



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

```
10      20      30      40
1  ATGGAGAACATCACATCAGGATTCCTAGGACCCCTGCTCG cDNAHBs
1  ATGGAGAACATCACATCAGGATTCCTAGGACCCCTGCTCG sadw2.seq

50      60      70      80
41 TGTACAGGCGGGGTTTTTCTTGTTGACAAGAATCCTCAC cDNAHBs
41 TGTACAGGCGGGGTTTTTCTTGTTGACAAGAATCCTCAC sadw2.seq

90      100     110     120
81 AATACCGCAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTCAAT cDNAHBs
81 AATACCGCAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTCAAT sadw2.seq

130     140     150     160
121 TTTCTAGGGGATCACCCGTGTGTCTTGGCCAAAATTCCG cDNAHBs
121 TTTCTAGGGGATCACCCGTGTGTCTTGGCCAAAATTCCG sadw2.seq

170     180     190     200
161 AGTCCCAACCTCCAATCACTCACCAACCTCCTGTCCTCC cDNAHBs
161 AGTCCCAACCTCCAATCACTCACCAACCTCCTGTCCTCC sadw2.seq

210     220     230     240
201 AATTTGTCTCTGGTTATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGTTTT cDNAHBs
201 AATTTGTCTCTGGTTATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGTTTT sadw2.seq

250     260     270     280
241 ATCATATTCCTCTTCATCCTGCTGCTATGCCCTCATCTTCT cDNAHBs
241 ATCATATTCCTCTTCATCCTGCTGCTATGCCCTCATCTTCT sadw2.seq
```

ROXANA MONTEMILONE  
DIRECTORA TÉCNICA  
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINGUEZ  
COORDINADOR  
SANOFI PASTEUR S.A.





290 300 310 320  
281 TATTGGTTCTTCTGGATTATCAAGGTATGTTGCCCGTTTG cdNAHBS  
281 TATTGGTTCTTCTGGATTATCAAGGTATGTTGCCCGTTTG sadw2.seq

330 340 350 360  
321 TCCTCTAATTCCAGGATCAACAACAACCAAGTACGGGACCA cdNAHBS  
321 TCCTCTAATTCCAGGATCAACAACAACCAAGTACGGGACCA sadw2.seq

370 380 390 400  
361 TGC AAAACCTGCACGACTCCTGCTCAAGGCAACTCTATGT cdNAHBS  
361 TGC AAAACCTGCACGACTCCTGCTCAAGGCAACTCTATGT sadw2.seq

410 420 430 440  
401 TTCCTCATGTTGCTGTACAAAACCTACGGATGGAAATTG cdNAHBS  
401 TTCCTCATGTTGCTGTACAAAACCTACGGATGGAAATTG sadw2.seq

450 460 470 480  
441 CACCTGTATTCCCATCCCATCGTCCTGGGCTTTCGCAAAA cdNAHBS  
441 CACCTGTATTCCCATCCCATCGTCCTGGGCTTTCGCAAAA sadw2.seq

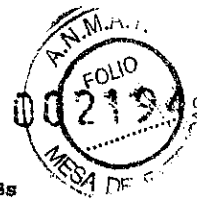
490 500 510 520  
481 TACCTATGGGAGTGGGCCTCAGTCCGTTTCTCTTGGCTCA cdNAHBS  
481 TACCTATGGGAGTGGGCCTCAGTCCGTTTCTCTTGGCTCA sadw2.seq

530 540 550 560  
521 GTTACTAGTGCCATTTGTTCAAGTGGTTCGTAGGGCTTTC cdNAHBS  
521 GTTACTAGTGCCATTTGTTCAAGTGGTTCGTAGGGCTTTC sadw2.seq

ROXANA MONTEMLONE  
DIRECTORA TÉCNICA  
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMÍNGUEZ  
GERENTE  
SANOFI PASTEUR S.A.





570 580 590 600  
561 C C C C A C T G T T T G G C T T T C A G C T A T A T G G A T G A T G T G T A T cDNAHBs  
561 C C C C A C T G T T T G G C T T T C A G C T A T A T G G A T G A T G T G T A T sadw2.seq

610 620 630 640  
601 T G G G G G C C A A G T C T G T A C A G C A T C G T G A G T C C C T T T A T A C cDNAHBs  
601 T G G G G G C C A A G T C T G T A C A G C A T C G T G A G T C C C T T T A T A C sadw2.seq

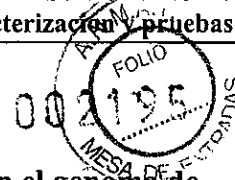
650 660 670 680  
641 C G C T G T T A C C A A T T T T C T T T T G T C T C T G G G T A T A C A T T T A cDNAHBs  
641 C G C T G T T A C C A A T T T T C T T T T G T C T C T G G G T A T A C A T T T A sadw2.seq

681 A cDNAHBs  
681 A sadw2.seq

En esta figura:

- cDNAHBs: secuencia de ADNc proveniente de distintos clones;
- sadw2. seq: secuencia del gen del HBsAg en el plásmido pFPMTsadw2.





## 6.2.6 Determinación del lugar de inserción del plásmido pFPMTsadw2 en el genoma de *H. polymorpha*

### *Finalidad/principio*

La finalidad de esta prueba consiste en determinar el lugar de inserción del plásmido pFPMTsadw2 en el genoma de *H. polymorpha* del MSL. No fue necesario realizar esta prueba también en el WSL porque la estabilidad genómica de la cepa se demostró en 400 generaciones (vea el capítulo 1.3.1).

El principio de esta prueba se centra en caracterizar los lugares de inserción mediante análisis Southern blot, PCR inversa y secuenciación.

### *Método*

- Southern blot

El ADN genómico de *H. polymorpha* y el plásmido pFPMTsadw2 se digieren con las enzimas de restricción KpnI y BamHI, se separan mediante electroforesis en gel de agarosa y se transfieren a una membrana de nitrocelulosa, fijada con luz ultravioleta (UV). Las membranas se hibridan con sondas radioactivas.

Las sondas utilizadas para el estudio Southern blot se preparan con fragmentos obtenidos del plásmido pFPMTsadw2: la sonda del gen del HBsAg y la sonda del promotor FMDH.

- PCR inversa

El ADN genómico de *H. polymorpha* se digiere con las enzimas de restricción KpnI y BamHI, se purifica y se incuba a alrededor de +15°C durante aproximadamente 16 h con una ligasa. El producto de la unión se amplifica mediante PCR, utilizando oligonucleótidos específicos del plásmido pFPMTsadw2 (denominados P1, P2, P3, ...Px), con orientación inversa. Los productos de la amplificación se separan en gel de agarosa y se purifican. Se clonaron dos fragmentos específicos en un vector apropiado y se secuenciaron; vea la Figura 19.

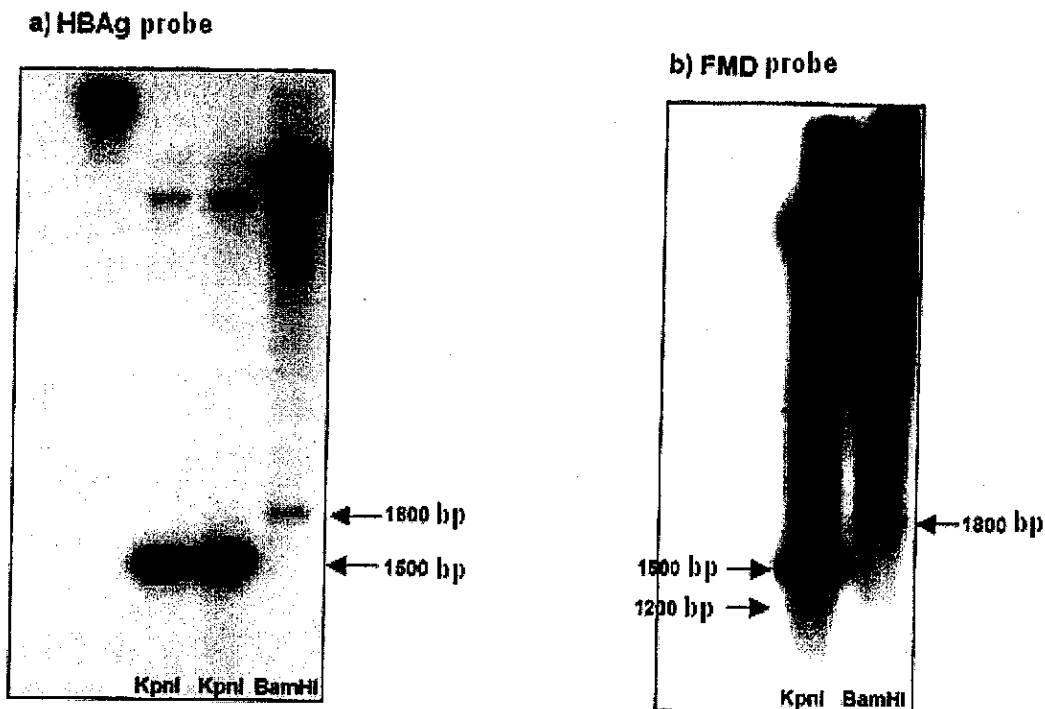
### *Resultados*





- Southern blot

Figura 19: Southern Blot del ADN genómico de *H. polymorpha*



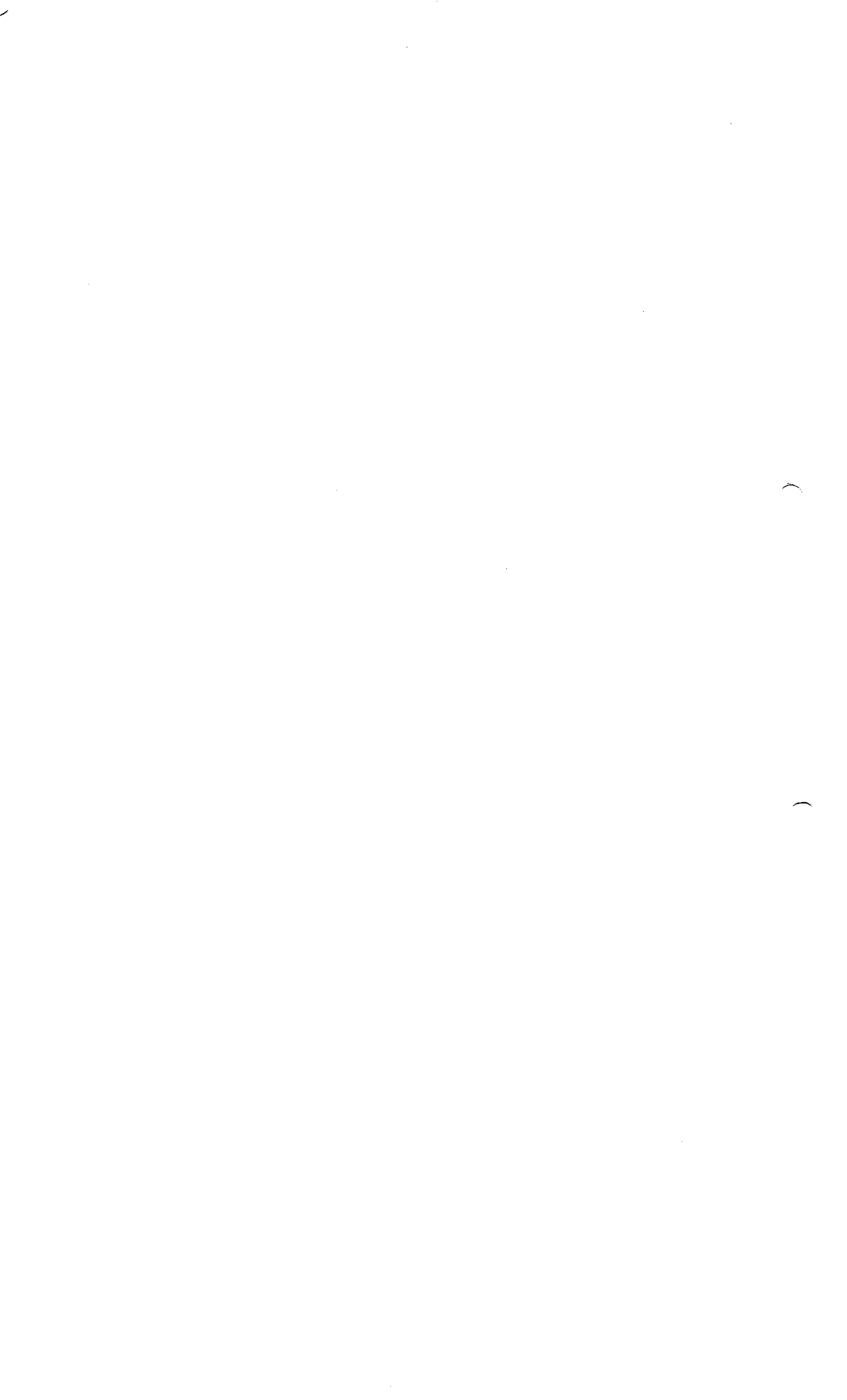
a) Southern blot del ADN genómico de *H. polymorpha* digerido con KpnI y BamHI e hibridado con una sonda de HBsAg. En la figura se ve una banda de 1500 bp resultado de la digestión con KpnI y una banda de 1800 bp (ligeramente visible) resultado de la digestión con BamHI.

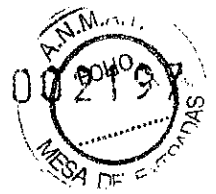
b) Southern blot del ADN genómico de *H. polymorpha* digerido con KpnI y BamHI e hibridado con una sonda de FMDH. En la figura se ve una banda de 1500 bp y una leve banda de 1200 bp resultado de la digestión con KpnI. Otra leve banda de 1800 bp es resultado de la digestión con BamHI.

La banda correspondiente al ADN digerido con BamHI (detectada por las 2 sondas) corresponde a un fragmento de 1800 bp e incluye la región promotora FMDH. Está ubicada en la región 5' del gen de HBsAg. De acuerdo con el tamaño del gen y la región promotora (alrededor de 680 bp y 1200 bp), el plásmido debe insertarse en el genoma a través de la secuencia promotora FMDH.

La banda de 1200 bp del genoma de *H. polymorpha*, digerido con KpnI (detectada por la sonda de FMDH), incluye la región promotora pero no el gen del HBsAg (no detectado por la sonda de HBsAg). Este fragmento debe provenir de un lugar de KpnI presente en el promotor FMDH y el ADN genómico adyacente de *H. polymorpha*.

Por consiguiente, se supone que las copias del plásmido pFPMTsadw2 se insertan en el genoma de *H. polymorpha* a través de la región promotora 5' del gen del HBsAg, probablemente a raíz de una recombinación homóloga con el promotor FMDH endogénico de *H. polymorpha*.





- PCR inversa y secuenciación

El producto amplificado del ADN genómico digerido con BamHI o KpnI y ligado da 2 oligonucleótidos de aproximadamente 1200 bp (BamHI) y 900 bp (KpnI). Los 2 oligonucleótidos se clonan y se secuencian.

La secuencia del fragmento de 1200 bp corresponde a la región del promotor FMDH, la región 5' del gen del HBsAg incorporada en el plásmido pFPMTsadw2 y un sitio de BamHI que no corresponde al ADN del plásmido (proviene de ADN genómico); vea la Figura 20.

La secuencia del fragmento de 900 bp corresponde al ADN genómico que integra un sitio de KpnI y parte del promotor FMDH del plásmido pFPMTsadw2. Esta secuencia incluye el sitio de BamHI proveniente del ADN genómico descrito anteriormente.

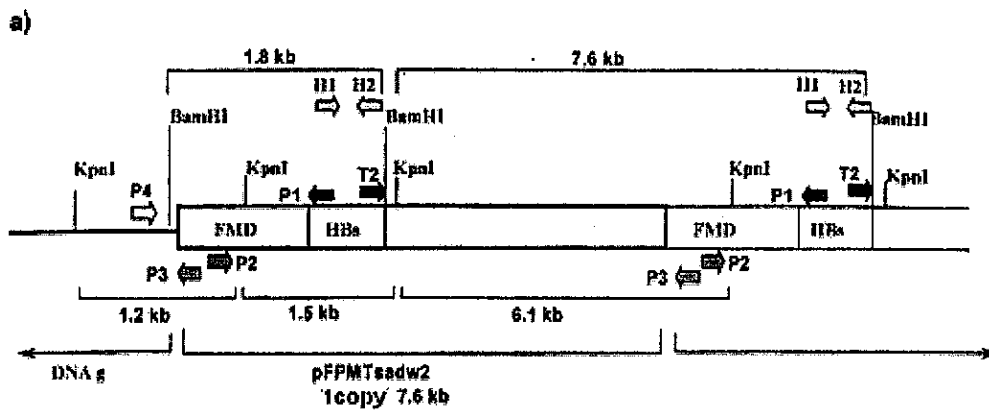
Vea la Figura 21, donde se presenta esta secuencia.

En conclusión, el plásmido pFPMTsadw2 se inserta en tándem en el ADN genómico y se integra a través de la región que contiene el promotor FMDH (región reguladora del gen del HBsAg).



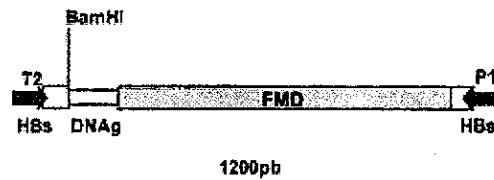
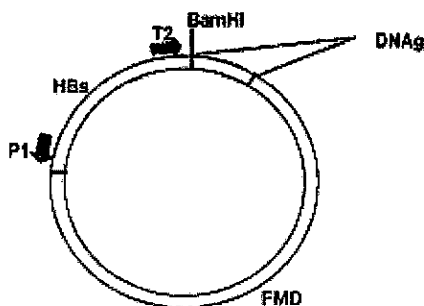


Figura 20: Integración del plásmido en el genoma de *H. polymorpha*

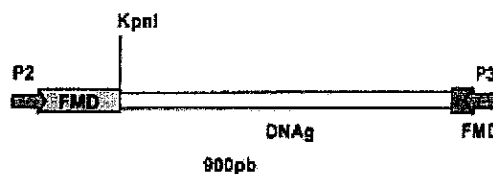
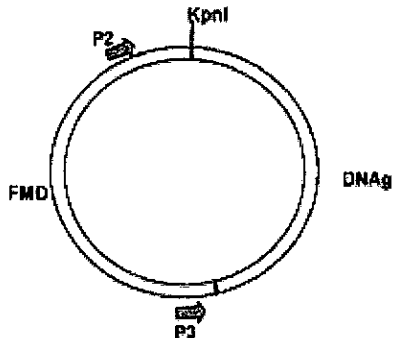


b) Ligation  
 Genomic DNA digested by BamHI

PCR inv.



c) Genomic DNA digested by KpnI



a) Esquema del plásmido pFPMTsadw2 integrado en el genoma de *H. polymorpha*

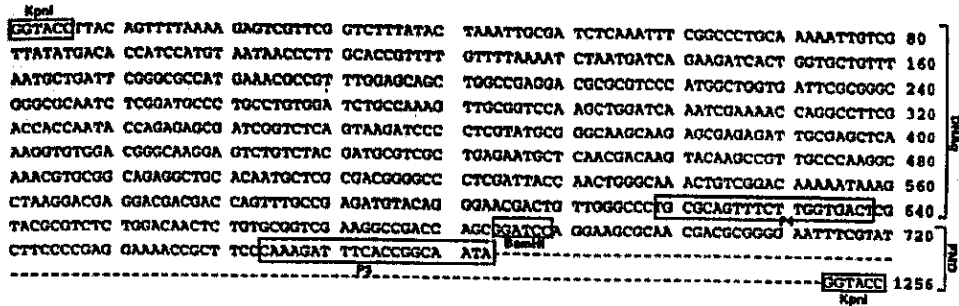
b) Producto de la unión del ADN genómico y PCR inversa digerido con BamHI

b) Producto de la unión del ADN genómico digerido con KpnI y PCR inversa





Figura 21: Secuencia del ADN genómico de *H. polymorpha* que incluye el sitio de inserción del plásmido pFPMTsadw2



### 6.3 Conclusión general de las pruebas de caracterización

Las pruebas de caracterización fenotípica y genotípica realizadas con el MSL y el WSL demostraron que ambos lotes de siembra son idénticos entre sí. Las células del MSL y del WSL son genéticamente estables, han integrado el plásmido que contiene el gen del HBsAg en su genoma y pueden expresar el HBsAg.





## 7 Estabilidad de los lotes de siembra de *Hansenula polymorpha*

### 7.1 Objetivo del estudio

Este estudio busca demostrar la estabilidad de los lotes de siembra maestros y de trabajo (MSL y WSL) cuando se almacenan a  $\leq -70^\circ \text{C}$ , mediante pruebas de viabilidad y pureza microbiológica.

### 7.2 Lotes utilizados en el estudio

Los lotes utilizados en el estudio de estabilidad se describen en la Tabla 17.

Tabla 17: Lotes utilizados en el estudio de estabilidad

|                      |  |
|----------------------|--|
| Lotes n.º            | MCB 160600BA (lote de siembra maestro)<br>MWCB 230600BA (lote de siembra de trabajo) |
| Fabricante y planta  | Sanofi Pasteur Argentina   |
| Fecha de elaboración | MCB 160600BA: 16 de junio de 2000<br>MWCB 230600BA: 23 de junio de 2000              |

### 7.3 Diseño del estudio

El diseño del estudio se describe en la Tabla 18 que aparece a continuación.

Tabla 18: Diseño del estudio de estabilidad

|     | Envase  | Temperatura               | Duración   | Frecuencia de las pruebas  |
|-----|---|---------------------------|------------|--|
| MSL | Ampollas de vidrio  | $\leq -70^\circ \text{C}$ | Sin límite | T0, T3, T90 meses (momento de elaboración del segundo WSL) y luego en momentos de medición anuales |
| WSL | Viales de polipropileno<br>Cierre de polietileno de alta densidad | $\leq -70^\circ \text{C}$ | 10 años    | T0, T24, T40, T51, T63, T75, T88, T100, T112, T124 meses   |

### 7.4 Parámetros estudiados y criterios de aceptación

Las pruebas y los criterios de aceptación aplicados durante el estudio de estabilidad se indican en la Tabla 19.

