación
T0	0,2	0,01
1 mes	0,2	0,01
3 meses	0,7	0,04
6 meses	0,6	0,03





Tabla 17: Concentración de hexanal y porcentaje de oxidación del lote AC005 almacenado a +5°C ± 3°C

AC005 – Período	Hexanal nmol/ml	% de oxidación
T0	0,3	0,02
2 meses	0,3	0,02
5 meses	0,2	0,01
11 meses	0,2	0,01
18 meses	0,1	0,01
26 meses	0,0	0,02

Tabla 18: Concentración de hexanal y porcentaje de oxidación del lote AC005 almacenado a +37°C ± 2°C

AC005 – Período	Hexanal nmol/ml	% de oxidación
T0	0,3	0,01
1 mes	0,2	0,01
3 meses	0,7	0,04
6 meses	0,9	0,05

Tabla 19: Concentración de hexanal y porcentaje de oxidación del lote AC007 almacenado a +5°C ± 3°C

AC007 – Período	Hexanal nmol/ml	% de oxidación
T0	0,2	0,01
2 meses	0,2	0,01
5 meses	0,2	0,01
11 meses	0,1	0,01
24 meses	0,2	0,01

Tabla 20: Concentración de hexanal y porcentaje de oxidación del lote AC007 almacenado a +37°C ± 2°C

AC007 – Período	Hexanal nmol/ml	% de oxidación
T0	0,2	0,01
1 mes	0,6	0,04
3 meses	0,7	0,04
6 meses	1,8	0,11





3.2.3 Antigenicidad de la partícula

Se evaluaron las afinidades de unión de RF-1 Mab en los lotes de la tercera tanda de producción en T0 y después de 30 meses de almacenamiento a $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$. Se determinaron las constantes de asociación y disociación de equilibrio (k_a y k_d) y la constante de afinidad (KD), y se resumen en la Tabla 21.

Tabla 21: Constantes de afinidad de los lotes de la tercera tanda de producción (AC004, AC005 y AC007) para RF-1 Mab en T0 y después de 30 meses de almacenamiento a $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$

Lote	Período	RF-1 Mab		
		k_a ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k_d (s^{-1})	KD (M)
AC004	T0	$1,40 \cdot 10^4$	$2,57 \cdot 10^{-4}$	$1,84 \cdot 10^{-8}$
	30 meses	$1,49 \cdot 10^4$	$4,00 \cdot 10^{-4}$	$2,69 \cdot 10^{-8}$
AC005	T0	$1,34 \cdot 10^4$	$2,60 \cdot 10^{-4}$	$1,95 \cdot 10^{-8}$
	30 meses	$1,24 \cdot 10^4$	$3,18 \cdot 10^{-4}$	$2,57 \cdot 10^{-8}$
AC007	T0	$1,58 \cdot 10^4$	$2,43 \cdot 10^{-4}$	$1,54 \cdot 10^{-8}$
	30 meses	$1,37 \cdot 10^4$	$2,63 \cdot 10^{-4}$	$1,93 \cdot 10^{-8}$

3.2.4 Estructura secundaria de la proteína S

Los porcentajes de hélice α deducidos del espectro FTIR de los lotes de la tercera tanda de producción almacenados a diferentes temperaturas se presentan en la Tabla 22 para el estudio realizado a $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ y en la Tabla 23 para el estudio realizado a $+37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Tabla 22: Porcentaje de hélice α calculado a partir del espectro FTIR de los lotes de la tercera tanda de producción (AC004, AC005 y AC007) almacenados a $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$

Lote	T0	6 meses	12 meses	18 meses	24 meses	30 meses
AC004	59,6%	58,0%	58,4%	58,1%	58,0%	58,1%
AC005	59,7%	57,3%	57,5%	56,9%	56,9%	55,9%
AC007	60,1%	58,6%	58,6%	59,2%	58,9%	58,4%

Tabla 23: Porcentaje de hélice α y lámina β calculado a partir del espectro FTIR de los lotes de la tercera tanda de producción (AC004 y AC005) almacenados a $+37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

Lote	T0	1 mes	3 meses
AC004 (hélice α)	59,6%	56,6%	47,9%
AC004 (lámina β)	0,6%	3,6%	7,4%
AC005 (hélice α)	59,7%	55,2%	46,6%
AC005 (lámina β)	0,4%	4,3%	8,4%

RA_0299478

Información confidencial/proprietaria
Página 18 de 21

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.





3.2.5 Estructura terciaria de la proteína S

3.2.5.1 Fluorescencia intrínseca

Los resultados de fluorescencia intrínseca de los lotes de la tercera tanda de producción en T0 y después de un almacenamiento de 30 meses a $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ se presentan en la Tabla 24.

Tabla 24: Fluorescencia máxima de emisión (nm) de los lotes de la tercera tanda de producción (AC004, AC005 y AC007) almacenados a $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$

Lote	T0	30 meses
AC004	334 nm	333 nm
AC005	334 nm	334 nm
AC007	334 nm	333 nm

3.2.5.2 Formación de enlaces disulfuro

Se registró la cantidad de tioles libres por proteína S de los lotes de la tercera tanda de producción almacenados a diferentes temperaturas. Los resultados del estudio realizado a $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ se presentan en la Tabla 25 y del estudio realizado a $+37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ se presentan en la Tabla 26.





Tabla 25: Cuantificación de tioles libres por proteína S (con y sin SDS) de los lotes de la tercera tanda de producción almacenados a +5°C ± 3°C

Lote	Período	Tioles libres/proteína S (sin SDS)	Tioles libres/proteína S (con SDS)
AC004	T0	0,41	0,76
	6 meses	0,28	0,54
	12 meses	0,21	0,34
	18 meses	0,22	0,24
	24 meses	0,27	0,28
	30 meses	0,20	0,23
AC005	T0	0,41	0,68
	6 meses	0,27	0,40
	12 meses	0,17	0,26
	18 meses	0,18	0,19
	24 meses	0,21	0,20
	30 meses	0,22	0,20
AC007	T0	0,48	0,76
	6 meses	0,27	0,50
	12 meses	0,33	0,44
	18 meses	0,20	0,28
	24 meses	0,22	0,20
	30 meses	0,22	0,28

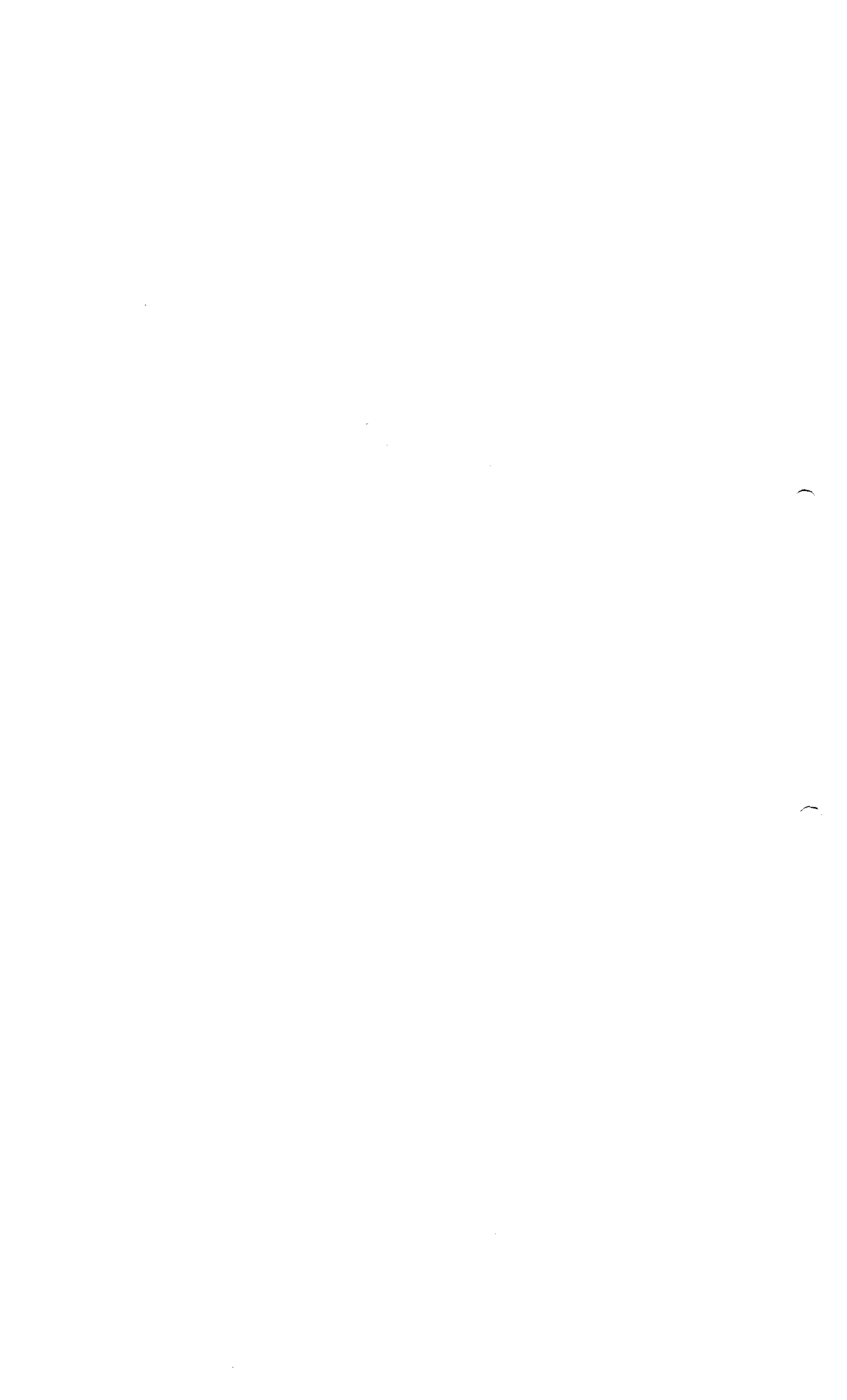




Tabla 26: Cuantificación de tioles libres por proteína S (con y sin SDS) de los lotes de la tercera tanda de producción almacenados a $+37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

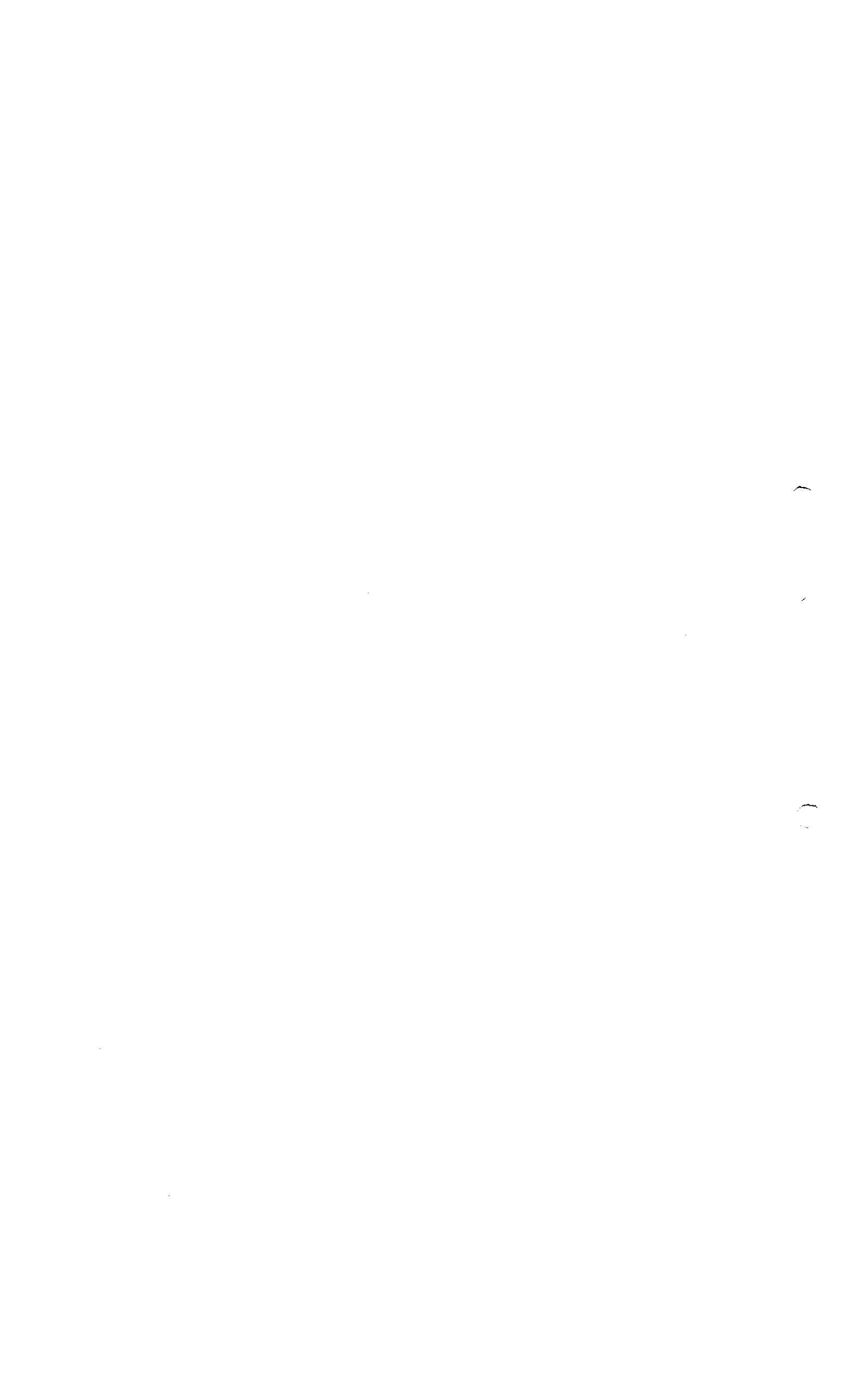
Lote	Período	Tioles libres/proteína S (sin SDS)	Tioles libres/proteína S (con SDS)
AC004	T0	0,41	0,76
	2 meses	0,19	0,20
	4 meses	0,31	0,33
	7 meses	0,43	0,44
AC005	T0	0,41	0,68
	2 meses	0,18	0,17
	4 meses	0,33	0,35
	7 meses	0,41	0,44
AC007	T0	0,48	0,76
	2 meses	0,14	0,16
	4 meses	0,22	0,24
	7 meses	0,39	0,45



Sección 3.2.S.5, Estándares o materiales de referencia

Índice

Lista de tablas	3
1 Estándar de referencia de albúmina de suero bovino.....	4
2 Estándar de referencia para la sacarosa	4
3 Material de referencia para los lípidos.....	5
4 Estándar de referencia interna de HBsAg	5
4.1 Estándar de referencia RA07/00	7
4.1.1 Preparación y uso del estándar de referencia.....	7
4.1.2 Calificación del estándar de referencia.....	7
4.2 Estándar de referencia L039	8
4.2.1 Preparación y uso del estándar de referencia.....	8
4.2.2 Calificación del estándar de referencia.....	9
4.3 Estándar de referencia AA004	9
4.3.1 Preparación y uso del estándar de referencia.....	9
4.3.2 Calificación del estándar de referencia.....	10
4.3.2.1 Calibración	10
4.3.2.2 Caracterización.....	10
4.4 Estándar de referencia AC012	13
4.4.1 Preparación y uso del estándar de referencia.....	13
4.4.2 Calificación del estándar de referencia.....	14
4.4.2.1 Calibración	14
4.4.2.2 Caracterización.....	15
4.5 Estándar de referencia AC079	17
4.5.1 Preparación y uso del estándar de referencia.....	17
4.5.2 Calificación del estándar de referencia.....	18
4.5.2.1 Calibración	18
4.5.2.2 Caracterización.....	18
4.6 Procedimiento para calificar nuevos estándares	21
4.6.1 Calibración de un estándar de referencia.....	21
4.6.2 Caracterización de un estándar de referencia	21





4.6.3 Condiciones de almacenamiento 23

5 Material de referencia marcador de bajo peso molecular.....23

6 Material de referencia para las endotoxinas.....23

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.





Lista de tablas

Tabla 1: Caracterización del lote AA004	12
Tabla 2: Caracterización del lote AC012	16
Tabla 3: Caracterización del lote AC0079	19
Tabla 4: Características de un estándar de referencia	22

