



6 Caracterización de los lotes de siembra (MSL y WSL)

Se llevó a cabo un estudio de caracterización completo con el lote MSL 160600 BA y el primer lote WSL 230600 BA elaborado a partir de ese MSL. La Tabla 14 presenta las pruebas de caracterización realizadas con estos lotes de siembra.

La estabilidad genómica de la cepa recombinante K3/8-1 original se estudió durante su crecimiento en medio no selectivo a lo largo de 400 generaciones; vea el estudio que se presenta en el capítulo 1. De acuerdo con la conclusión de ese estudio, los lotes MSL y WSL generados a partir de la cepa K3/8-1 (separadas de ella por menos de 400 generaciones) también presentan estabilidad genómica.

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

Caracterización	Pruebas	MSL 160600 BA	WSL 230600 BA
Caracterización fenotípica	Caracterización morfológica	X*	X
	Detección del HBsAg expresado	X	X
Caracterización genotípica	Integridad del gen e integración del plásmido	X	X
	Estimación de las copias del plásmido	X	X
	Porcentaje de integración del gen de HBsAg	X	X
	Determinación de la región de regulación del HBsAg	X	X
	Determinación de la secuencia de ADNc del gen	X	X
	Determinación del lugar de inserción del plásmido	X	N†

* Prueba realizada

† Prueba no realizada





6.1 Caracterización fenotípica

6.1.1 Características morfológicas

Las colonias de *H. polymorpha* son blancas, cremosas y de bordes suaves, tal como se ven en una observación macroscópica en TSA e YNB al 2%/medio de glucosa. En la observación microscópica, se ven circulares, refringentes y en algunas se observa una división, que presenta lobulación.

Las observaciones macro y microscópicas realizadas en los lotes MSL MCB 160600BA y WSL MWCB 230600BA cumplen con la descripción anterior.

6.1.2 Detección del antígeno de superficie de hepatitis B expresado por la *H. polymorpha*

Finalidad/principio

La finalidad de esta prueba consiste en identificar el HBsAg expresado por *H. polymorpha* en cultivos derivados de los lotes MSL y WSL.

El principio de esta prueba se centra en caracterizar el tamaño del HBsAg mediante un análisis Western blot y demostrar que los lotes de siembra sobreproducen HBsAg luego de la inducción.

Método

Se cultivan cinco ampollas distintas del MSL (lote MCB 160600BA) y 5 viales distintos del WSL (lote MWCB 230600BA) en medio líquido YNB/glicerol al 1% a +37°C durante 48 h. Luego, las células se transfieren a un medio YNB/metanol al 1% a fin de inducir la expresión del HBsAg. Después de 16 h de cultivo a +37°C, las células se fragmentan, se centrifugan y el sobrenadante se analiza mediante Western blot. Se realiza un control negativo utilizando un cultivo equivalente sin metanol con glucosa y otro con glicerol (en estas condiciones no se produce la expresión del HBsAg).

Los extractos de proteína de los cultivos y un control interno de HBsAg se separan mediante electroforesis en gel acrilamida, según su peso. Luego se transfieren a una membrana de nitrocelulosa y se detectan con anticuerpos específicos.

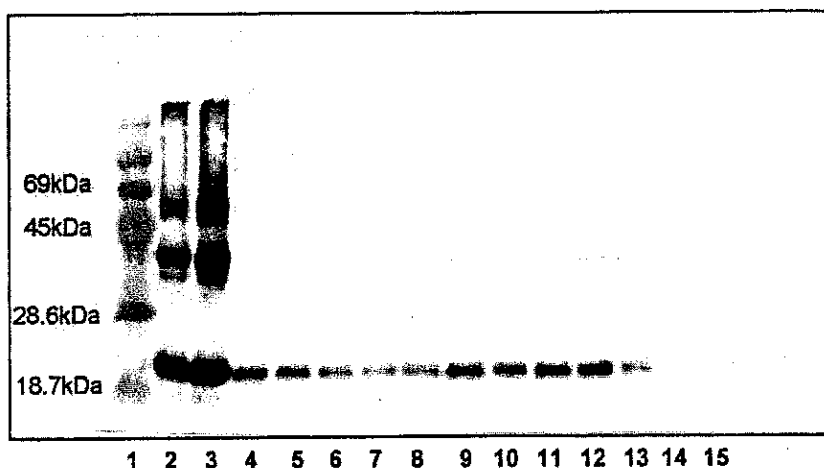
El marcador de peso molecular permite determinar el peso molecular de los extractos de proteína.





Resultados

Figura 10: Análisis Western Blot de los extractos de proteína de diversos cultivos de *H. polymorpha*



Banda 1: Marcador de peso molecular

Bandas 2 y 3: Control interno de HBsAg (HBsAg 4 µg y 8 µg)

Este control interno de HBsAg (lote RA007/00) utilizado es un estándar de HBsAg utilizado y producido por Rhein Americana S.A.

Bandas 4 a 8: extracto de proteína de los cultivos de MSL de *H. polymorpha* inducido por metanol

Bandas 9 a 13: extracto de proteína de los cultivos de WSL de *H. polymorpha* inducido por metanol

Banda 14: Control negativo: extracto de proteína de los cultivos de *H. polymorpha* sin inducción (con glucosa)

Banda 15: Control negativo: extracto de proteína de los cultivos de *H. polymorpha* sin inducción (con glicerol)

Se observa una banda de 23 a 24 kDa para todos los extractos inducidos por metanol que comigran con el control interno de HBsAg. Esta banda no se detecta en los extractos de cultivos desarrollados con glucosa y sólo ligeramente en los extractos de cultivos desarrollados con glicerol. En las bandas del control interno de HBsAg (2 y 3), se observan bandas de mayor peso molecular. Estas corresponden a los dímeros y multímeros del HBsAg. Estos compuestos también se observan en menor proporción en las bandas de los extractos celulares inducidos (bandas 9 a 12).

El peso molecular del HBsAg producido por los cultivos de MSL y WSL es el esperado, conforme a la cantidad de aminoácidos que constituyen la proteína (226 aminoácidos = aproximadamente 23 kDa) y corresponden al peso molecular del control interno de HBsAg.





6.2 Caracterización genotípica

6.2.1 Integridad del gen e integración del plásmido en el genoma de ADN de *H. polymorpha*

Finalidad/principio

La finalidad de esta prueba consiste en caracterizar la integración del plásmido pFPMTsadw2 en el genoma de *H. polymorpha* y la integridad del gen que codifica el HBsAg.

El principio de esta prueba se centra en una caracterización del gen mediante Southern blot, gracias a la digestión de enzimas de restricción.

El mapa del plásmido se presenta en el capítulo 1.

Método

Esta prueba se llevó a cabo con 3 ampollas distintas del lote MSL (lote MCB 160600BA) y 2 viales distintos del lote WSL (lote MWCB 230600BA).

Se cultivan colonias de *H. polymorpha* a aproximadamente +37°C en medio YPD/glucosa al 2%. El ácido desoxirribonucleico (ADN) genómico se purifica a partir de las células obtenidas (fragmentación celular y extracción del ADN con fenol/cloroformo) y se cuantifica.

El genoma de ADN purificado de *H. polymorpha* se digiere a aproximadamente +37°C con 3 enzimas de restricción apropiadas: KpnI, BamHI y EcoRI (y una cuarta enzima de restricción, XbaI, sólo para el WSL). Los fragmentos obtenidos se utilizan directamente para el estudio Southern blot.

Control positivo: el ADN del plásmido pFPMTsadw2 se digiere a aproximadamente +37°C con 3 enzimas de restricción adecuadas: KpnI, BamHI y EcoRI (y una cuarta enzima de restricción, XbaI, sólo para el WSL). Los fragmentos obtenidos se utilizan directamente para el estudio Southern blot.

Los fragmentos obtenidos se separan mediante electroforesis en gel de agarosa y luego se transfieren a una membrana de nitrocelulosa.

Por último, se analizan con un estudio Southern blot, utilizando una sonda radioactiva específica del gen del HBsAg.

Esta sonda se produce partiendo del método de "cebado aleatorio", utilizando los fragmentos de ADN correspondientes al gen del HBsAg separados durante la electroforesis. Esta sonda permite la detección específica y caracterización de los fragmentos de ADN que contienen el gen de interés.

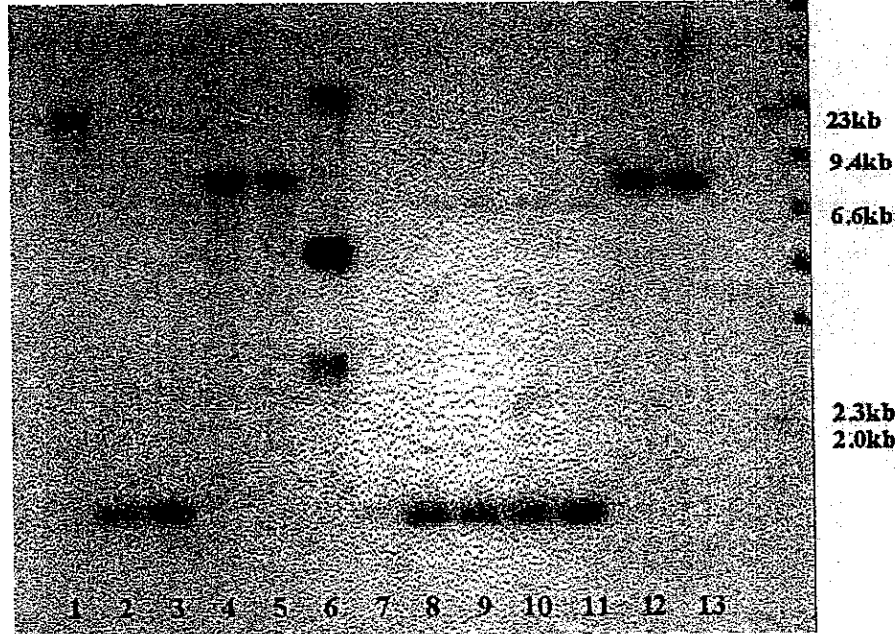
Resultados

Los resultados de la prueba Southern blot realizada se ilustran en una colonia del lote MSL en la Figura 11. Los resultados y los comentarios son los mismos para las colonias del WSL analizadas.





Figura 11: Análisis Southern blot del ADN genómico de *H. polymorpha*, lote MSL MCB 160600BA



Bandas 1 a 5: Genoma de ADN de *Hansenula polymorpha*

Banda 1: Genoma de ADN de *Hansenula polymorpha* sin digerir: banda única positiva que corresponde a la posición de migración del genoma de ADN de *Hansenula polymorpha*.

Bandas 2 y 3: Genoma de ADN de *Hansenula polymorpha* digerido por la enzima de restricción KpnI

Banda 4: Genoma de ADN de *Hansenula polymorpha* digerido por la enzima de restricción BamHI

Banda 5: Genoma de ADN de *Hansenula polymorpha* digerido por la enzima de restricción EcoRI

Bandas 6 a 13: ADN del plásmido pFPMTsadw2

Banda 6: ADN de plásmido sin digerir, están separadas 3 bandas características (plásmido lineal, circular y superenrollado)

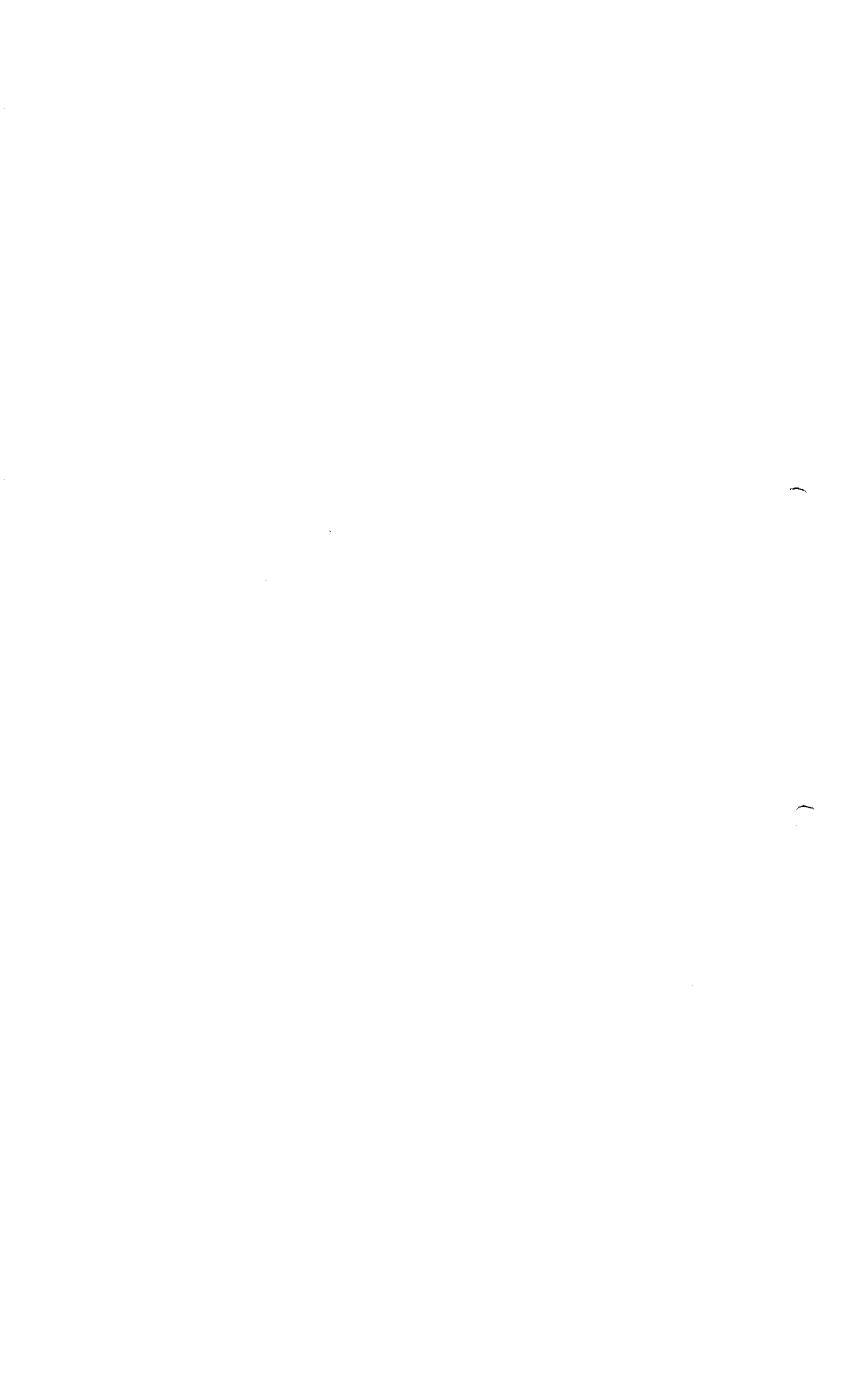
Bandas 7 a 11: ADN de plásmido digerido por la enzima de restricción KpnI

Banda 12: ADN de plásmido digerido por la enzima de restricción BamHI

Banda 13: ADN de plásmido digerido por la enzima de restricción EcoRI

Resultados

KpnI corta el plásmido en 2 fragmentos: 1502 bp y 6127 bp. La principal banda detectada corresponde al fragmento 1502 bp. La otra banda, ligeramente visible, corresponde al fragmento 6127 bp.





BamHI corta el plásmido en un solo lugar, con lo cual se obtiene un único fragmento de 7629 bp que se detecta con la sonda.

EcoRI corta el plásmido en un solo lugar, con lo cual se obtiene un único fragmento de 7629 bp que se detecta con la sonda.

La sonda identifica todos los fragmentos obtenidos mediante la digestión del ADN del plásmido pFPMTsadw2 con distintas enzimas de restricción.

Cuando el genoma integral es digerido por la enzima de restricción KpnI, se detecta una banda principal y migra con la banda obtenida tras la digestión del ADN del plásmido con la enzima de restricción KpnI (bandas 7 a 11).

Cuando el genoma integral es digerido por la enzima de restricción BamHI, se detecta una banda única y migra con la banda obtenida tras la digestión del ADN del plásmido con la enzima de restricción BamHI (banda 12).


Cuando el genoma integral es digerido por la enzima de restricción EcoRI, se detecta una banda única y migra con la banda obtenida tras la digestión del ADN del plásmido con la enzima de restricción EcoRI (banda 13).

Dado que se detectan fragmentos similares del plásmido pFPMTsadw2 en el genoma de *H. polymorpha*, el ADN del plásmido se observa integrado en tándem en el genoma de *Hansenula polymorpha* y puede evaluarse la integridad del gen.

Esta integración se considera múltiple a raíz de la intensidad de las bandas.

El tamaño del fragmento del plásmido que contiene el gen del HBsAg corresponde al tamaño esperado, sin que se detecten fragmentos de otro tamaño que pudieran provenir de una recombinación genómica.

Los resultados son los mismos para el WSL y la autorradiografía del estudio Southern blot del lote WSL MWCB 230600BA se presenta a continuación en la Figura 12 para información.


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

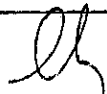
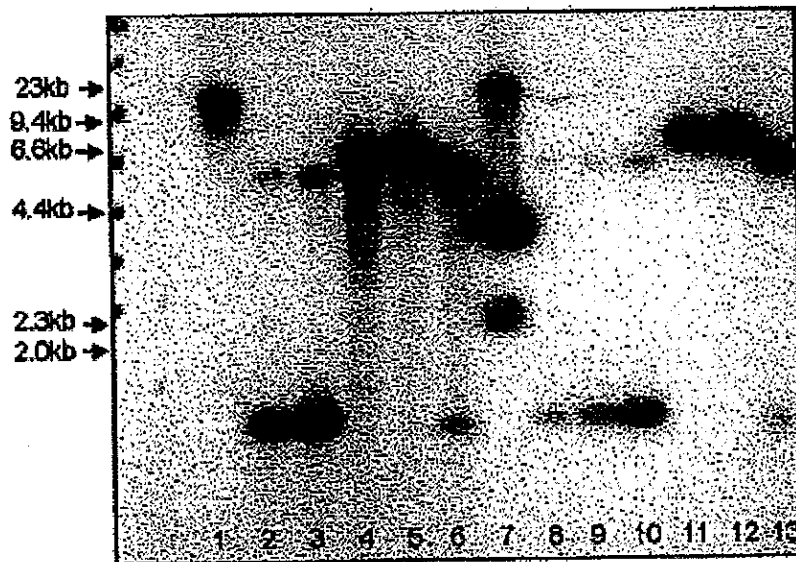

CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
GERENTE
SANOFI PASTEUR S.A.



Figura 12: Análisis Southern blot del ADN genómico de *H. polymorpha*, lote WSL MWCB 230600BA



Bandas 1 a 6: Genoma de ADN de Hansenula polymorpha

Banda 1: Genoma de ADN de *Hansenula polymorpha* sin digerir: banda única positiva que corresponde a la posición de migración del genoma de ADN de *Hansenula polymorpha*.

Bandas 2 y 3: Genoma de ADN de *Hansenula polymorpha* digerido por la enzima de restricción KpnI

Banda 4: Genoma de ADN de *Hansenula polymorpha* digerido por la enzima de restricción BamHI

Banda 5: Genoma de ADN de *Hansenula polymorpha* digerido por la enzima de restricción EcoRI

Banda 6: Genoma de ADN de *Hansenula polymorpha* digerido por la enzima de restricción XbaI

Bandas 7 a 13: ADN del plásmido pFPMTsadw2

Banda 7: ADN de plásmido sin digerir, están separadas 3 bandas características (plásmido lineal, circular y superenrollado)

Bandas 8 a 10: ADN de plásmido digerido por la enzima de restricción KpnI

Banda 11: ADN de plásmido digerido por la enzima de restricción BamHI

Banda 12: ADN de plásmido digerido por la enzima de restricción EcoRI

Banda 13: ADN de plásmido digerido por la enzima de restricción XbaI





6.2.2 Estimación de las copias del plásmido

Finalidad/principio

La finalidad de esta prueba consiste en estimar la cantidad de copias del plásmido integradas en el genoma de *H. polymorpha* de colonias individuales derivadas del lote MSL (lote MCB160600BA) y el WSL (lote MWCB 230600BA).

La cantidad de copias del plásmido pFPMT-sadw2 insertadas en el genoma de *H. polymorpha* se cuantifica mediante el estudio Dot blot, utilizando el mapa de ADN del plásmido.

Método

Se desnaturalizan diluciones en serie de ADN genómico de *H. polymorpha* y ADN del plásmido, y se aplican sobre una membrana de nitrocelulosa (Dot blot). La membrana se hibridiza con la sonda radioactiva específica y se visualiza mediante autorradiografía. La cantidad de copias del gen del HBsAg se determina con densitometría, cuantificando la intensidad de las manchas, con el plásmido pFPMT-sadw2 como control.

Resultados

A modo de ejemplo, se calcula la cantidad de copias del plásmido pFPMTsadw2 contenidas en el genoma de *H. polymorpha* de una colonia del lote MSL (MCB 160600BA) para cada concentración de ADN genómico de acuerdo con los valores densitométricos obtenidos (imagen A), utilizando la curva de calibración (imagen B); vea la Figura 13.

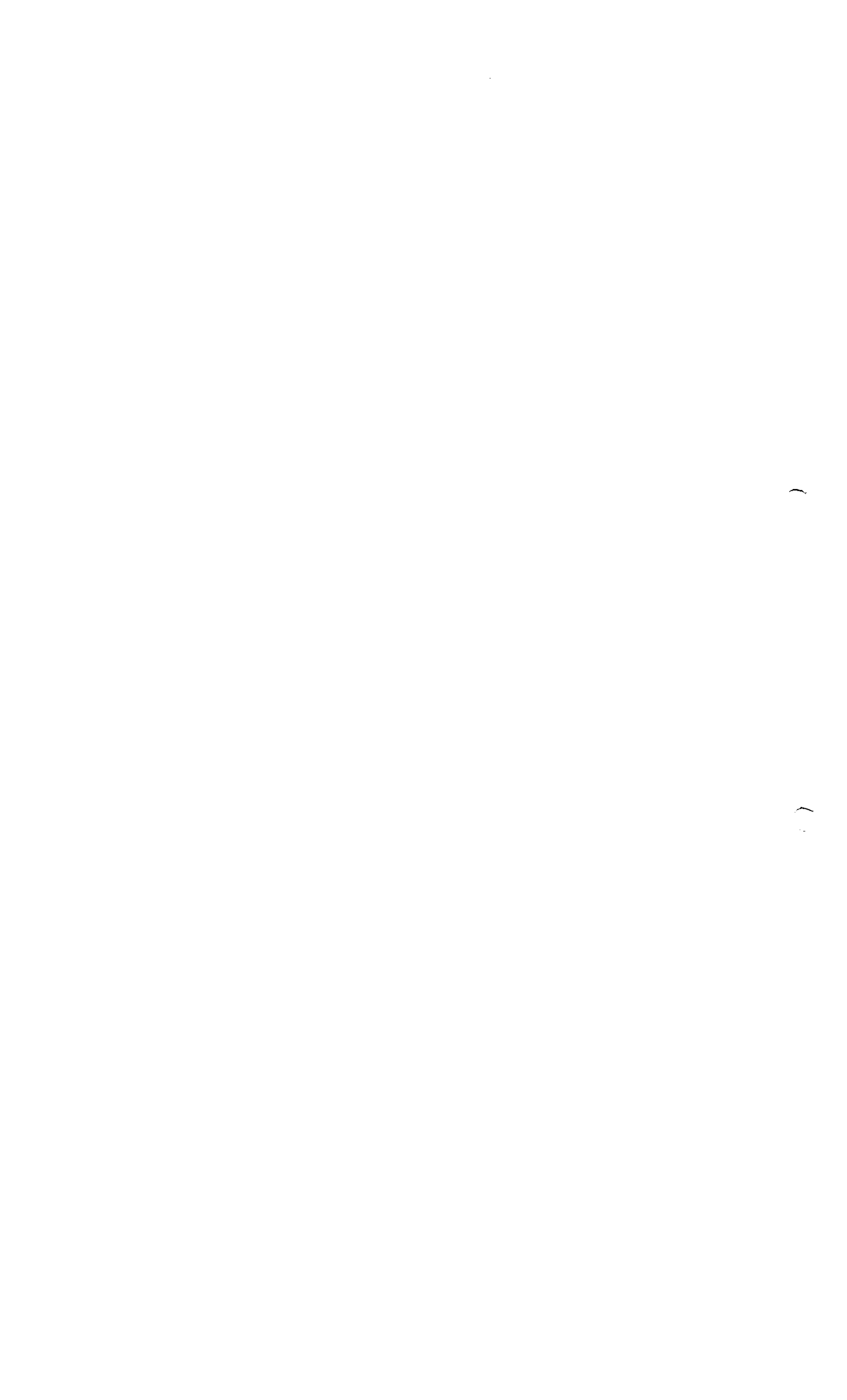
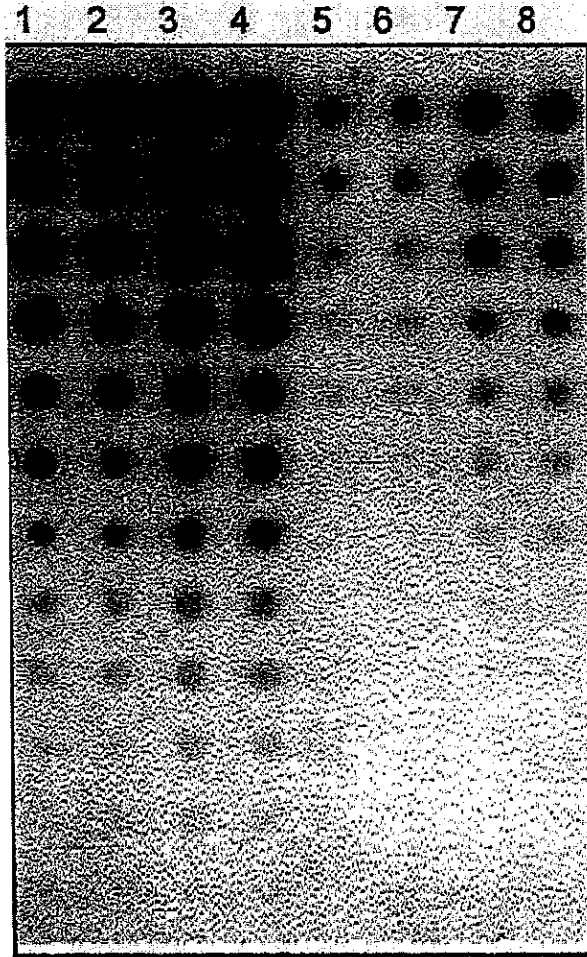


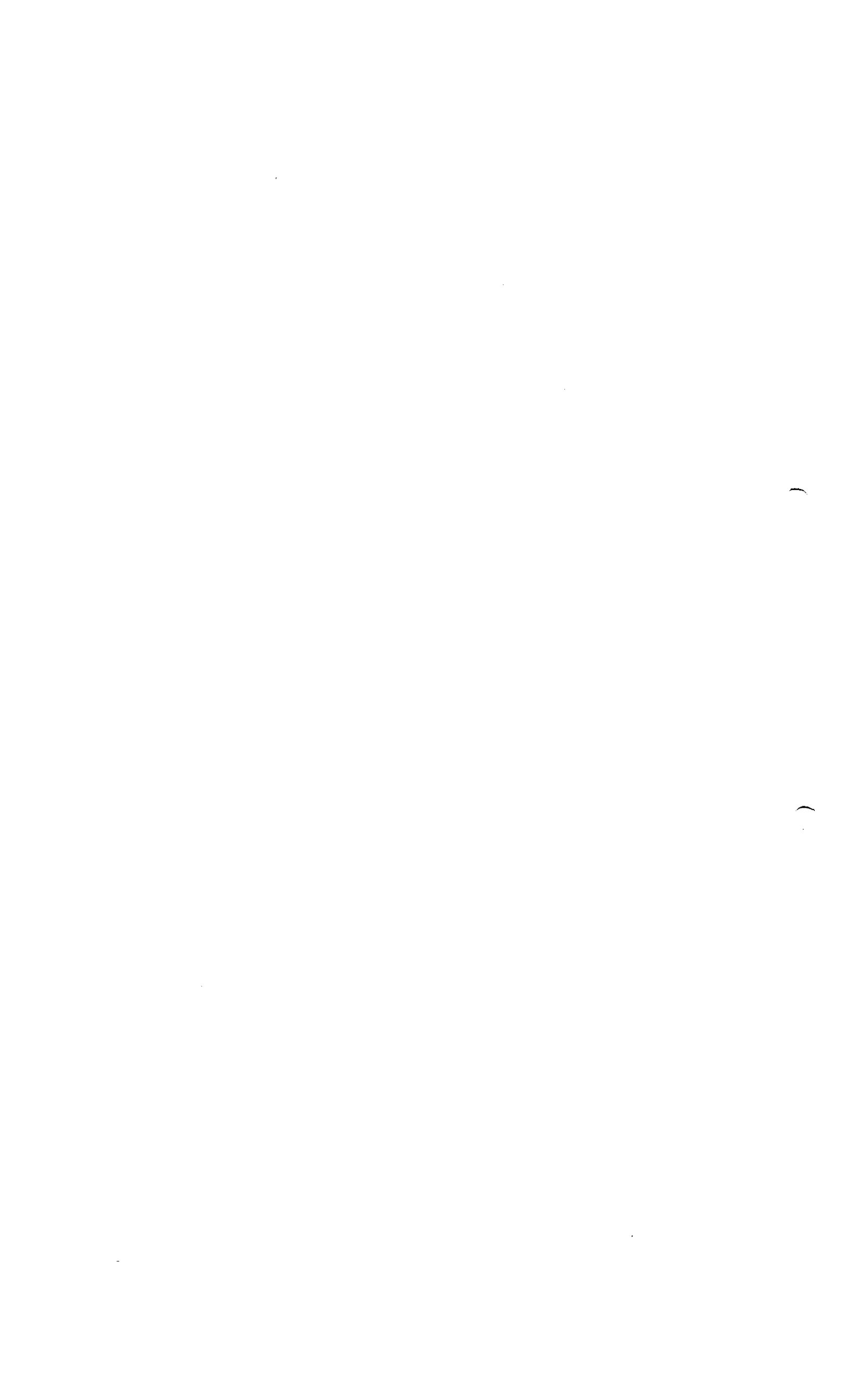


Figura 13: Estimación de la cantidad de copias del plásmido mediante Dot Blot, lote MSL n.º MCB 160600BA

A- Autoradiography Dot-Blot

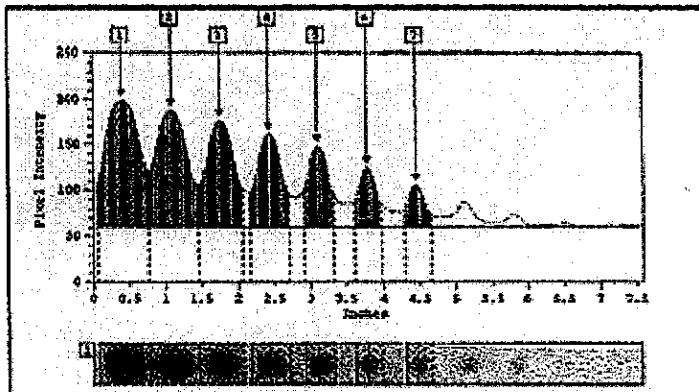


En la autorradiografía, las líneas 1 a 4 corresponden al genoma del plásmido y las líneas 5 a 8 al ADN genómico de *H. polymorpha*.





B Calibration Curve

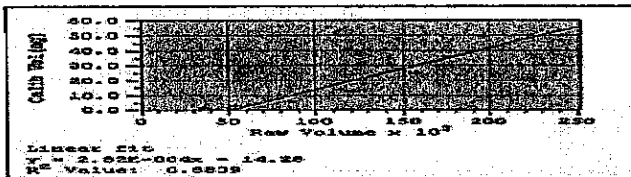


Densitometría de las manchas a partir de la línea dos

B Calibration Curve



Densitometry of spots from the line 2 of figure 7A.



Calibration curve associated

Curva de calibración asociada

Band	Val density	DNapi (ng)
2	197 608.00	* 50.00
3	157 428.00	* 26.00
4	120 926.00	* 12.50
5	85 503.00	* 6.25
6	54 158.00	* 3.10
7	36 957.00	* 1.56

La intensidad de las bandas se cuantifica mediante densitometría (a modo de ejemplo, el análisis de densitometría de la línea 2 se muestra en la Figura 13 B). Los valores de densitometría correspondientes al ADN del plásmido se utilizaron para trazar la curva de calibración que también se muestra en la Figura 13 B. El peso de los plásmidos contenidos en el genoma de *H. polymorpha* se calcula para cada concentración de ADN utilizando la autorradiografía Figura 13 A) y la curva de calibración Figura 13 B).

Se realizó el mismo cálculo para el lote WSL MWCB 230600BA.

Resultados

La Tabla 15 y la Tabla 16 contienen la cantidad de copias del plásmido por genoma de *H. polymorpha* de los lotes MSL y WSL. Se ha estimado en base al peso del ADN del plásmido (convertido a cantidad de genomas) calculado para cada concentración de ADN (convertida a cantidad de copias del plásmido).

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
ENCARGADO
SANOFI PASTEUR S.A.



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

Líneas	Bandas	Valores de densitometría	Peso de ADN del plásmido (ng)	Cantidad de moléculas de plásmido	ADN genómico (ng)	Cantidad de genomas	Cantidad de copias de plásmido por genoma
5	1	92543	11,83	$1,4 \times 10^9$	272	$2,7 \times 10^7$	52
	2	57692	2	$0,24 \times 10^9$	136	$1,36 \times 10^7$	18
6	1	81985	8,85	$1,4 \times 10^9$	272	$2,7 \times 10^7$	37
	2	58276	2,16	$0,24 \times 10^9$	136	$1,36 \times 10^7$	22
7	1	135901	24,06	$2,9 \times 10^9$	1360	$13,6 \times 10^7$	21
	2	117646	18,91	$2,3 \times 10^9$	680	$6,8 \times 10^7$	34
	3	92860	11,92	$1,4 \times 10^9$	340	$3,4 \times 10^7$	41
	4	63797	3,72	$0,4 \times 10^9$	170	$1,7 \times 10^7$	24
8	1	132140	23	$2,7 \times 10^9$	1360	$13,6 \times 10^7$	20
	2	101601	14,38	$1,7 \times 10^9$	680	$6,8 \times 10^7$	25
	3	93625	12,13	$1,4 \times 10^9$	340	$3,4 \times 10^7$	41
	4	70228	5,53	$0,7 \times 10^9$	170	$1,7 \times 10^7$	41

Se halló que la cantidad de copias de plásmido presentes en el genoma de *H. polymorpha* del lote MSL n.º MCB 160600BA era de 36 copias \pm 11.

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

Líneas	Bandas	Valores de densitometría	Peso de ADN del plásmido (ng)	Cantidad de moléculas de plásmido	ADN genómico (ng)	Cantidad de genomas	Cantidad de copias de plásmido por genoma
5	6	47559,00	1,83	$2,2 \times 10^8$	50	$4,6 \times 10^6$	48
	7	28626,00	0,93	$1,1 \times 10^8$	25	$2,3 \times 10^6$	47,8
	8	13898,00	0,24	$0,3 \times 10^8$	12,5	$1,1 \times 10^6$	25,4
6	6	48204,00	1,86	$2,2 \times 10^8$	50	$4,6 \times 10^6$	48,2
	7	31016,00	1,05	$1,3 \times 10^8$	25	$2,3 \times 10^6$	54,8
	8	14858,00	0,29	$0,3 \times 10^8$	12,5	$1,4 \times 10^6$	30,7
7	6	47020,00	1,8	$2,2 \times 10^8$	75	$6,8 \times 10^6$	32,4
	7	32354,00	1,11	$1,3 \times 10^8$	37,5	$3,4 \times 10^6$	38,2
	8	18779,00	0,47	$0,6 \times 10^8$	18,75	$1,7 \times 10^6$	32,9
8	6	40192,00	1,48	$1,8 \times 10^8$	75	$6,8 \times 10^6$	26,5
	7	24145,00	0,72	$0,9 \times 10^8$	37,5	$3,4 \times 10^6$	25,3
	8	15607,00	0,32	$0,4 \times 10^8$	18,75	$1,7 \times 10^6$	22,4

Se halló que la cantidad de copias de plásmido presentes en el genoma de *H. polymorpha* del lote WSL n.º MWCB 230600BA era de 36 copias \pm 11.

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINGUEZ
GERENTE
SANOFI PASTEUR S.A.



La misma prueba realizada con colonias del MSL reveló que se encuentran $36 \text{ copias} \pm 10$ del plásmido en el genoma de *H. polymorpha*. Así, se llega a la conclusión de que la cantidad de copias no difiere entre el MSL y el WSL.



6.2.3 Porcentaje de integración del gen de HBsAg

Finalidad/principio

La finalidad de esta prueba consiste en determinar el porcentaje de *H. polymorpha* transformada en el lote de siembra (MSL y WSL) que integró el plásmido pFPMTsadw2 en su genoma.

El principio de esta prueba se centra en analizar la integración del plásmido en varias colonias de *H. polymorpha* mediante su hibridación con una sonda específica del gen del HBsAg.

Método

Se aíslan 200 colonias de por lo menos 5 viales (40 colonias por vial) del lote WSL n.º MWCB 230600BA y por lo menos 6 ampollas (alrededor de 45 colonias por ampolla) del lote MSL de la prueba de pureza microbiológica y se cultivan en placas de YPD al 2%/glucosa. En el fondo de cada placa se siembra *S. cerevisiae* como control negativo. En el caso del WSL (lote MWCB 230600BA), se siembra una colonia de *H. polymorpha* proveniente de una ampolla del MSL como control positivo. Luego de la incubación (a alrededor de +30°C durante 2 días), las colonias se transfieren a una membrana de nitrocelulosa. Las colonias positivas se identifican con la sonda específica del gen del HBsAg, con una marca radioactiva.

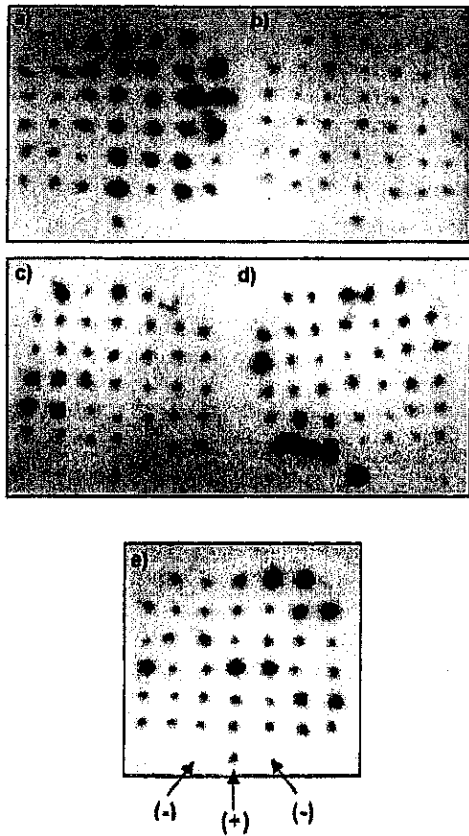
Resultados

La autorradiografía de la hibridación de las colonias del WSL se muestra en la Figura 14.





Figura 14: Determinación del porcentaje de población de levadura del lote de siembra de trabajo que contiene el plásmido pFPMTsaw2 en el genoma



Las 5 imágenes a) a e) corresponden a las colonias de los 5 viales analizados del WSL y los controles positivos y negativos.

Las 40 colonias del WSL analizado dieron una señal positiva; la colonia del MSL también (+), mientras que las colonias de *S. cerevisiae* no (-); ver al pie de cada imagen. La transferencia de las colonias en la membrana no es homogénea; como resultado, se observan diferencias de intensidad de la señal de las distintas colonias positivas. Los resultados obtenidos en esta prueba mostraron que el 100% de las células analizadas habían integrado el gen que codifica el HBsAg.

Los mismos resultados se obtuvieron con 6 ampollas del MSL; vea la Figura 15.

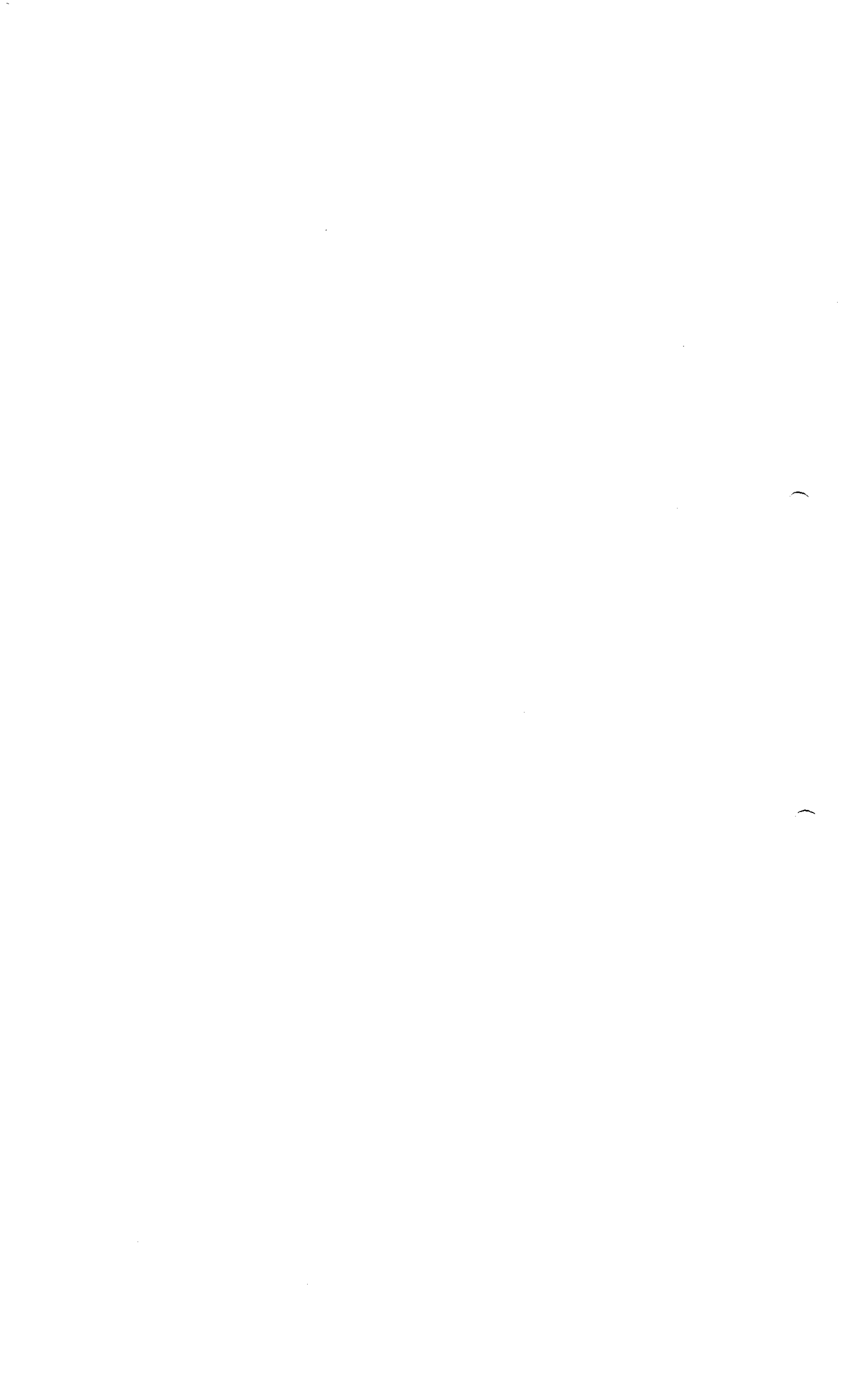
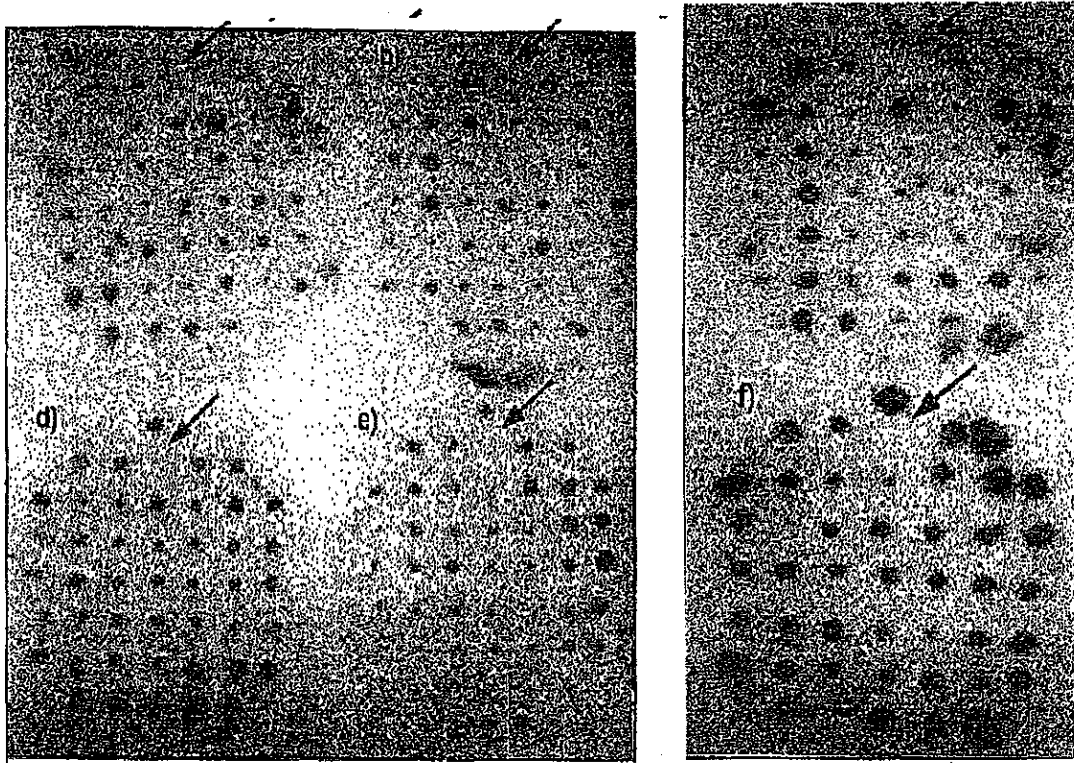




Figura 15: Determinación del porcentaje de población de levadura del lote de siembra maestro que contiene el plásmido pFPMTsaw2 en el genoma



6.2.4 Determinación de la secuencia de regulación del gen del HBsAg integrado en el genoma de *H. polymorpha*

Finalidad/principio

La finalidad de la prueba consiste en secuenciar las regiones reguladoras 5' (región promotora) y 3' (región terminadora) del gen que codifica el HBsAg en el MSL y el WSL de *H. polymorpha*.

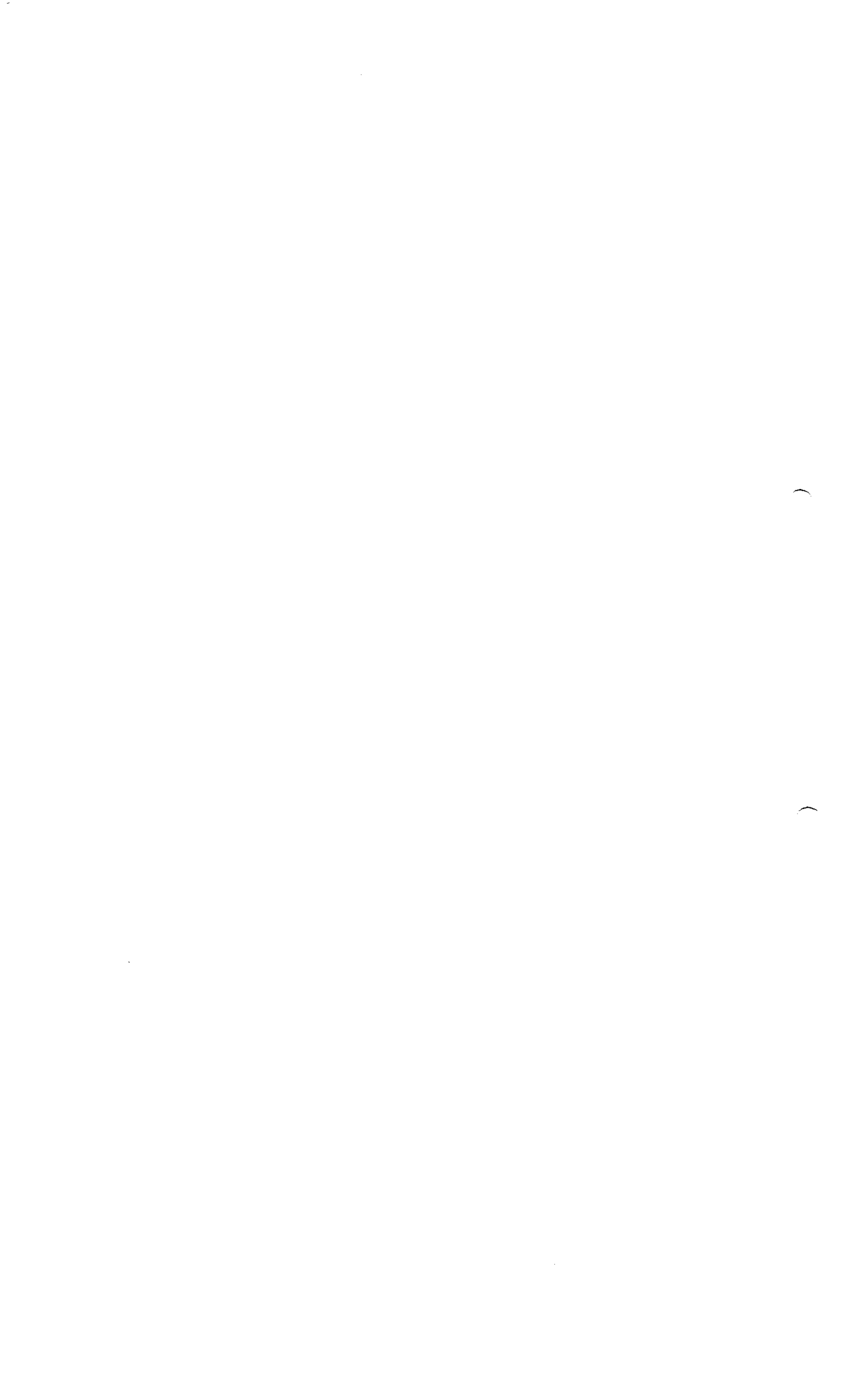
Nota: La secuencia del WSL no se presenta en este documento, si bien es estrictamente idéntica a la provista para el MSL.

Método

Las regiones 3' y 5' del ADN de *H. polymorpha* del MSL (n.º MCB 160600BA) y WSL (MWCB 230600BA) se amplifican mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando oligonucleótidos específicos.

Se espera que los productos de la amplificación incluyan la región reguladora 5' del gen FMDH y la región reguladora 3' del gen Mox (presente en el gen de HBsAg insertado en la célula de levadura).

Los productos de la amplificación se separan mediante electroforesis en un gel de agarosa y se visualizan mediante una tinción con bromuro de etidio.







Los productos de la amplificación se clonan en el vector pGEM-T y se secuencian con cebadores específicos, complementarios del vector plásmido.

Las secuencias de nucleótidos de las regiones promotoras se comparan en la Figura 16 para el MSL.

Las secuencias de nucleótidos de las regiones terminadoras se comparan en la Figura 17 para el MSL.


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DUMÉNIL
Jefe de Laboratorio
SANOFI PASTEUR S.A.

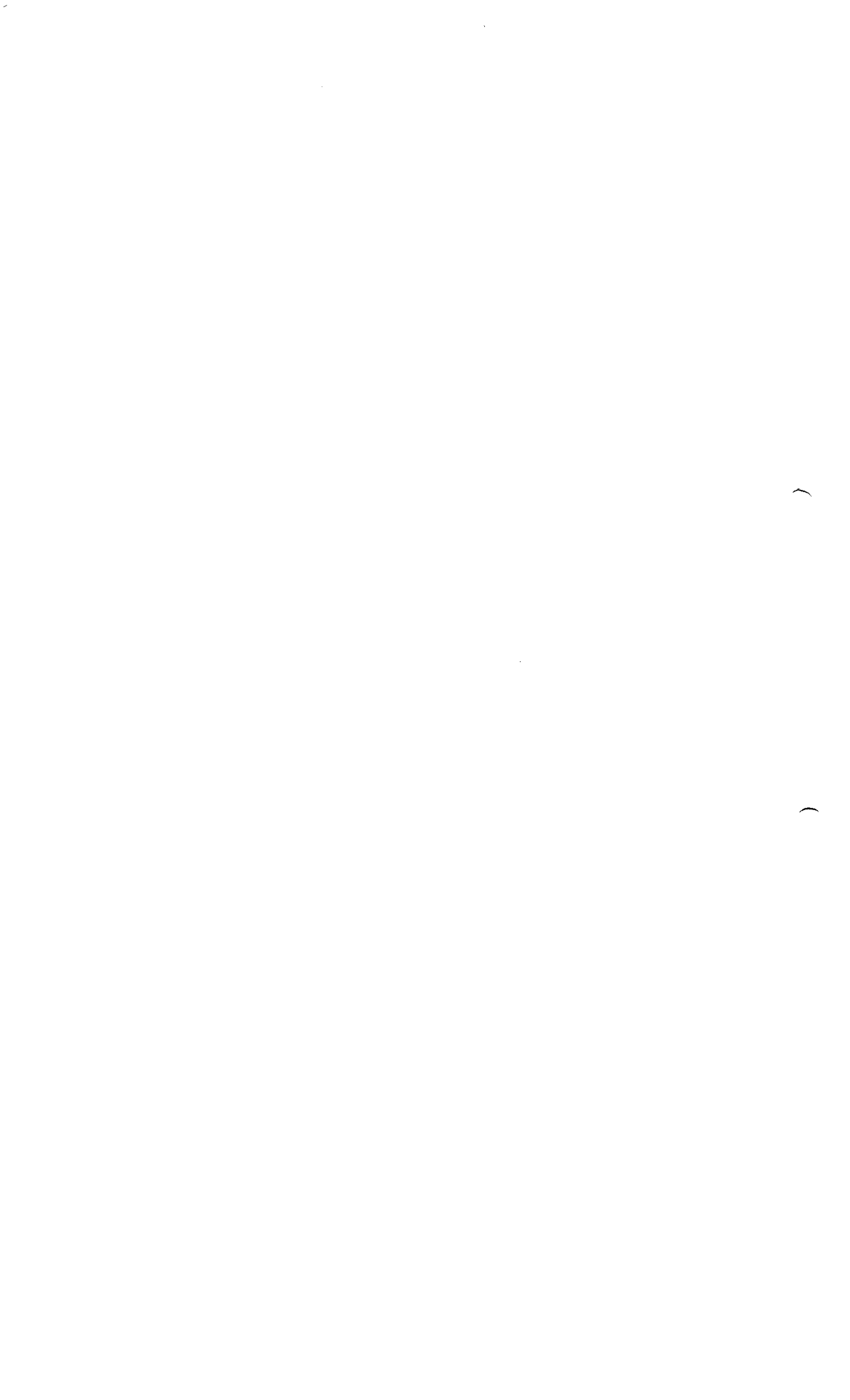




Figura 16: Secuencia de la región promotora del lote de siembra maestro

---GCAGAAATGTATCTAAACGCAAACCTCCGAGCTGGAAA Majority
10 20 30 40

1 ATCGCAGAAATGTATCTAAACGCAAACCTCCGAGCTGGAAA FMDH genbank
1 ---GCAGAAAIGTAICTAAACGCAAACCTCCGAGCTGGAAA FMDprom.pFPMI
1 ---GCAGAAATGTATCTAAACGCAAACCTCCGAGCTGGAAA reg.prom.seq
1 ---CTGGAAA pFPMIreg5'

AATGTTACCGGCGATGCGCGGACAAATTTAGAGGCGGCGAT Majority
50 60 70 80

41 AATGTTACCGGCGATGCGCGGACAAATTTAGAGGCGGCAAT FMDH genbank
38 AATGTTACCGGCGATGCGCGGACTATIIAGAGGCGGCAAT FMDprom.pFPMI
38 AATGTTACCGGCGATGCGCGGACAAATTTAGAGGCGGCGAI reg.prom.seq
8 AATGTTACCGGCGATGCGCGGACAAATIIAGAGGCGGCGAT pFPMIreg5'

CAAGAAACACCTGCTGGGCGAGCAGTCTGGAGCACAGTCT Majority
90 100 110 120

81 CAAGAAACACCTGCTGGGCGAGCAGTCTGGAGCACAGTCT FMDH genbank
78 CAAGAAACACCTGCTGGGCGAGCAGTCTGGAGCACAGTCT FMDprom.pFPMI
78 CAAGAAACACCTGCTGGGCGAGCAGTCTGGAGCACAGTCT reg.prom.seq
48 CAAGAAACACCTGCTGGGCGAGCAGTCTGGAGCACAGTCT pFPMIreg5'

TGGATGGGCCCCGAGATCCCAACCGCGTTCCTGGGTACCGGG Majority
130 140 150 160

121 TGGATGGGCCCCGAGATCCCAACCGCGTTCCTGGGTACCGGG FMDH genbank
118 TGGATGGGCCCCGAGATCCCAACCGCGTTCCTGGGTACCGGG FMDprom.pFPMI
118 TGGATGGGCCCCGAGATCCCAACCGCGTTCCTGGGTACCGGG reg.prom.seq
88 TGGATGGGCCCCGAGATCCCAACCGCGTTCCTGGGTACCGGG pFPMIreg5'

ACGTGAGGCGAGCGCGACATCCTTCAAATAATACCAGGCGCC Majority
170 180 190 200

161 ACGTGAGGCGAGCGCGACATCCTTCAAATAATACCAGGCGCC FMDH genbank
158 ACGTGAGGCGAGCGCGACATCCTTCAAATAATACCAGGCGCC FMDprom.pFPMI
158 ACGTGAGGCGAGCGCGACATCCTTCAAATAATACCAGGCGCC reg.prom.seq
128 ACGTGAGGCGAGCGCGACATCCTTCAAATAATACCAGGCGCC pFPMIreg5'

AACCGAGTCTCTCGGAAAACACAGCTTCTGGATATCTTCC Majority
210 220 230 240

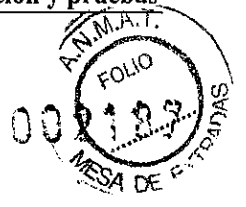
201 AACCGAGTCTCTCGGAAAACACAGCTTCTGGATATCTTCC FMDH genbank
198 AACCGAGTCTCTCGGAAAACACAGCTTCTGGATATCTTCC FMDprom.pFPMI
198 AACCGAGTCTCTCGGAAAACACAGCTTCTGGATATCTTCC reg.prom.seq
168 AACCGAGTCTCTCGGAAAACACAGCTTCTGGATATCTTCC pFPMIreg5'

GCTGGCGGCGCAACGAGCGAATAATAGTCCCTGGAGGTGA Majority
250 260 270 280

241 GC---GGCGGCGCAACGAGCGAAGAAATAGTCCCTGGAGGTGA FMDH genbank
238 GC---GGCGGCGCAACGAGCGAAGAAATAGTCCCTGGAGGTGA FMDprom.pFPMI
236 GCTGGCGGCGCAACGAGCGAATAATAGTCCCTGGAGGTGA reg.prom.seq
206 GCTGGCGGCGCAACGAGCGAATAATAGTCCCTGGAGGTGA pFPMIreg5'

ll
ROXANA MONTEILONE DIRECTORA TÉCNICA SANOFI PASTEUR S.A.
CHRISTIAN DOMÍNGUEZ GERENTE SANOFI PASTEUR S.A.





CGGAATATATATGTGTGGAGGGTAAATCTGACAGGGTGT Majority
290 300 310 320

280 CGGAATATATATGTGTGGAGGGTAAATCTGACAGGGTGT FMDH genbank
277 CGGAATATATATGTGTGGAGGGTAAATCTGACAGGGTGT FMDprom.pFPMT
275 CGGAATATATATGTGTGGAGGGTAAATCTGACAGGGTGT reg.prom.seq
245 CGGAATATATATGTGTGGAGGGTAAATCTGACAGGGTGT pFPMTreg5'

GCAAAGGTAATATTTTCTTAAAACATGCAATCGGCTGCC Majority
330 340 350 360

320 GCAAAGGTAATATTTTCTTAAAACATGCAATCGGCTGCC FMDH genbank
317 GCAAAGGTAATATTTTCTTAAAACATGCAATCGGCTGCC FMDprom.pFPMT
315 GCAAAGGTAATATTTTCTTAAAACATGCAATCGGCTGCC reg.prom.seq
285 GCAAAGGTAATATTTTCTTAAAACATGCAATCGGCTGCC pFPMTreg5'

CGCAACGGGAAAAAGCAATGACTTTGGCACTCTTCACCAGA Majority
370 380 390 400

360 CGCAACGGGAAAAAGCAATGACTTTGGCACTCTTCACCAGA FMDH genbank
357 CGCAACGGGAAAAAGCAATGACTTTGGCACTCTTCACCAGA FMDprom.pFPMT
355 CGCAACGGGAAAAAGCAATGACTTTGGCACTCTTCACCAGA reg.prom.seq
325 CGCAACGGGAAAAAGCAATGACTTTGGCACTCTTCACCAGA pFPMTreg5'

GTGGGGTGTGCCCGCTCGTGTGTGCAAAATAGGCTCCCACTG Majority
410 420 430 440

400 GTGGGGTGTGCCCGCTCGTGTGTGCAAAATAGGCTCCCACTG FMDH genbank
397 GTGGGGTGTGCCCGCTCGTGTGTGCAAAATAGGCTCCCACTG FMDprom.pFPMT
395 GTGGGGTGTGCCCGCTCGTGTGTGCAAAATAGGCTCCCACTG reg.prom.seq
365 GTGGGGTGTGCCCGCTCGTGTGTGCAAAATAGGCTCCCACTG pFPMTreg5'

GTCACCCCGGATTTTGCAGAAAAACAGCAAGTTCGGGGT Majority
450 460 470 480

440 GTCACCCCGGATTTTGCAGAAAAACAGCAAGTTCGGGGT FMDH genbank
437 GTCACCCCGGATTTTGCAGAAAAACAGCAAGTTCGGGGT FMDprom.pFPMT
435 GTCACCCCGGATTTTGCAGAAAAACAGCAAGTTCGGGGT reg.prom.seq
405 GTCACCCCGGATTTTGCAGAAAAACAGCAAGTTCGGGGT pFPMTreg5'

GTCTCACTGGTGTCCGCCAATAAGAGGAGCCGGCAGGCCAC Majority
490 500 510 520

480 GTCTCACTGGTGTCCGCCAATAAGAGGAGCCGGCAGGCCAC FMDH genbank
477 GTCTCACTGGTGTCCGCCAATAAGAGGAGCCGGCAGGCCAC FMDprom.pFPMT
475 GTCTCACTGGTGTCCGCCAATAAGAGGAGCCGGCAGGCCAC reg.prom.seq
445 GTCTCACTGGTGTCCGCCAATAAGAGGAGCCGGCAGGCCAC pFPMTreg5'

GGAGTCTACATCAAGCTGTCTCCGATA-CACTCGACTACC Majority
530 540 550 560

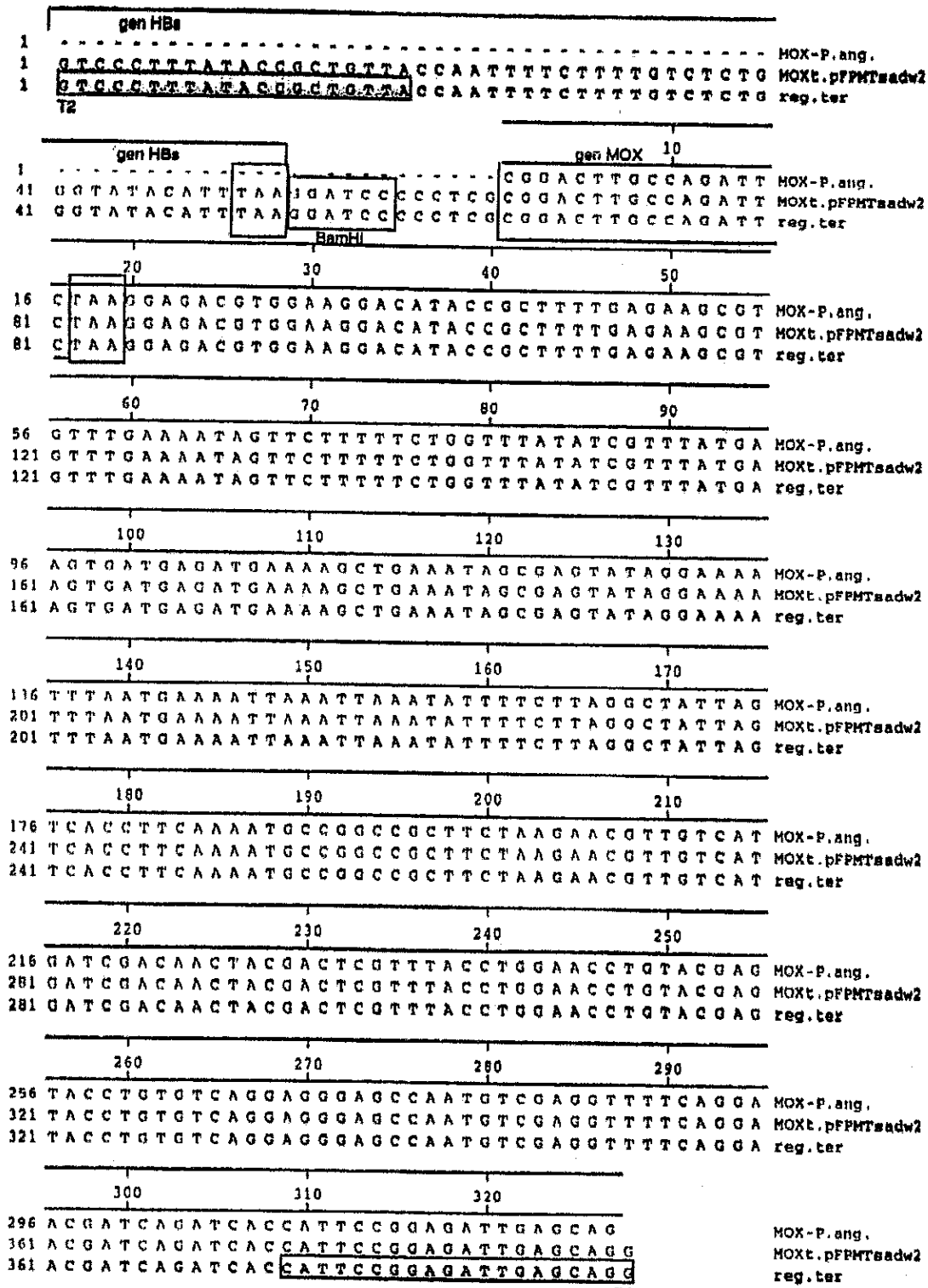
519 GGAGTCTACATCAAGCTGTCTCCGATA-CACTCGACTACC FMDH genbank
516 GGAGTCTACATCAAGCTGTCTCCGATA-CACTCGACTACC FMDprom.pFPMT
515 GGAGTCTACATCAAGCTGTCTCCGATA-CACTCGACTACC reg.prom.seq
485 GGAGTCTACATCAAGCTGTCTCCGATA-CACTCGACTACC pFPMTreg5'

Roxana Montemilone
ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

Christian Dominguez
CHRISTIAN DOMINGUEZ
GERENTE
SANOFI PASTEUR S.A.



Figura 17: Secuencia de la región terminadora del lote de siembra maestro



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



10

10



En esta figura:

- Mox-P. ang.: región terminadora del gen Mox (secuencia publicada);
- MoxT. pFPMTsadw2: región terminadora del gen Mox presente en el plásmido;
- Promotor-terminador: región terminadora del gen Mox presente en el genoma de *H. polymorpha*.

Las secuencias de la región promotora y la región terminadora obtenidas para el WSL son respectivamente las mismas que se obtuvieron para el MSL y no se presentan en este documento.

Resultados

- Región promotora

Todas las secuencias de las regiones promotoras de las siembras de *H. polymorpha* analizadas son idénticas entre el WSL y el MSL.

Se observan algunas diferencias menores entre la secuencia publicada de la región promotora (secuencia del gen FMDH de Genbank), la secuencia de la región promotora del plásmido analizada por Rhein Americana y la secuencia de la región promotora del genoma de *H. polymorpha*. Vea la Figura 16.

A raíz de las diferencias observadas, la secuencia de la región promotora del plásmido pFPMTsadw2 fue vuelta a realizar por el laboratorio CEVAN con la misma técnica y el mismo laboratorio que realizó la secuencia de la región promotora del MSL y el WSL.

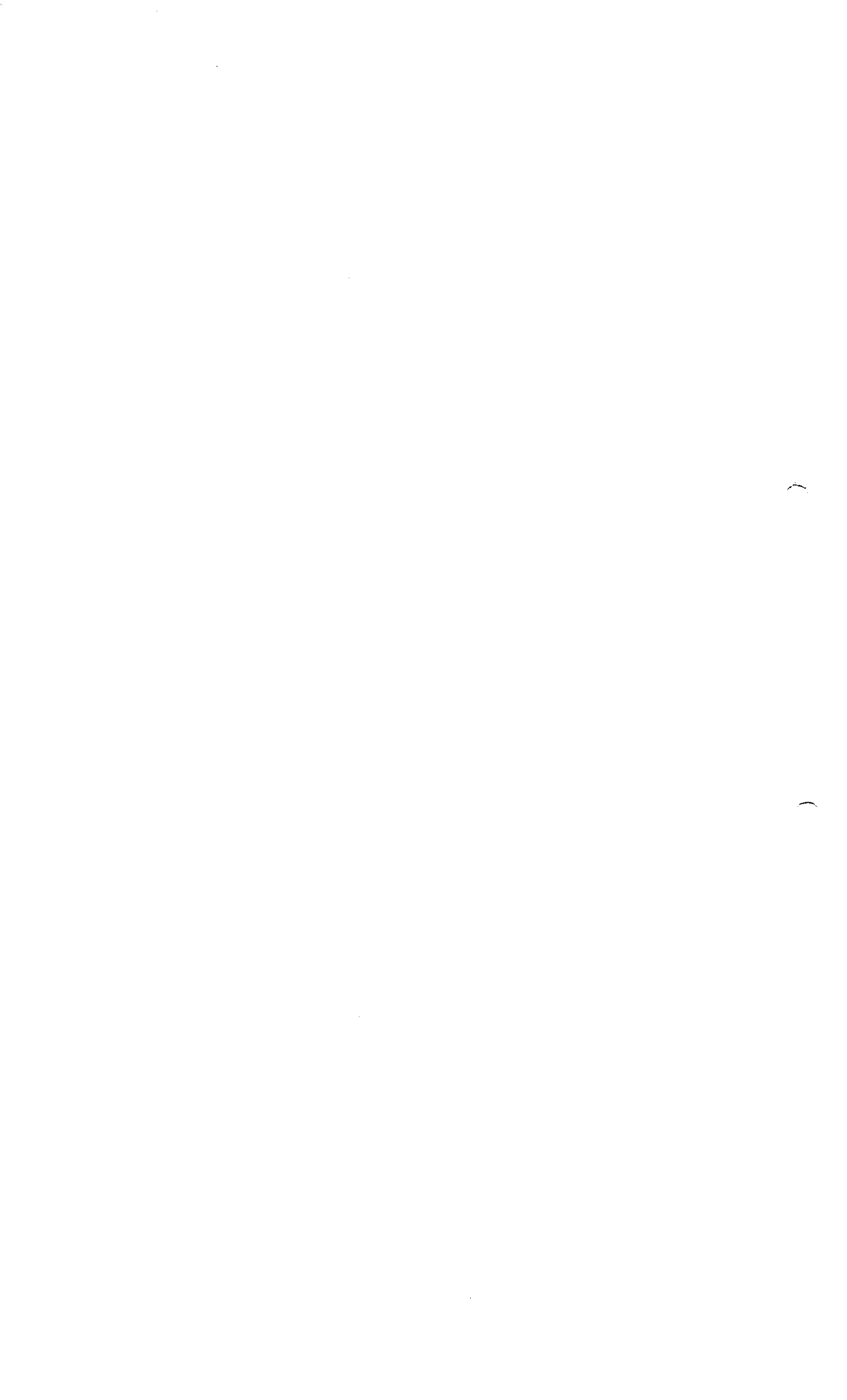
Se halló que la secuencia de la región promotora del MSL y el WSL es idéntica a la del plásmido realizada por el laboratorio CEVAN.

En conclusión, la secuencia de la región promotora 5' presente en el plásmido pFPMTsadw2 no fue afectada por la transferencia al genoma de *H. polymorpha*.

- Región terminadora

Todas las secuencias de la región terminadora (extremo 3' del gen de HBsAg) de todos los clones del MSL y el WSL analizadas fueron idénticas entre sí. Estas secuencias son idénticas a las publicadas (secuencia del gen FMDH de Genbank) y la secuencia del plásmido.

De este modo, se confirma la integridad del gen en el MSL y el WSL de *H. polymorpha*.





6.2.5 Determinación de la secuencia de ADNc del gen

Finalidad/principio

La finalidad de esta prueba consiste en determinar la secuencia de ADNc del gen que codifica el HBsAg.

Método

Se purifica el ARN total del MSL (lote MCB 160600BA) y el WSL (lote MWCB 230600BA) de *H. polymorpha*. A fin de evitar una contaminación potencial del ARN original mediante ADN residual, el ARN purificado se digiere previamente con ADNasa. Luego, el ARN se retrotranscribe con oligonucleótidos específicos del gen del HBsAg y el ADNc del gen del HBsAg se amplifica mediante PCR. Los productos amplificados de la reacción RT-PCR se clonan en un vector adecuado y se secuencian distintos clones.

Resultados

La secuencia obtenida de distintos clones de ADNc se compara con la secuencia del gen de HBsAg del plásmido pFPMTsadw2. Los resultados obtenidos de distintos clones de ADNc indican que la secuencia es idéntica a la secuencia del gen del HBsAg del plásmido, ya sea en el WSL o en el MSL. Vea la secuencia del gen del HBsAg comparada en el MSL en la Figura 18.

Se obtienen las mismas secuencias para el WSL, por lo cual se supone que no es necesario presentarlas por duplicado.

