





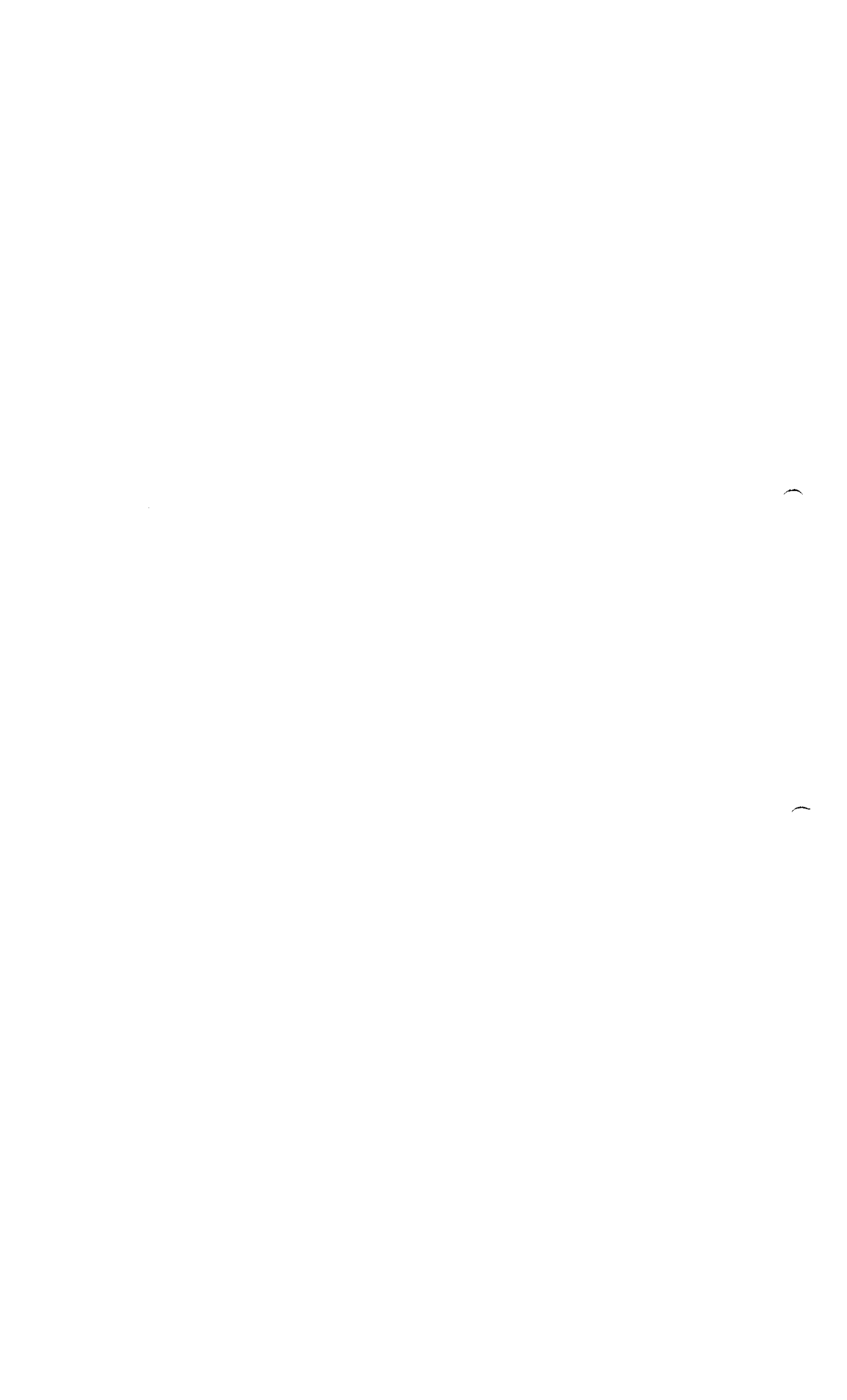
Lista de tablas

Tabla 1: Materiales cuyo origen es una especie animal relevante para la EET utilizados en la elaboración del antígeno de superficie de la hepatitis B 4

Tabla 2: Especificaciones internas para el DOC 5


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
GERENTE
SANOFI PASTEUR S.A.





Lista de abreviaturas: vea la sección 2.3 Resumen general de calidad, introducción.

1 Materiales de origen biológico utilizados en la elaboración del antígeno de superficie de la hepatitis B

1.1 Panorama de la evaluación de seguridad de agentes extraños

La evaluación de seguridad de agentes extraños en relación con los materiales de origen biológico se basa en:

- La selección (incluido el origen) y el control de los reactivos y materiales de inicio;
- Las indicaciones del departamento de Garantía de calidad para dar seguimiento a la calidad del producto;
- Los controles durante el proceso y las pruebas de liberación aplicados durante todo el proceso de producción del principio activo (por ejemplo: pruebas de esterilidad y carga biológica);
- La esterilización de medios de cultivo, tampones y soluciones;
- El diseño del proceso de elaboración del principio activo (por ejemplo, filtraciones).

Los últimos tres puntos se tratan en mayor detalle en la sección 3.2.A.2 Evaluación de seguridad de agentes extraños.

El primero se trata a continuación en relación con los materiales de origen rumiante en el contexto de la encefalopatía espongiforme transmisible (EET).

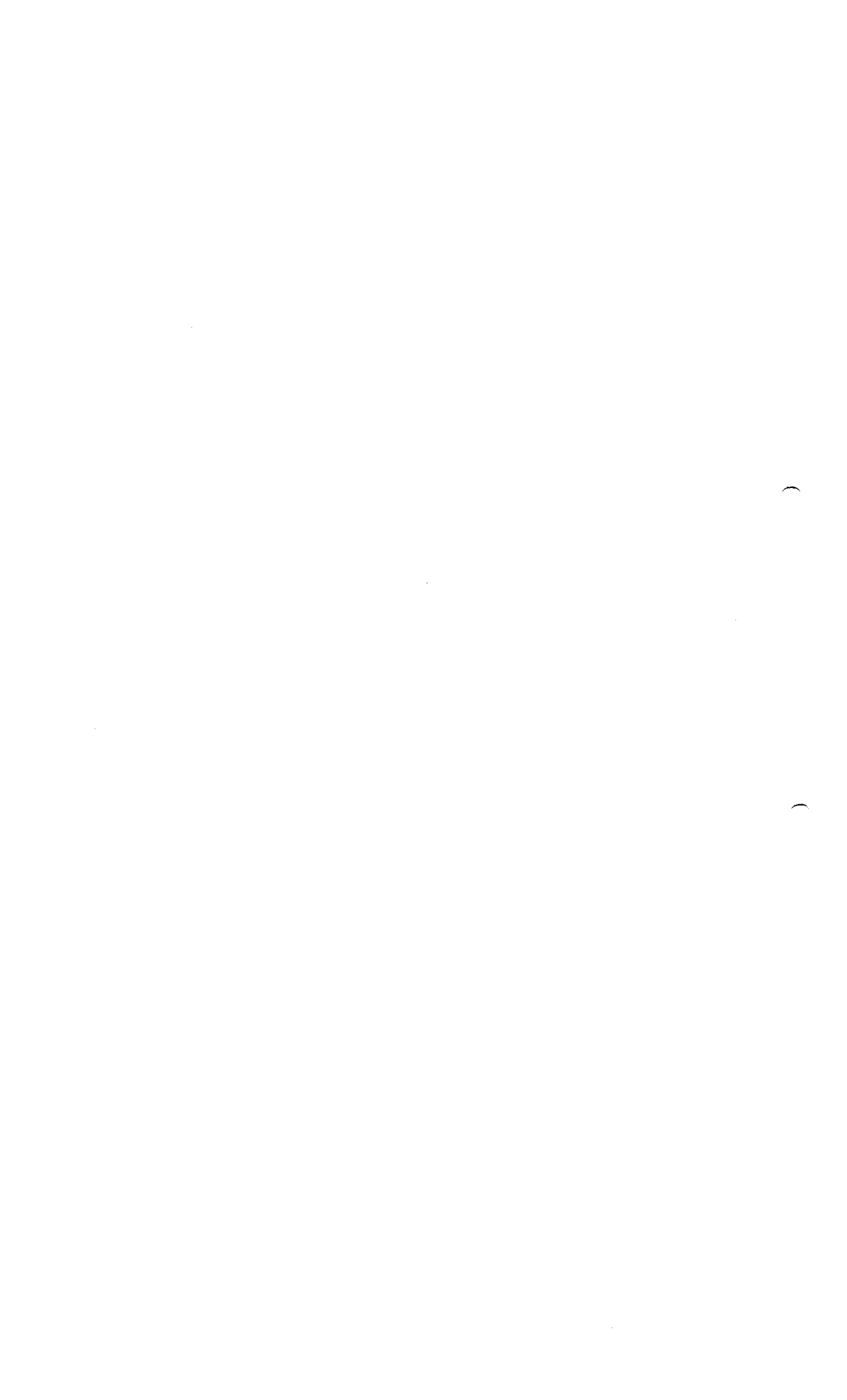
1.2 Materiales de origen biológico

Todos los materiales cuyo origen es una especie animal relevante para la EET (ganado bovino, ovino y caprino) deben cumplir con la Ph. Eur. 1483 y 5.2.8 en cuanto al riesgo de transmisión de la encefalopatía espongiforme animal.

Estos materiales deben provenir de países que no han notificado casos de EET o bien que hayan informado una baja cantidad de casos autóctonos, y que cuenten con una legislación específica establecida que garantice la calidad de la alimentación de los rumiantes y con un servicio veterinario eficaz, capaz de detectar los casos de EET. El origen forma parte de las especificaciones de liberación.

La Dirección Europea para la Calidad de Medicamentos (EDQM) certifica que los materiales cuyo origen es una especie animal relevante para la EET (que no sean leche ni derivados lácteos) son adecuados para utilizarse en un proceso de elaboración de productos medicinales mediante la entrega de un Certificado de Idoneidad (COS).

Durante el proceso de elaboración del HBsAg, se utiliza sólo un material de origen biológico; vea la Tabla 1.



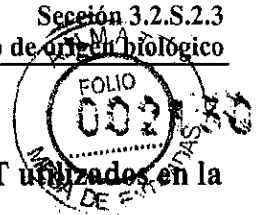


Tabla 1: Materiales cuyo origen es una especie animal relevante para la EET utilizados en la elaboración del antígeno de superficie de la hepatitis B

| Materiales | Certificado de idoneidad | Especie y tejidos de los cuales se obtiene el material | Categoría de infectividad | País de origen de los animales fuente | Medio/reactivo que los contiene | Paso de elaboración |
|-----------------------------|-------------------------------|--|---------------------------|--|---------------------------------|-------------------------|
| Desoxicolato de sodio (DOC) | R1-CEP 2000-335- Rev 01 | Bilis bovina | C | Argentina, Australia, Brasil, Canadá, Colombia, Costa Rica, Paraguay, Uruguay, Venezuela, EE.UU., México, Sudáfrica, India. | Tampón de desorción | Etapa 1.8: Desorción |

1.3 Control del material cuyo origen es una especie animal relevante para la EET

La especificación interna (pruebas y criterios de aceptación) para el material de origen biológico utilizado en la elaboración del antígeno de superficie de la hepatitis B se presenta a continuación.

1.3.1 Desoxicolato de sodio (DOC)

Las especificaciones internas para el desoxicolato de sodio (DOC) se presentan en la Tabla 2.



Tabla 2: Especificaciones internas para el DOC


| Prueba | Criterios de aceptación |
|--|--|
| Aspecto | Polvo de color blanco a ligeramente beige |
| Solubilidad en agua | Soluble |
| Solubilidad en alcohol | Soluble |
| Color de la solución (1 g en 10 ml de agua) | Incoloro a levemente amarillo |
| Formación abundante de espuma al agitarse con agua (1 g en 30 ml de agua) | Positiva |
| Identificación: - Reacción de sodio - Espectrofotometría de absorción infrarroja | Positiva Conforme al espectro de referencia |
| Materia insoluble | Máximo 0,2% |
| pH (5% p/v en agua) | 7,2 - 9,5 |
| Pérdida en el secado (100°C - 105°C; peso constante) | Máximo 6,0% |
| Rotación óptica (20/D) (2% p/v en agua) | +42,0° a +46,0° |
| Sodio (absorción atómica) | Aproximadamente 5,5% |
| Ensayo | Mínimo 98,0%, expresado como desoxicolato de sodio, calculado en la sustancia seca |
| Origen (bovino) - Cumple con la Ph. Eur. 1483 y la Ph. Eur. 5.2.8 según la revisión de la documentación del proveedor y la versión actual del COS | Aprobado |




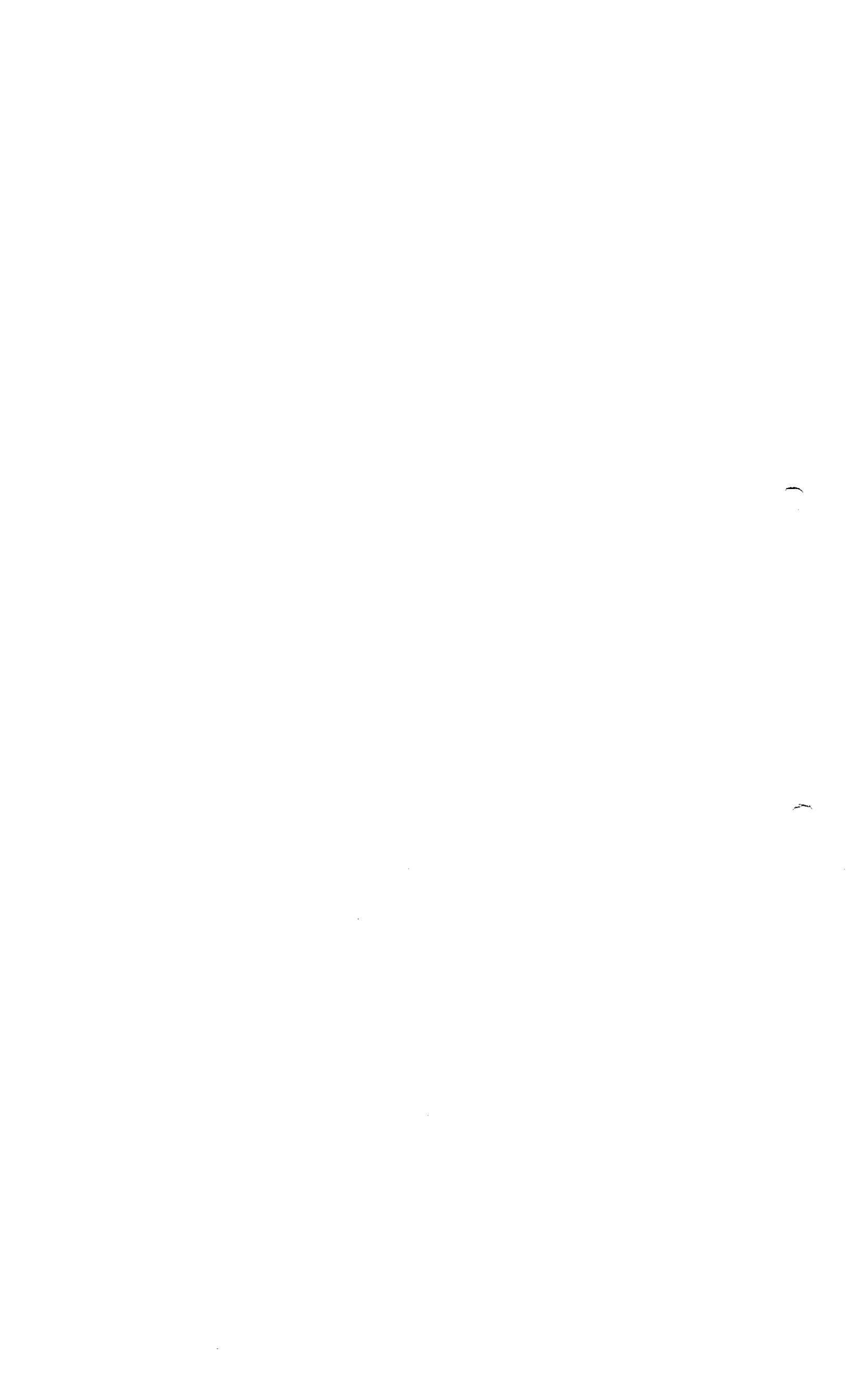


3.2.S.2.3

Sistema de Lotes de Siembra, Caracterización y Pruebas - HBsAg


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
ASOCIADO
SANOFI PASTEUR S.A.



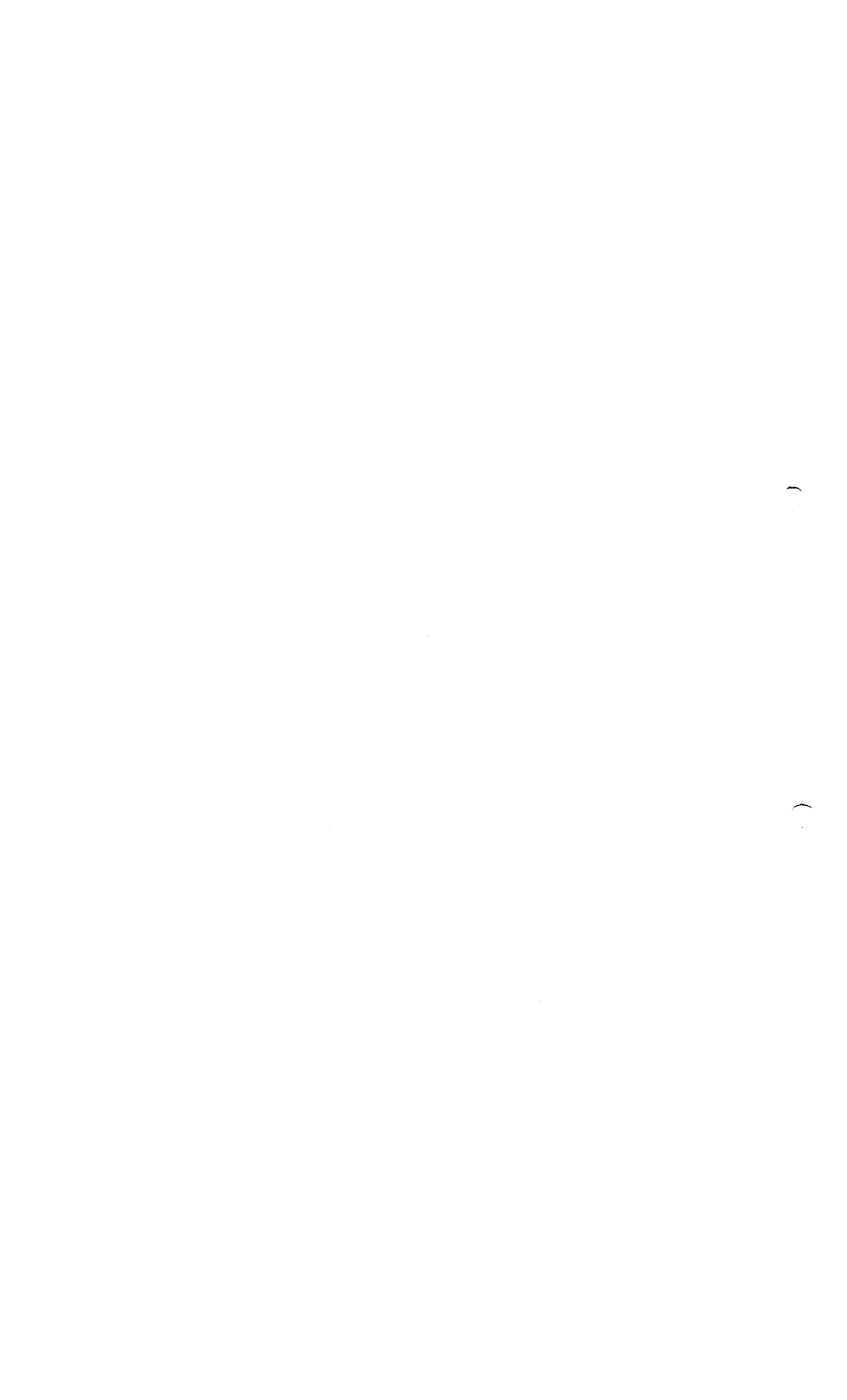


Sección 3.2.S.2.3 - Control de los materiales

Sistema de lotes de siembra, caracterización y pruebas

Índice

| | |
|---|-----------|
| Lista de tablas | 4 |
| Lista de figuras | 5 |
| 1 Fuente, historia y generación de los sustratos celulares | 6 |
| 1.1 Descripción general de la línea celular | 6 |
| 1.2 Historia de la línea celular | 6 |
| 1.2.1 Fundamento de la selección..... | 6 |
| 1.2.1.1 Origen de las células | 6 |
| 1.2.1.2 Fecha y condiciones de recepción..... | 6 |
| 1.2.1.3 Inserción del gen y fuentes de vectores plásmidos | 7 |
| 1.2.2 Derivación, manipulación genética, pasaje e historia del cultivo..... | 12 |
| 1.2.2.1 Transformación | 12 |
| 1.2.2.2 Selección y estabilización de los transformantes | 12 |
| 1.2.2.3 Preselección..... | 12 |
| 1.2.2.4 Preparación de la cepa recombinante K3/8-1 (solución madre en glicerol) | 13 |
| 1.2.2.5 Preparación del lote de siembra premaestro..... | 13 |
| 1.2.2.6 Mediciones fisiológicas de la expresión del HBsAg..... | 13 |
| 1.2.3 Pruebas realizadas con el lote pre-MSL | 14 |
| 1.3 Estabilidad de la cepa recombinante K3/8-1 | 14 |
| 1.3.1 Estabilidad genómica..... | 14 |
| 1.3.1.1 Estabilidad de la estructura integrada | 15 |
| 1.3.1.2 Estabilidad del número de copias..... | 17 |
| 1.3.1.3 Estabilidad del vector de expresión durante una corrida de fermentación..... | 19 |
| 1.3.2 Resultados generales | 20 |
| 1.3.3 Estabilidad fenotípica: expresión de Ag después de 100 generaciones..... | 21 |
| 2 Panorama del sistema de lotes de siembra..... | 24 |
| 2.1 Sistema de lotes de siembra | 24 |

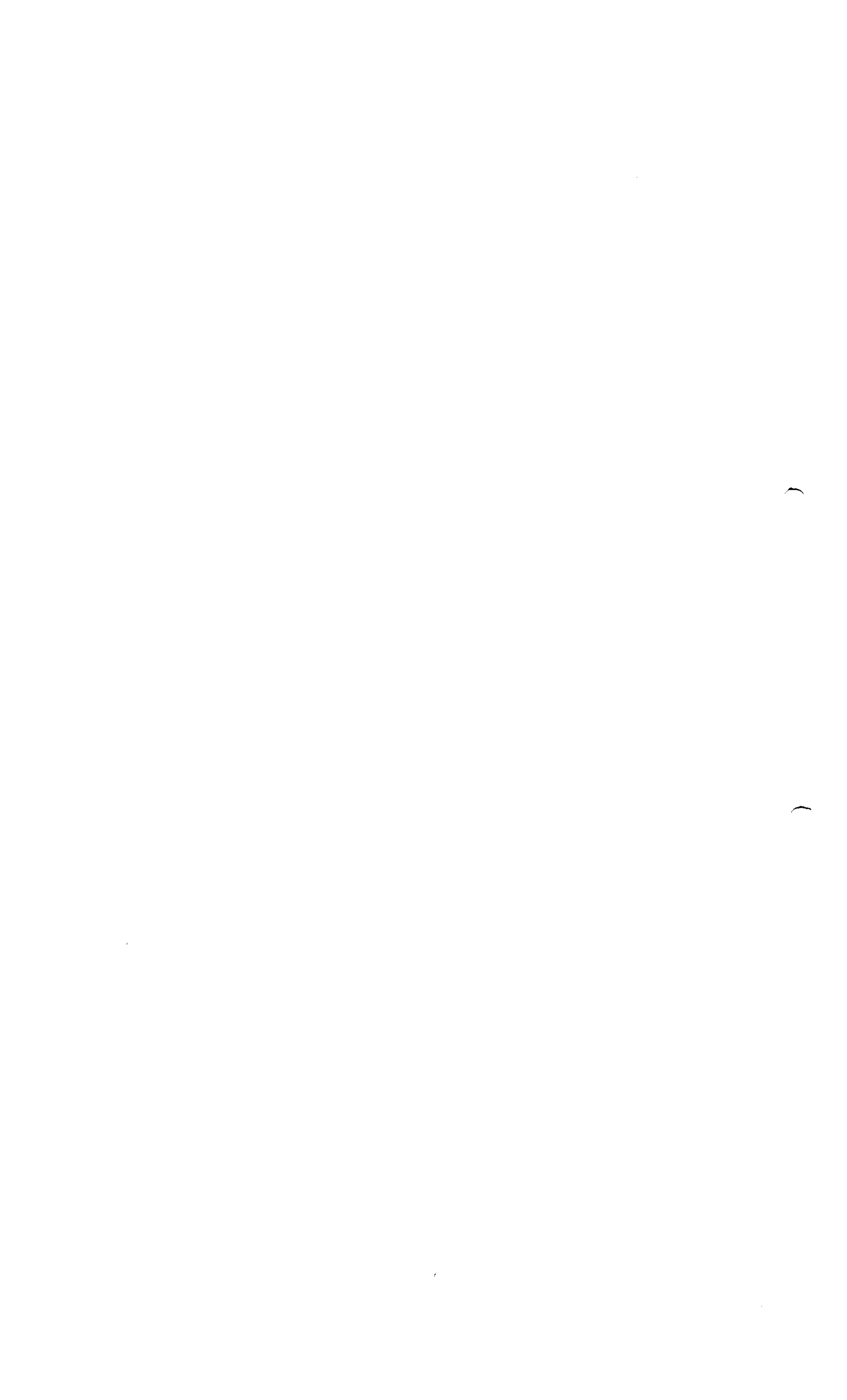




| | | |
|----------|--|-----------|
| 3 | Preparación del lote de siembra maestro | 26 |
| 3.1 | Medios de crecimiento y reactivos | 26 |
| 3.2 | Producción de lotes de siembra maestros | 27 |
| 4 | Preparación de los lotes de siembra de trabajo | 28 |
| 5 | Pruebas de control de calidad de los lotes de siembra | 29 |
| 5.1 | Pruebas de control de calidad | 29 |
| 5.1.1 | Pureza | 29 |
| 5.1.1.1 | Ausencia de contaminantes bacterianos | 30 |
| 5.1.1.2 | Ausencia de contaminación de levaduras y hongos | 33 |
| 5.1.2 | Pruebas de identidad | 35 |
| 5.1.3 | Prueba de viabilidad | 37 |
| 5.2 | Análisis de lote de los lotes de siembra maestros y de trabajo de <i>Hansenula polymorpha</i> | 38 |
| 6 | Caracterización de los lotes de siembra (MSL y WSL) | 39 |
| 6.1 | Caracterización fenotípica | 40 |
| 6.1.1 | Características morfológicas..... | 40 |
| 6.1.2 | Detección del antígeno de superficie de hepatitis B expresado por la <i>H. polymorpha</i> | 40 |
| 6.2 | Caracterización genotípica..... | 42 |
| 6.2.1 | Integridad del gen e integración del plásmido en el genoma de ADN de <i>H. polymorpha</i> | 42 |
| 6.2.2 | Estimación de las copias del plásmido | 46 |
| 6.2.3 | Porcentaje de integración del gen de HBsAg | 50 |
| 6.2.4 | Determinación de la secuencia de regulación del gen del HBsAg integrado en el genoma de <i>H. polymorpha</i> | 52 |
| 6.2.5 | Determinación de la secuencia de ADNc del gen | 59 |
| 6.2.6 | Determinación del lugar de inserción del plásmido pFPMTsadw2 en el genoma de <i>H. polymorpha</i> | 63 |
| 6.3 | Conclusión general de las pruebas de caracterización | 67 |
| 7 | Estabilidad de los lotes de siembra de <i>Hansenula polymorpha</i> | 68 |
| 7.1 | Objetivo del estudio | 68 |
| 7.2 | Lotes utilizados en el estudio | 68 |
| 7.3 | Diseño del estudio..... | 68 |
| 7.4 | Parámetros estudiados y criterios de aceptación..... | 68 |
| 7.5 | Resultados y discusión..... | 69 |
| 7.6 | Conclusión | 69 |

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
INGENIERO
SANOFI PASTEUR S.A.





| | | |
|-----|---|----|
| 8 | Protección contra eventos catastróficos | 72 |
| 8.1 | Procedimientos de protección..... | 72 |
| 8.2 | Lugares de almacenamiento..... | 72 |
| 9 | Métodos para prevenir la contaminación y la contaminación cruzada | 72 |
| 10 | Tasa de utilización esperada..... | 72 |





Lista de tablas

Tabla 1: Pruebas realizadas con el lote pre-MSL K3/8-1 ADW001/12/94.....14

Tabla 2: Resumen de las distintas características del lote EC005.....22

Tabla 3: Cantidad de ampollas de lotes de siembra maestro y viales de lotes de siembra de trabajo25

Tabla 4: Componentes de los medios de crecimiento de las siembras maestras.....27

Tabla 5: Especificación de los lotes MSL y WSL.....29

Tabla 6: Controles realizados durante el ensayo30

Tabla 7: Crecimiento esperado en los distintos medios32

Tabla 8: Controles realizados durante el ensayo y resultados esperados33

Tabla 9: Controles realizados durante el ensayo (PARTE A).....34

Tabla 10: Controles realizados durante el análisis (PARTE B)34

Tabla 11: Resultados de crecimiento celular de algunas ampollas del lote MSL n.º MCB 160600BA35

Tabla 12: Resultados de crecimiento celular de algunos viales del lote WSL n.º MWCB 230600BA35

Tabla 13: Datos de control de calidad referidos a los lotes MSL y WSL de *Hansenula polymorpha*38

Tabla 14: Pruebas de caracterización realizadas con los lotes de siembra.....39

Tabla 15: Estimación de la cantidad de copias de plásmido presentes en el ADN genómico de *H. polymorpha* del lote MSL n.º MCB 160600BA49

Tabla 16: Estimación de la cantidad de copias de plásmido presentes en el ADN genómico de *H. polymorpha* del lote WSL n.º MWCB 230600BA49


Tabla 17: Lotes utilizados en el estudio de estabilidad68


Tabla 18: Diseño del estudio de estabilidad68

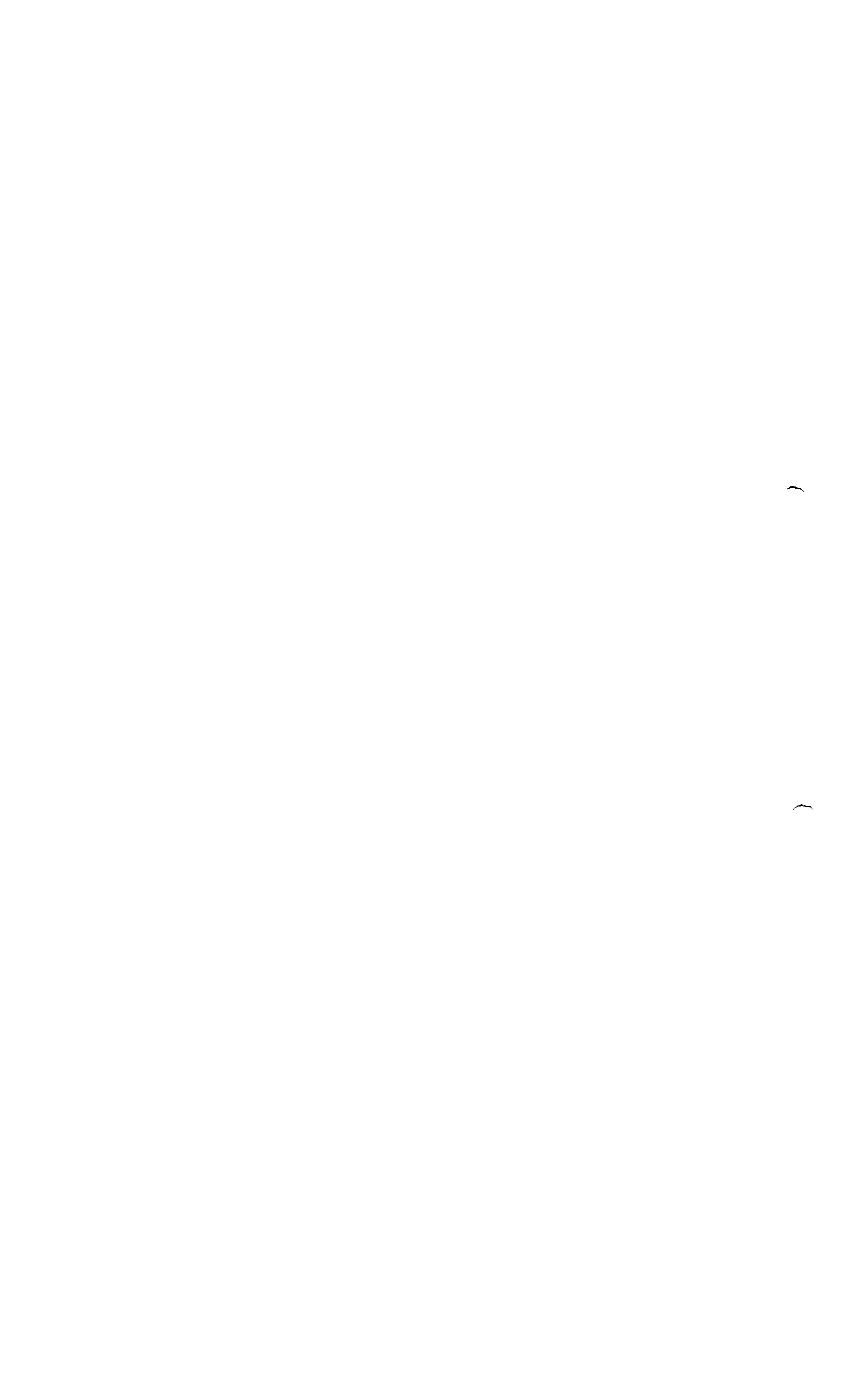
Tabla 19: Especificación del estudio de estabilidad.....69

Tabla 20: Resultados de las pruebas de estabilidad del almacenamiento a $\leq -70^{\circ}\text{C}$ del lote MSL n.º MCB 160600BA70

Tabla 21: Resultados de las pruebas de estabilidad del almacenamiento a $\leq -70^{\circ}\text{C}$ del lote WSL n.º MWCB 230600BA.....71


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

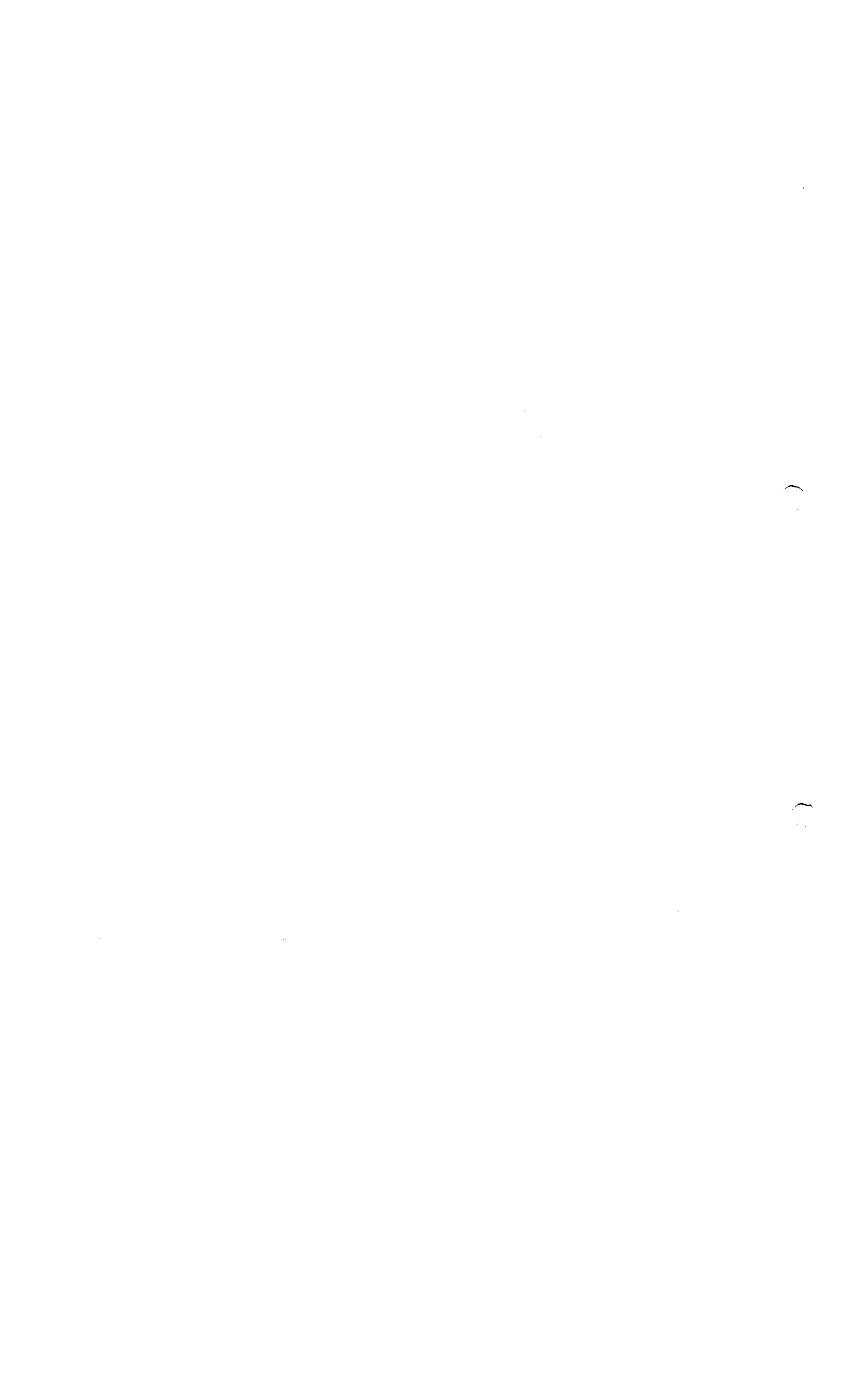

CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
GERENTE
SANOFI PASTEUR S.A.

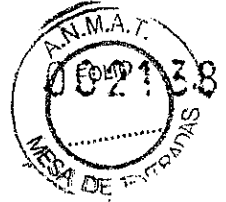




Lista de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1: Mapa del vector plásmido pFPMTsadw2 | 8 |
| Figura 2: Secuencia de los sitios de fusión entre el gen del HBsAg y la FMDH..... | 9 |
| Figura 3: Secuencia de ADN del gen del HBsAg y secuencia de aminoácidos deducida | 10 |
| Figura 4: Estabilidad del vector de expresión integrado durante la prueba de 400 generaciones...15 | |
| Figura 5: Determinación de la cantidad de copias durante la prueba de 400 generaciones | 18 |
| Figura 6: Análisis Southern blot que muestra estabilidad durante una corrida de fermentación20 | |
| Figura 7: Sistema de lotes de siembra de <i>Hansenula polymorpha</i> | 24 |
| Figura 8: Preparación del lote de siembra maestro | 26 |
| Figura 9: Preparación de los lotes de siembra de trabajo | 28 |
| Figura 10: Análisis Western Blot de los extractos de proteína de diversos cultivos de <i>H. polymorpha</i> | 41 |
| Figura 11: Análisis Southern blot del ADN genómico de <i>H. polymorpha</i> , lote MSL MCB 160600BA | 43 |
| Figura 12: Análisis Southern blot del ADN genómico de <i>H. polymorpha</i> , lote WSL MWCB 230600BA | 45 |
| Figura 13: Estimación de la cantidad de copias del plásmido mediante Dot Blot, lote MSL n.º MCB 160600BA | 47 |
| Figura 14: Determinación del porcentaje de población de levadura del lote de siembra de trabajo que contiene el plásmido pFPMTsaw2 en el genoma | 51 |
| Figura 15: Determinación del porcentaje de población de levadura del lote de siembra maestro que contiene el plásmido pFPMTsaw2 en el genoma..... | 52 |
| Figura 16: Secuencia de la región promotora del lote de siembra maestro..... | 54 |
| Figura 17: Secuencia de la región terminadora del lote de siembra maestro | 57 |
| Figura 18: Comparación de la secuencia de ADNc del gen del HBsAg insertado en la levadura del MSL y el gen del HBsAg del plásmido pFPMTsadw2 | 60 |
| Figura 19: Southern Blot del ADN genómico de <i>H. polymorpha</i> | 64 |
| Figura 20: Integración del plásmido en el genoma de <i>H. polymorpha</i> | 66 |
| Figura 21: Secuencia del ADN genómico de <i>H. polymorpha</i> que incluye el sitio de inserción del plásmido pFPMTsadw2..... | 67 |





Lista de abreviaturas: vea la sección 2.3 Resumen general de calidad, introducción.

1 Fuente, historia y generación de los sustratos celulares

1.1 Descripción general de la línea celular

El sustrato celular se estableció de acuerdo con la Nota guía sobre la producción y el control de calidad de los productos medicinales derivados mediante tecnología de ADN recombinante (3AB1a).

La *Hansenula polymorpha* es una especie de levadura de presencia generalizada en el suelo, el agua y sobre las frutas. No es patógena para los animales ni los seres humanos, no produce toxinas, no está sujeta a infecciones por virus y se considera segura para manipulaciones genéticas.

1.2 Historia de la línea celular

1.2.1 Fundamento de la selección

1.2.1.1 Origen de las células

Esta cepa ya se ha aplicado en la construcción de varias cepas recombinantes industriales. Se observó una muy elevada productividad y facilidad de aumento de escala en todas las cepas obtenidas hasta la fecha. *H. polymorpha*, que se utiliza como huésped para la expresión de genes heterólogos, es una levadura de presencia generalizada que comparte la fisiología característica del tipo de levadura con la levadura de panadería *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* y otras levaduras industriales. Una característica distintiva de *H. polymorpha* es que puede crecer con metanol como única fuente de energía y carbono. Su crecimiento en metanol o los denominados azúcares no represibles da por resultado la inducción de enzimas clave del metabolismo del metanol, a saber: **MOX** (metanol oxidasa), **DHAS** (dihidroxiacetona sintasa) y **FMDH** (formato deshidrogenasa). Estas enzimas pueden constituir hasta un 30-40% de la proteína celular total.

Una versión mutante auxótrofa del gen URA3 de *Hansenula polymorpha* (cepa RB11 deficiente en orotidina-5'-fosfato descarboxilasa) sirve de célula huésped para expresar el gen del HBsAg.

El gen del HBsAg se inserta entre el promotor FMDH y el terminador MOX para inducir la expresión de HBsAg en presencia de metanol. Vea la Figura 2.

1.2.1.2 Fecha y condiciones de recepción

La cepa de *Hansenula polymorpha* RB11 fue elegida por Rhein Americana (= Rhein Biotech) en 1990 luego de un exhaustivo estudio sobre la seguridad ecológica de los organismos



recombinantes iniciado bajo la supervisión de un Comité Asesor en el cual participaron integrantes del Comité Central Alemán de Seguridad Biológica, el Ministerio de Ciencia Técnica y varios científicos destacados de universidades y empresas.

La cepa de *Hansenula polymorpha* se elaboró sobre la base de las recomendaciones de la Ph. Eur. (monografía 1056) y fue elegida como modelo bien conocido de uso común por Rhein Americana (posteriormente adquirida por sanofi pasteur).

1.2.1.3 Inserción del gen y fuentes de vectores plásmidos

El vector de expresión de HBsAg se construye insertando el fragmento EcoRI/BamHI que codifica el HBsAg (subtipo adw2) en el sitio de clonación múltiple del vector de expresión pFPMT121 de *H. polymorpha*, basado en un marcador de selección de URA3 y el promotor FMDH. El extremo 5' del gen de HBsAg se fusiona con el promotor FMDH y el extremo 3' con el terminador MOX. Las secuencias de los sitios de fusión se muestran por separado en la Figura 2. El vector de expresión resultante se denomina pFPMTsadw₂. En la Figura 1 se presenta su mapa físico. La clonación del promotor FMDH se describe en la Especificación de Patente Europea 0299 108 B. Esta construcción permite una expresión eficiente del HBsAg en la levadura *Hansenula polymorpha*.

El vector de expresión del HBsAg

El vector de expresión utilizado para expresar el gen del HBsAg está basado en el plásmido pBR322 y contiene los siguientes elementos:

- Esqueleto de pBR322 de *E. coli* estándar, que incluye el origen de la multiplicación de *E. coli* (ori);
- Gen de resistencia a la ampicilina para la selección en *E. coli*;
- Gen marcador selectivo auxótrofo que complementa la deficiencia auxótrofa del huésped (gen URA3);
- Secuencia de multiplicación autónoma de *H. polymorpha* (HARS);
- Un casete de expresión que contiene el promotor FMDH (1200 bp) y el terminador MOX (alrededor de 300 bp) para la inserción de los genes extraños.

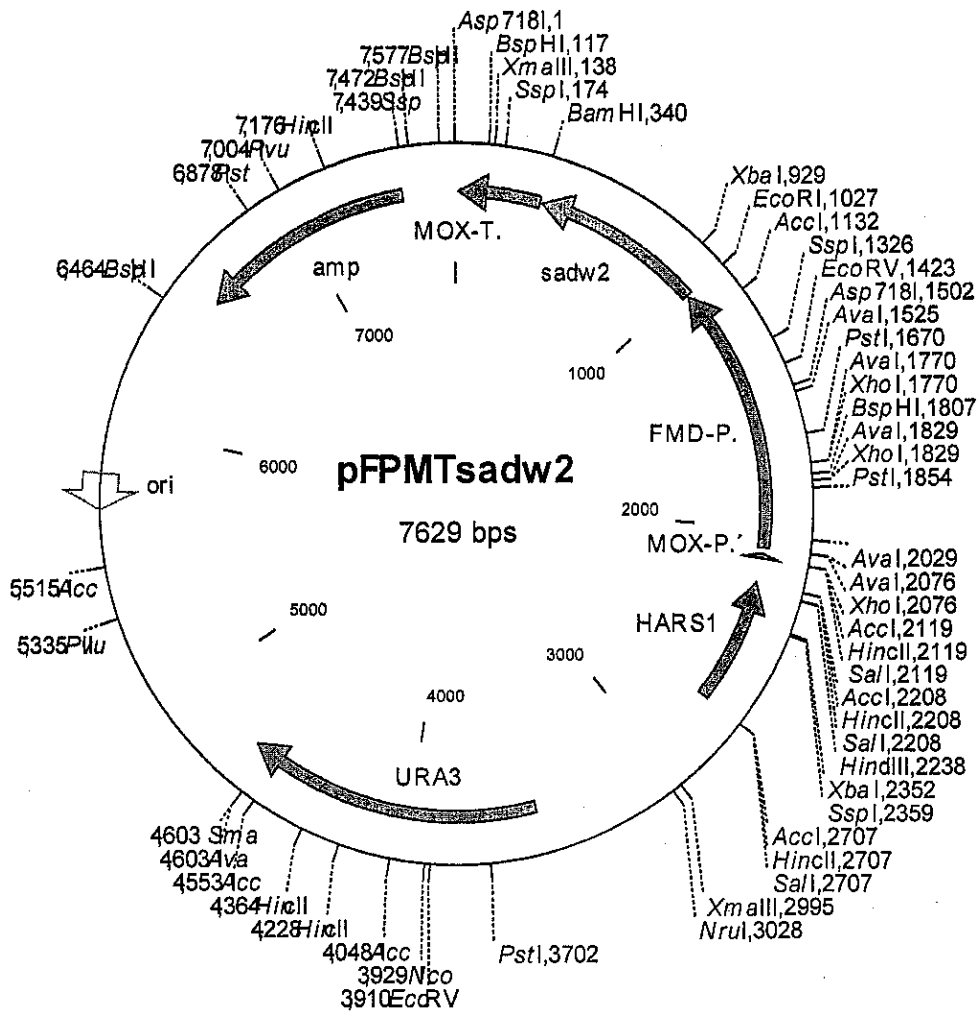
Los vectores se integran en el genoma huésped de *Hansenula polymorpha* bajo la forma de estructuras multiméricas cabeza - cola.

1

2



Figura 1: Mapa del vector plásmido pFPMTsadw2



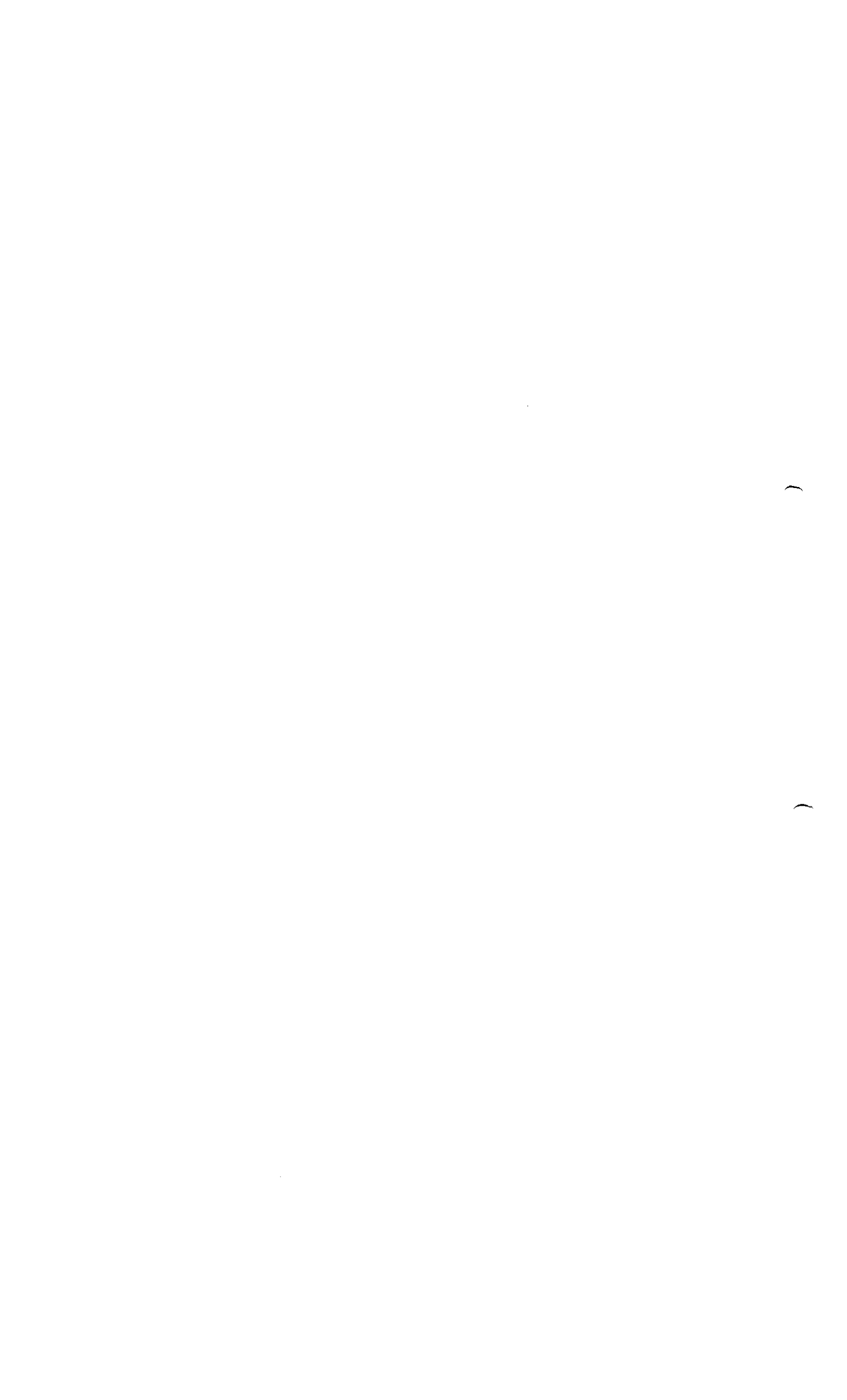




Figura 2: Secuencia de los sitios de fusión entre el gen del HBsAg y la FMDH

Fusión promotor FMDH/gen del HBsAg:

TT CAT CGG GAA TTC ATG GAG AAC
Promotor FMDH | EcoRI | Gen del HBsAg

Fusión gen del HBsAg/terminador MOX:

TAC ATT TAA GGA TCC CCC TCG CGG AC
Gen del HBsAg | BamHI | Terminador MOX

El gen del HBsAg

La codificación genética del HBsAg se aísla a partir del suero de un paciente con una infección crónica por el virus de la hepatitis B mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y se inserta por medio del fragmento EcoRI/BamHI en el vector plásmido. La codificación genética del HBsAg contiene alrededor de 678 bp y el HBsAg es un antígeno de 226 aminoácidos del subtipo adw₂ (S adw₂).

La secuenciación N-terminal del HBsAg purificado elaborado en *H. polymorpha* reveló la identidad de los 19 aminoácidos N-terminales en la proteína con la secuencia de aminoácidos deducida. Vea la Figura 3.

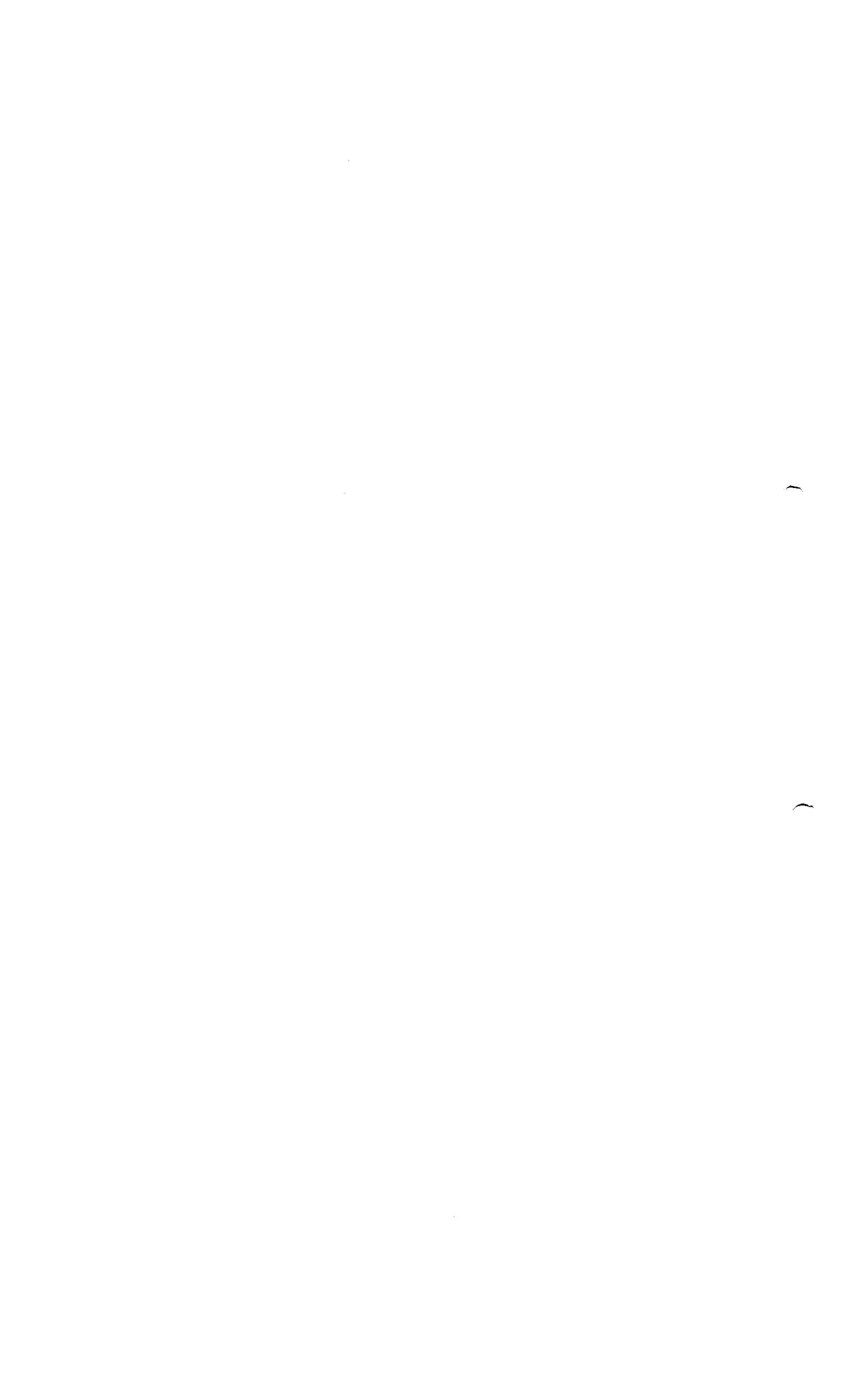




Figura 3: Secuencia de ADN del gen del HBsAg y secuencia de aminoácidos deducida

30 60
ATG GAG AAC ATC ACA TCA GGA TTC CTA GGA CCC CTG CTC GTG TTA CAG GCG GGG TTT TTC
Met Glu Asn Ile Thr Ser Gly Phe Leu Gly Pro Leu Leu Val Leu Gln Ala Gly Phe Phe

90 120
TTG TTG ACA AGA ATC CTC ACA ATA CCG CAG AGT CTA GAC TCG TGG TGG ACT TCT CTC AAT
Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn

150 180
TTT CTA GGG GGA TCA CCC GTG TGT CTT GGC CAA AAT TCG CAG TCC CCA ACC TCC AAT CAC
Phe Leu Gly Gly Ser Pro Val Cys Leu Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser Asn His

210 240
TCA CCA ACC TCC TGT CCT CCA ATT TGT CCT GGT TAT CGC TGG ATG TGT CTG CGG CGT TTT
Ser Pro Thr Ser Cys Pro Pro Ile Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe

270 300
ATC ATA TTC CTC TTC ATC CTG CTG CTA TGC CTC ATC TTC TTA TTG GTT CTT CTG GAT TAT
Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu Leu Val Leu Leu Asp Tyr

330 360
CAA GGT ATG TTG CCC GTT TGT CCT CTA ATT CCA GGA TCA ACA ACA ACC AGT ACG GGA CCA
Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Thr Thr Thr Ser Thr Gly Pro

390 420
TGC AAA ACC TGC ACG ACT CCT GCT CAA GGC AAC TCT ATG TTT CCC TCA TGT TGC TGT ACA
Cys Lys Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Asn Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr

450 480
AAA CCT ACG GAT GGA AAT TGC ACC TGT ATT CCC ATC CCA TCG TCC TGG GCT TTC GCA AAA
Lys Pro Thr Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Lys

510 540
TAC CTA TGG GAG TGG GCC TCA GTC CGT TTC TCT TGG CTC AGT TTA CTA GTG CCA TTT GTT
Tyr Leu Trp Glu Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val

ROXANA MONTEMILONE DIRECTORA TÉCNICA SANOFI PASTEUR S.A.
CHRISTIAN DOMÍNGUEZ GERENTE SANOFI PASTEUR S.A.

