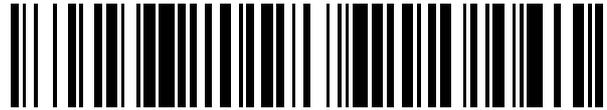


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 756**

51 Int. Cl.:

A61K 39/39 (2006.01)

A61K 36/06 (2006.01)

C07K 14/395 (2006.01)

A61K 36/064 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.02.2008 E 08714176 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.10.2014 EP 2121013**

54 Título: **Procedimientos mejorados de producción de vacunas con base de levadura**

30 Prioridad:

02.02.2007 US 899281 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

29.01.2015

73 Titular/es:

**GLOBEIMMUNE, INC. (100.0%)
1450 INFINITE DRIVE,
LOUISVILLE CO 80027, US**

72 Inventor/es:

**FRANZUSOFF, ALEX y
QUICK, DEBORAH**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 527 756 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimientos mejorados de producción de vacunas con base de levadura

Campo de la invención

5 La invención se refiere a procedimientos de cultivo de cultivos de levadura a pH neutro para mejorar los rendimientos y ciertas características de los cultivos de levadura. El procedimiento también se refiere a composiciones producidas por estos procedimientos.

Antecedentes de la invención

10 Las vacunas son unas de las medidas más rentables disponibles para la industria del cuidado de la salud. Sin embargo, sigue existiendo una necesidad urgente para desarrollar vacunas y adyuvantes seguros y eficaces para una variedad de enfermedades, que incluyen aquellas debidas a infección por agentes patógenos, cánceres, defectos genéticos y otros trastornos del sistema inmunitario. Publicaciones sobre vacunas, por ejemplo, Rabinovich y col., Science 265, 1401-1404 (1994), establecen que todavía existe la necesidad de vacunas seguras y estables al calor que puedan administrarse por vía oral y que necesitan administrarse solo algunas veces, preferentemente pronto en la vida. También se prefieren vacunas de combinación que puedan proteger individuos de más de una enfermedad, además de vacunas que no requieran un adyuvante y que puedan provocar inmunidad de la mucosa. Hasta la fecha hay muy pocas vacunas, si las hay, que cumplan todos estos criterios.

15 Las vacunas de subunidad, cuyo desarrollo se hizo posible por tecnología de ADN recombinante, han sido hasta la fecha decepcionantes ya que solo presentan inmunogenicidad limitada. Un ejemplo son las recientes pruebas clínicas de varias vacunas de subunidad del VIH (virus de la inmunodeficiencia humana) que se han detenido debido a la eficacia limitada de las vacunas, pero también debido a que en algunos casos los individuos inmunizados mostraron progresión acelerada de la enfermedad cuando se expusieron posteriormente al VIH; véanse, por ejemplo, Cohen, Science 264:1839(1994); y Cohen, Science 264: 660 (1994). Una desventaja de las vacunas de subunidad, además de las vacunas de virus muertos y virus vivos recombinantes es que, aunque parecen estimular una fuerte respuesta inmunitaria humoral, dejan de provocar inmunidad celular protectora. Una conclusión importante en la Conferencia Internacional sobre el SIDA de 1994 fue que sigue existiendo la necesidad de una respuesta mediada por linfocitos T citotóxicos que prevenga, o reduzca, la infectividad del VIH, que hasta la fecha falta en vacunas en la clínica. Además, las vacunas para el VIH probadas hasta la fecha han fracasado en provocar inmunidad en las superficies de la mucosa en las que se produce la infección primaria por el VIH.

20 Además, los únicos adyuvantes autorizados para su uso en los Estados Unidos son las sales de aluminio hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio, ninguna de las cuales estimula la inmunidad mediada por células. Además, las formulaciones de sales de aluminio no pueden congelarse o liofilizarse, y tales adyuvantes no son eficaces con todos los antígenos.

25 Se han usado células de levadura en la producción de vacunas de proteína de subunidad (documento US2006104986), que incluyen algunas de aquellas pruebas en los ensayos de vacunas para el VIH anteriormente mencionados. La levadura también se ha alimentado a animales antes de la inmunización para intentar sensibilizar la respuesta inmunitaria en un modo no específico (es decir, para estimular la fagocitosis, además de la producción del complemento e interferón). Los resultados han sido ambiguos, y tales protocolos no han generado inmunidad celular protectora; véanse, por ejemplo, Fattal-German y col., Dev. Biol. Stand. 77: 115-120 (1992) y Bizzini y col., FEMS-Microbiol. Immunol. 2: 155-167 (1990).

30 Además de vacunas, muchas terapias génicas y de fármaco requieren vehículos de administración eficaces y específicos para garantizar el mayor beneficio posible. El carecer de un vehículo de administración adecuado es un obstáculo importante para la aplicación de terapia génica y limita significativamente el potencial terapéutico de muchos fármacos. Por ejemplo, informes recientes han indicado que los vectores de adenovirus, que están siendo actualmente probados en la clínica para aplicaciones de terapia génica, están estimulando respuestas inmunitarias e inflamatorias no deseables y no parecen ser integrantes de un modo deseado; véase, por ejemplo, Engelhardt y col., Human Gene Therapy 5: 1217-1229 (1994) y referencias citadas en su interior.

35 Otro obstáculo importante para la tecnología de vacunas de levadura es el procedimiento de fabricación. Las células de levadura se han cultivado en los laboratorios durante muchos años y se han establecido condiciones de cultivo estándar. Véase, por ejemplo, Methods of Enzymology, vol. 194, Guthrie y col., eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1990). Los protocolos de operación estándar implican generalmente cultivar levadura en medio que es ácido como se mide por niveles de pH. Sin embargo, cultivar levadura en medio ácido puede hacer que la levadura presente diferentes propiedades biológicas que no son óptimas para usar la levadura como vehículos portadores de antígeno para los fines de inmunomodulación o preparación de vacunas. Así, existe la necesidad de procedimientos de cultivo de levadura de forma que la levadura presente propiedades que la hagan más aptas para ser vehículos portadores de antígeno. La invención desvelada en el presente documento se basa, en parte, en el descubrimiento de que mientras que la levadura puede cultivarse en medio ácido, las propiedades biológicas que la levadura presenta cuando se cultiva en medio ácido no son tan deseables como cuando la levadura se cultiva en medio que está a niveles de pH neutro.

Breve resumen de la invención

Según la presente invención, se proporciona una composición que comprende levadura de *Saccharomyces*, en la que la levadura expresa un antígeno heterólogo, y en la que la levadura se ha cultivado en un medio que se mantiene a un nivel de pH de entre 5,5 y 8, de forma que el pH del medio no disminuya por debajo de pH 5,5, para su uso en un procedimiento de provocar una respuesta inmunitaria en un individuo, como un profiláctico o un terapéutico para una enfermedad o afección.

La invención también proporciona un procedimiento de cultivo de levadura de *Saccharomyces* que comprende:

- (a) cultivar la levadura en un medio que se mantiene a un nivel de pH de entre 5,5 y 8, en el que la levadura se cultiva de forma que el pH del medio no disminuya por debajo de pH 5,5, en el que la levadura se cultiva durante al menos tres horas o más a un nivel de pH entre 5,5 y 8, en el que la levadura expresa un antígeno heterólogo; y
- (b) formular una composición que comprende dicha levadura y un excipiente y/o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Los presentes inventores también describen un procedimiento de cultivo de levadura cultivando la levadura en medio en el que el medio se mantiene a un nivel de pH de entre 5,5 y 8 y en el que la densidad de la levadura es al menos 0,5 unidades de levadura/ml.

En un aspecto de la invención, la levadura es *Saccharomyces cerevisiae*. En aspectos de la invención, el medio está tamponado con succinato o ácido succínico o el medio puede contener adicionalmente Soytone. En algunos casos, el antígeno heterólogo se expresa sobre la superficie de la levadura.

En algunos aspectos, el antígeno heterólogo está más fácilmente accesible para la interacción con otras células o agentes que cuando la levadura se cultiva a un pH inferior a 5,5.

La composición puede proporcionarse para su uso en un procedimiento de inducción de una respuesta tipo Th1 en un individuo. En un aspecto, la respuesta tipo Th1 es la producción de interferón-gamma. En otro aspecto, la respuesta tipo Th1 es la producción de IL-12.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 representa los efectos de los niveles de pH del medio sobre el crecimiento celular y también sobre los niveles de pH del cultivo.

La Figura 2 representa el efecto de los niveles de pH del medio sobre el espesor de la pared celular.

La Figura 3 representa los resultados de probar diferentes tampones a un pH de aproximadamente 6,5. Se muestran los efectos sobre el crecimiento de células 75-15 y el cultivo pH.

La Figura 4 representa el efecto de diversos agentes de tamponamiento sobre el espesor de la pared celular, como se mide por la lisis por glucanasa. El medio de cultivo se tamponó usando tanto succinato como citrato para tamponar los medios de cultivo a un nivel de pH de aproximadamente 6,5.

La Figura 5 representa los resultados de un estudio de formulación de medios en el que se probaron diversos aditivos para su efecto sobre el crecimiento y los niveles de pH.

La Figura 6 representa los resultados para la viabilidad de células de levadura como parte de un estudio de formulación de medios. La expresión superficial de HA sobre la superficie de células de levadura se midió usando citometría de flujo.

La Figura 7 representa los resultados de un estudio de formulación de medios sobre el crecimiento celular y los perfiles de pH en los que se probaron diversos aditivos.

La Figura 8 representa los resultados de un ensayo de inmunotransferencia de hemaglutinina (HA) liberable de levadura intacta que muestra la diferencia en la accesibilidad a HA cuando la levadura se cultiva a condiciones de pH neutro frente a cuando la levadura se cultiva a condiciones de menor pH. La inmunotransferencia es una transferencia Western de eluato de DTT de YEX y GI-8103.

La Figura 9 representa el efecto de cultivar células de levadura a niveles de pH neutro y bajo sobre la secreción de citocinas por células dendríticas que se han cargado con células de levadura.

Descripción detallada de la invención

La invención desvelada en el presente documento se basa en el descubrimiento de que cultivar levadura a pH neutro, al menos pH 5,5, o entre pH 5,5 y 8, o entre pH 6 y 8, produce levadura con características biológicas más deseables. Algunas de estas características deseables, que se detallan más adelante, incluyen, pero no se limitan a, capacidad para cultivarse bien a elevada densidad celular, manteniendo la pared de las células de levadura flexible y

sensible a la digestión con enzimas digestoras de la pared celular, y expresión de antígenos de un modo que los haga más accesibles a otras células y/o agentes.

Técnicas generales

5 La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica, química de ácidos nucleicos e inmunología, que son muy conocidas para aquellos expertos en la materia. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía, tal como, *Method of Enzymology*, vol. 194, Guthrie y col., eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1990); *Biology and activities of yeasts*, Skinner y col., eds., Academic Press (1980); *Methods in yeast genetics: a laboratory course manual*, Rose y col., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1990); 10 *The Yeast Saccharomyces: Cell Cycle and Cell Biology*, Pringle y col., eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1997); *The Yeast Saccharomyces: Gene Expression*, Jones y col., eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1993); *The Yeast Saccharomyces: Genome Dynamics, Protein Synthesis, and Energetic*, Broach y col., eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1992); *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición (Sambrook y col., 1989) y *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, tercera edición (Sambrook and Russell, 2001), denominado conjuntamente en el presente documento “Sambrook”); *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel y col., eds., 1987, incluyendo suplementos hasta 2001); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis y col., eds., 1994); Harlow and Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, New York; Harlow and Lane (1999) *Using Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (denominado conjuntamente en el presente documento “Harlow y Lane”), Beaucage y col. eds., *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry* John Wiley & Sons, Inc., New York, 2000) y *Vaccines*, S. Plotkin y W. Orenstein, eds., 3ª edición (1999).

Definiciones

25 Como se usa en el presente documento, el uso general del término “pH neutro” se refiere a un nivel de pH de al menos 5,5. El intervalo de pH neutro puede estar entre aproximadamente pH 5,5 y aproximadamente pH 8, preferentemente entre aproximadamente pH 6 y aproximadamente 8. Un experto en la materia apreciará que pueden producirse fluctuaciones menores (por ejemplo, décimas o centésimas) cuando se mide con un pH-metro y, como tal, esto debe tenerse en cuenta cuando se determina el nivel de pH en cualquier momento dado.

30 Como se usa en el presente documento, el uso general del término “antígeno” se refiere a cualquier molécula que pueda ser reconocida por el sistema inmunitario adaptativo. En un aspecto, un antígeno es una molécula que se une específicamente a un anticuerpo. La molécula puede ser cualquier porción de una proteína (péptido, proteína parcial, proteína de longitud completa) en la que la proteína se produce naturalmente o se deriva sintéticamente, o parte de una composición celular (célula completa, lisado celular o células fragmentadas), parte de un organismo (organismo completo, lisado o células fragmentadas) o un hidrato de carbono o una porción del mismo. El antígeno puede provocar una respuesta inmunitaria humoral específica de antígeno por sí mismo o con el uso de otro compuesto tal como un adyuvante (como células de levadura machacadas). En otro aspecto, un antígeno es reconocido por 35 linfocitos T (o células T) en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). En otro aspecto, el antígeno puede actuar de tolerágeno, contra los mismos antígenos o similares que se encuentran dentro de las células y tejidos del animal a los que se administra el antígeno.

40 En un aspecto de la presente invención, cuando se refiere a la estimulación de una respuesta inmunitaria, el “antígeno” puede ser un “inmunogén”. Los inmunógenos son moléculas que pueden provocar una respuesta inmunitaria adaptativa, por ejemplo, inducción de la producción de anticuerpo. El inmunogén puede en algunos casos generar células de memoria que producirán anticuerpos que reconocen el antígeno tras la futura exposición al antígeno. Como es muy conocido para todos los expertos en este campo, los inmunógenos también pueden reconocerse por linfocitos T, aunque la forma del inmunogén reconocida por los linfocitos T será diferente de la 45 forma del inmunogén que el anticuerpo reconoce.

Procedimientos de cultivo de levadura

La invención proporciona procedimientos de cultivo de levadura que producen características deseables, tales como alta expresión de un antígeno deseado, flexibilidad de la pared celular y expresión de antígeno.

50 Estos procedimientos son ampliamente aplicables a levadura de *Saccharomyces*. Las levaduras son microorganismos unicelulares que pertenecen a una de las tres clases: *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* y *Fungi imperfecti*. Se usan cepas de levadura de *Saccharomyces* no patógenas. En todavía otros aspectos, se usan *Saccharomyces cerevisiae* o *Saccharomyces carlsbergensis*. Se entiende que la invención no se limita a la lista de especies anteriores y que un experto en la materia puede aplicar las enseñanzas aquí en cualquier tipo de levadura. En otro aspecto, *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) se usa para poner en práctica los procedimientos de la invención. Se prefiere *S. cerevisiae* debido a es fácil para la manipulación molecular y que es “Generalmente Reconocida como Segura” o “GRAS” para su uso como aditivos alimentarios (GRAS, regla propuesta por la FDA 62FR18938, 17 de abril de 1997).

El nivel de pH es importante en el cultivo de levadura. Un experto en la materia apreciará que el procedimiento de cultivo incluye no solo el inicio del cultivo de levadura, sino también el mantenimiento del cultivo. El cultivo de levadura puede iniciarse a cualquier nivel de pH, sin embargo, como los medios de un cultivo de levadura tienden a volverse más ácidos (es decir, reducir el pH) con el tiempo, debe tenerse cuidado en monitorizar el nivel de pH durante el procedimiento de cultivo.

La levadura se cultiva en un medio a un nivel de pH de entre 5,5 y 8. En otros aspectos, la levadura se cultiva a un nivel de pH de aproximadamente 5,5. En otros aspectos, la levadura se cultiva a un nivel de pH de entre 6 y 8. En algunos casos, el cultivo de levadura se mantiene a un nivel de pH de entre 6 y 8. En otros aspectos, la levadura se cultiva y/o mantiene a un nivel de pH de entre 6,1 y 8,1. En otros aspectos, la levadura se cultiva y/o mantiene a un nivel de pH de entre 6,2 y 8,2. En otros aspectos, la levadura se cultiva y/o mantiene a un nivel de pH de entre 6,3 y 8,3. En otros aspectos, la levadura se cultiva y/o mantiene a un nivel de pH de entre 6,4 y 8,4. En otros aspectos, la levadura se cultiva y/o mantiene a un nivel de pH de entre 5,5 y 8,5. En otros aspectos, la levadura se cultiva y/o mantiene a un nivel de pH de entre 6,5 y 8,5. En otros aspectos, la levadura se cultiva a un nivel de pH de aproximadamente 5,6, 5,7, 5,8 ó 5,9. En otro aspecto, la levadura se cultiva a un nivel de pH de aproximadamente 6. En otro aspecto, la levadura se cultiva a un nivel de pH de aproximadamente 6,5. En otros aspectos, la levadura se cultiva a un nivel de pH de aproximadamente 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 ó 7,0. En otros aspectos, la levadura se cultiva a un nivel de pH de aproximadamente 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9 u 8,0. En otros aspectos, la levadura se cultiva a un nivel de por encima de 8.

En un aspecto, la levadura se cultiva de forma que el nivel de pH del medio no disminuya por debajo de pH 5,5.

En otro aspecto, el cultivo de levadura a pH neutro incluye cultivar células de levadura durante al menos 3 horas o más.

Como se ha indicado anteriormente, a medida que la levadura crece y se reproduce, las densidades celulares se vuelven mayores y aumenta el nivel de acidez en los medios de cultivo. Como tal, se recomienda que la levadura se cultive a un nivel de pH de al menos 5,5 y/o se mantenga a al menos pH 5,5 a medida que aumenta la densidad de la levadura. En un aspecto, la levadura se cultiva y/o se mantiene entre un pH de 5,5 y 8 ya que la densidad de la levadura es 0,5 unidades de levadura (UL)/ml o superior. En otros aspectos, la levadura se cultiva y/o se mantiene entre un pH de 5,5 y 8 cuando la densidad de la levadura es al menos 0,6 UL/ml o superior, preferentemente 0,7 UL/ml o superior, 0,8 UL/ml o superior, 0,9 UL/ml o superior, o 1 UL/ml o superior. En otro aspecto, la levadura se cultiva y/o se mantiene entre un pH de 6 y 8, ya que la densidad de la levadura es 0,5 UL/ml o superior. En otros aspectos, la levadura se cultiva y/o se mantiene entre un pH de 6 y 8 cuando la densidad de la levadura es al menos 0,6 UL/ml o superior, preferentemente 0,7 UL/ml o superior, 0,8 UL/ml o superior, 0,9 UL/ml o superior, o 1 UL/ml o superior.

En algunos aspectos, es preferible en el momento de la recogida que el cultivo de levadura tenga un nivel de pH neutro. En algunos casos, el cultivo de levadura, en el momento de la recogida, estará a un nivel de pH de entre 6 y 8. En otros casos, el cultivo de levadura, en el momento de la recogida, estará a un nivel de pH de entre 5,5 y 8.

Los medios de cultivo pueden llevarse a un nivel de pH de al menos 5,5 mediante cualquier medio. En un aspecto, se usa ácido succínico (y cualquier forma relacionada, por ejemplo, el anión succinato) para tamponar los medios de cultivo. Como se ha detallado adicionalmente en los ejemplos, el uso de succinato para tamponar los medios de cultivo a al menos pH 5,5 permite que la levadura tenga un tiempo de duplicación de aproximadamente dos a dos horas y media. El succinato está disponible de fuentes comercialmente disponibles (por ejemplo, Sigma Chemicals). En otros aspectos, puede usarse citrato para llevar los medios a un pH de al menos 5,5. Un experto en la materia podrá determinar fácilmente otros agentes de tamponamiento que pueden usarse para llevar los medios a un pH de al menos 5,5 mientras que se mantiene la levadura viable. El concepto de agentes de tamponamiento para mantener una disolución en un nivel de pH estacionario es muy conocido en la técnica y, como tal, no se tratará en detalle en el presente documento. Si levadura cultivada según la invención está siendo usada para formulaciones farmacéuticas (por ejemplo, vacunas), se recomienda usar material de calidad GMP.

Además, pueden añadirse otros suplementos a los medios de cultivo para mejorar los medios. Otros suplementos que son particularmente útiles para ser añadidos a los medios de cultivo incluyen Soytone. Soytone está fácilmente disponible de fuentes comerciales (por ejemplo, BD Difco). Como se muestra en los ejemplos y figuras, la adición de Soytone a los medios de cultivo soporta mayor densidad para el crecimiento a pH neutro. Además, la adición de Soytone soporta la expresión de un antígeno de interés, la hemaglutinina (HA) del virus de la gripe.

Pueden añadirse otros aditivos al cultivo de levadura para otros fines, tales como inducir la expresión de genes heterólogos. En algunos aspectos, se usa cobre para inducir la expresión de la expresión de hemaglutinina. Sin embargo, el uso de cobre no es ideal a pH neutro, así, para el control de genes inducibles que van a expresarse en levadura cultivada a pH neutro, se recomendaría un aditivo distinto de cobre.

Efectos del pH neutro sobre el cultivo de levadura

El uso de un pH neutro en el cultivo de levadura promueve varios efectos biológicos que son características deseables para usar la levadura como vehículos para inmunomodulación y/o provocar respuestas inmunitarias. En

un aspecto, el cultivo de la levadura en pH neutro permite un buen crecimiento de la levadura sin ningún efecto negativo sobre el tiempo de duplicación (por ejemplo, ralentizando el tiempo de duplicación). La levadura puede continuar creciendo a altas densidades sin perder su flexibilidad de la pared celular.

5 En otro aspecto, el uso de un pH neutro, tal como un pH de al menos 5,5 o entre pH 5,5 y 8, permite la producción de levadura con paredes celulares flexibles y/o levadura que tiene una sensibilidad a enzimas digestoras de la pared celular (por ejemplo, glucanasa) a todas las densidades de recogida. Como tal, la invención proporciona procedimientos y composiciones de levadura con flexibilidad de la pared celular como se mide por ensayos tradicionales (por ejemplo, sensibilidad a glucanasa). Experimentos previos habían establecido que la levadura perdía su sensibilidad a la digestión con enzimas digestoras de la pared celular a las densidades de recogida de aproximadamente 0,5 UL (unidades de levadura)/ml. Como tal, una ventaja es que las comparaciones hechas con levadura cultivada en medios de crecimiento estándar a 0,5 UL/ml pueden usarse para la comparación con crecimiento a pH neutro a cualquier densidad. Este rasgo es deseable debido a que la levadura con paredes celulares flexibles puede presentar respuestas inmunitarias únicas, tales como promover la secreción de citocinas (por ejemplo, INF-gamma) en las células que alojan la levadura. Otro motivo por el cual un experto en la materia usaría la metodología de pH neutro es que permite mayor accesibilidad a los antígenos localizados en la pared celular. Esto es útil para mayor inmunogenicidad y también para la detección de anticuerpos de proteína expresada, medida por técnicas convencionales tales como citometría de flujo.

20 Todavía otra característica deseable que se observa en levadura cultivada a pH neutro es la expresión de antígenos de una forma que es beneficiosa para los fines de inmunomodulación. En un aspecto, la levadura se usa como vehículo para la expresión de antígenos (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 5.830.463 y 7.083.787). El antígeno puede ser un antígeno nativo a levadura o, alternativamente, un antígeno heterólogo que se expresa por la levadura. En algunos aspectos, el uso de levadura para la expresión de antígenos es útil para el desarrollo de vacunas, profilácticos y terapéuticos para combatir diversas enfermedades y achaques (por ejemplo, enfermedades infecciosas o cáncer). Usando metodología de pH neutro, un experto en la materia puede producir levadura portadora de antígeno en la que el antígeno está más accesible a otras células (por ejemplo, para funciones co-estimulantes inmunitarias o regulación inmunitaria) o a otros agentes (por ejemplo, anticuerpos para la detección). Además, el uso de pH neutro para algunos antígenos, tales como el antígeno HA de la gripe, permite la liberación de la HA unida a disulfuro mediante tratamiento con ditioneitol (DTT) que no es posible cuando la levadura que expresa HA se cultiva en medios en los que el pH disminuye por debajo de pH 5. En algunos casos, esto se produce cuando el pH disminuye por debajo de pH 5 durante cualquier longitud de tiempo. En otros casos, esto se produce cuando el pH disminuye por debajo de pH 5 durante uno o algunos minutos o una o más horas.

35 Otra característica deseable que presenta la levadura cultivada siguiendo las metodologías de pH neutro es la secreción de citocinas tipo Th1 de células que se han expuesto a la levadura. Ejemplos de citocinas tipo Th1 incluyen, pero no se limitan a, interferón-gamma, IL-12 y IL-2. Como se ha detallado adicionalmente en los ejemplos, células dendríticas que se cargaron con levadura que se habían cultivado siguiendo protocolos de pH neutro presentan elevados niveles de secreción y expresión de interferón-gamma en comparación con levadura cultivada a medio de pH bajo (ácido). No hubo reducción en los niveles de secreción de IL-12 si se usan los procedimientos de cultivo de pH neutro. Como tal, un experto en la materia puede usar las metodologías de pH neutro desveladas en el presente documento para fines de inmunomodulación, por ejemplo, inducir una respuesta tipo Th1 en un individuo que está afectado con una enfermedad o trastorno que se beneficiaría de una respuesta tipo Th1 potenciada.

Composiciones de levadura cultivada usando metodología de pH neutro

45 La invención también contempla composiciones que comprenden levadura que se cultivan usando las metodologías de pH neutro desveladas en el presente documento. En un aspecto, la composición comprende levadura que expresa antígenos nativos, tanto sobre su superficie como internamente o ambos. Esta composición puede ser útil para diversos fines, tales como administración como adyuvante. En otro aspecto, la composición comprende levadura que expresa antígenos heterólogos, tanto sobre su superficie como internamente o ambos. Esta composición puede ser útil para diversos fines, tales como inmunomodulación en un individuo en necesidad de la misma y el desarrollo de vacunas.

50 Estas composiciones también pueden incluir excipientes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden incluir disoluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Vehículos acuosos incluyen agua, disoluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, que incluyen solución salina y medios tamponados. Vehículos parenterales incluyen disolución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, Ringer con lactato o aceites no volátiles. Vehículos intravenosos incluyen reforzadores de fluidos y de nutrientes, reforzadores de electrolitos (tales como aquellos basados en dextrosa de Ringer), y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, y gases inertes y similares. La formulación de composiciones que comprenden levadura cultivada bajo condiciones de pH neutro con un excipiente farmacéuticamente aceptable es generalmente rutinaria para un experto en la materia.

60

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar ciertos aspectos de la invención. No pretenden limitar en ningún modo la invención.

Ejemplo 1 Formulaciones de medios de levadura

- 5 Pueden usarse diversos tipos de medios para cultivar levadura y ajustarse de forma que el nivel de pH sea neutro. A continuación se facilitan varios ejemplos de medios que pueden usarse, sin embargo, debe entenderse que la invención no se limita al uso de estos componentes de medios o protocolos de medios.

Una formulación de medio estándar es el medio ULDM que es la siguiente:

Componente	g/l	20 l	Fuente
YNB sin sulfato de amonio y aminoácidos	1,7	34,0	Difco 233520
Sulfato de amonio	5,0	100,0	EMD AX13853
O			
YNB sin aminoácidos	6,7	134,0	Difco
Adenina	0,02	0,4	Sigma A9795
Triptófano	0,02	0,4	JTBaker 2092
Histidina	0,02	0,4	JTBaker N327
Glucosa monohidratada	25,0	500,0	EMD 1.08342.2500

Otra formulación de medio estándar es el medio UL2 que es la siguiente:

Componente	g/l	20 l	Fuente
YNB sin sulfato de amonio y aminoácidos	1,7	34,0	Difco 233520
Sulfato de amonio	5,0	100,0	EMD AX13853
O			
YNB sin aminoácidos	6,7	134,0	Difco
Adenina	0,4	0,8	Sigma A9795
Triptófano	0,4	0,8	JTBaker 2092
Histidina	0,4	0,8	JTBaker N327
Glucosa monohidratada	15,0	300,0	EMD 1.08342.2500

10

Otra formulación de medio estándar es el medio UL3 que es la siguiente:

Componente	g/l	20 l	Fuente
YNB sin sulfato de amonio y aminoácidos	2,5	50,0	Difco 233520
Sulfato de amonio	7,5	150,0	EMD AX13853
O			
YNB sin aminoácidos	10,0	200,0	Difco
Adenina	0,06	1,2	Sigma A9795
Triptófano	0,06	1,2	JTBaker 2092
Histidina	0,06	1,2	JTBaker N327
Glucosa monohidratada	22,5	450,0	EMD 1.08342.2500

Otra formulación de medio estándar es el medio UL4 que es la siguiente:

Componente	g/l	20 l	Fuente
YNB sin sulfato de amonio y aminoácidos	3,4	68,0	Difco 233520
Sulfato de amonio	10,0	200,0	EMD AX13853
O			
YNB sin aminoácidos	13,4	268,0	Difco
Adenina	0,08	1,6	Sigma A9795
Triptófano	0,08	1,6	JTBaker 2092
Histidina	0,08	1,6	JTBaker N327
Glucosa monohidratada	30,0	600,0	EMD 1.08342.2500

15

ES 2 527 756 T3

Otra formulación de medio estándar es el medio UDM que es la siguiente:

Componente	g/l	20 l	Fuente
YNB sin sulfato de amonio y aminoácidos	1,7	34,0	Difco 233520
Sulfato de amonio	5,0	100,0	EMD AX13853
O			
YNB sin aminoácidos	6,7	134,0	Difco
Adenina	0,02	0,4	Sigma A9795
Triptófano	0,02	0,4	JTBaker 2092
Histidina	0,02	0,4	JTBaker N327
Leucina	0,03	0,6	JTBaker 2083
Glucosa monohidratada	25,0	500,0	EMD 1.08342.2500

Otra formulación de medio estándar es el medio U2 que es la siguiente:

Componente	g/l	20 l	Fuente
YNB sin sulfato de amonio y aminoácidos	1,7	34,0	Difco 233520
Sulfato de amonio	5,0	100,0	EMD AX13853
O			
YNB sin aminoácidos	6,7	134,0	Difco
Adenina	0,04	0,8	Sigma A9795
Triptófano	0,04	0,8	JTBaker 2092
Histidina	0,04	0,8	JTBaker N327
Leucina	0,06	1,2	JTBaker 2083
Glucosa monohidratada	15,0	300,0	EMD 1.08342.2500

5 Otra formulación de medio estándar es el medio U3 que es la siguiente:

Componente	g/l	20 l	Fuente
YNB sin sulfato de amonio y aminoácidos	2,5	50,0	Difco 233520
Sulfato de amonio	7,5	150,0	EMD AX13853
O			
YNB sin aminoácidos	10,0	200,0	Difco
Adenina	0,06	1,2	Sigma A9795
Triptófano	0,06	1,2	JTBaker 2092
Histidina	0,06	1,2	JTBaker N327
Leucina	0,09	1,8	JTBaker 2083
Glucosa monohidratada	22,5	450,0	EMD 1.08342.2500

Otra formulación de medio estándar es el medio U4 que es la siguiente:

Componente	g/l	20 l	Fuente
YNB sin sulfato de amonio y aminoácidos	3,4	68,0	Difco 233520
Sulfato de amonio	10,0	200,0	EMD AX13853
O			
YNB sin aminoácidos	13,4	268,0	Difco
Adenina	0,08	1,6	Sigma A9795
Triptófano	0,08	1,6	JTBaker 2092
Histidina	0,08	1,6	JTBaker N327
Leucina	0,12	2,4	JTBaker 2083
Glucosa monohidratada	30,0	600,0	EMD 1.08342.2500

10 Las formulaciones de medios estándar pueden complementarse con aminoácidos adicionales. Los siguientes protocolos son formulaciones de medios a modo de ejemplo.

ES 2 527 756 T3

La formulación del medio ULDMaa es la siguiente:

Componente	g/l	20 l	Fuente
YNB sin sulfato de amonio y aminoácidos	1,7	34,0	Difco 233520
Sulfato de amonio	5,0	100,0	EMD AX13853
O			
YNB sin aminoácidos	6,7	134,0	Difco
Adenina	0,02	0,4	Sigma A9795
Triptófano	0,04	0,8	JTBaker 2092
Histidina	0,04	0,8	JTBaker N327
Glucosa monohidratada	25,0	500,0	EMD 1.08342.2500

La formulación del medio UL2aa es la siguiente:

Componente	g/l	20 l	Fuente
YNB sin sulfato de amonio y aminoácidos	1,7	34,0	Difco 233520
Sulfato de amonio	5,0	100,0	EMD AX13853
O			
YNB sin aminoácidos	6,7	134,0	Difco
Adenina	0,04	0,8	Sigma A9795
Triptófano	0,06	1,2	JTBaker 2092
Histidina	0,06	1,2	JTBaker N327
Glucosa monohidratada	15,0	300,0	EMD 1.08342.2500

5 La formulación del medio UL3aa es la siguiente:

Componente	g/l	20 l	Fuente
YNB sin sulfato de amonio y aminoácidos	2,5	50,0	Difco 233520
Sulfato de amonio	7,5	150,0	EMD AX13853
O			
YNB sin aminoácidos	10,0	200,0	Difco
Adenina	0,06	1,2	Sigma A9795
Triptófano	0,08	1,6	JTBaker 2092
Histidina	0,08	1,6	JTBaker N327
Glucosa monohidratada	22,5	450,0	EMD 1.08342.2500

La formulación del medio UDMaa es la siguiente:

Componente	g/l	20 l	Fuente
YNB sin sulfato de amonio y aminoácidos	1,7	34,0	Difco 233520
Sulfato de amonio	5,0	100,0	EMD AX13853
O			
YNB sin aminoácidos	6,7	134,0	Difco
Adenina	0,02	0,4	Sigma A9795
Triptófano	0,04	0,8	JTBaker 2092
Histidina	0,04	0,8	JTBaker N327
Leucina	0,06	1,2	JTBaker 2083
Glucosa monohidratada	25,0	500,0	EMD 1.08342.2500

La formulación del medio U2aa es la siguiente:

Componente	g/l	20 l	Fuente
YNB sin sulfato de amonio y aminoácidos	1,7	34,0	Difco 233520
Sulfato de amonio	5,0	100,0	EMD AX13853
O			
YNB sin aminoácidos	6,7	134,0	Difco
Adenina	0,04	0,8	Sigma A9795
Triptófano	0,06	1,2	JTBaker 2092
Histidina	0,06	1,2	JTBaker N327
Leucina	0,09	1,8	JTBaker 2083
Glucosa monohidratada	15,0	300,0	EMD 1.08342.2500

ES 2 527 756 T3

La formulación del medio U3aa es la siguiente:

Componente	g/l	20 l	Fuente
YNB sin sulfato de amonio y aminoácidos	2,5	50,0	Difco 233520
Sulfato de amonio	7,5	150,0	EMD AX13853
O			
YNB sin aminoácidos	10,0	200,0	Difco
Adenina	0,06	1,2	Sigma A9795
Triptófano	0,08	1,6	JTBaker 2092
Histidina	0,08	1,6	JTBaker N327
Leucina	0,12	2,4	JTBaker 2083
Glucosa monohidratada	22,5	450,0	EMD 1.08342.2500

En otro aspecto, se usan medios tamponados que contienen succinato. Ejemplos de medios de levadura que contienen succinato están a continuación. La formulación del medio UDMS, ajustada a pH 6,9, es la siguiente:

Componente	g/l	20 l	Fuente
YNB sin sulfato de amonio y aminoácidos	1,7	34,0	Difco 233520
Sulfato de amonio	5,0	100,0	EMD AX13853
O			
YNB sin aminoácidos	6,7	134,0	Difco
Adenina	0,02	0,4	Sigma A9795
Triptófano	0,02	0,4	JTBaker 2092
Histidina	0,02	0,4	JTBaker N327
Leucina	0,03	0,6	JTBaker 2083
Glucosa monohidratada	25,0	500,0	EMD 1.08342.2500
Ácido succínico	9,45	189,0	EMD SX 1040-3

5

La formulación del medio U2S, ajustada a pH 6,9, es la siguiente:

Componente	g/l	20 l	Fuente
YNB sin sulfato de amonio y aminoácidos	1,7	34,0	Difco 233520
Sulfato de amonio	5,0	100,0	EMD AX13853
O			
YNB sin aminoácidos	6,7	134,0	Difco
Adenina	0,04	0,8	Sigma A9795
Triptófano	0,04	0,8	JTBaker 2092
Histidina	0,04	0,8	JTBaker N327
Leucina	0,06	1,2	JTBaker 2083
Glucosa monohidratada	15,0	300,0	EMD 1.08342.2500
Ácido succínico	9,45	189,0	EMD SX 1040-3

La formulación del medio U3S, ajustada a pH 6,9, es la siguiente:

Componente	g/l	20 l	Fuente
YNB sin sulfato de amonio y aminoácidos	2,5	50,0	Difco 233520
Sulfato de amonio	7,5	150,0	EMD AX13853
O			
YNB sin aminoácidos	10,0	200,0	Difco
Adenina	0,06	1,2	Sigma A9795
Triptófano	0,06	1,2	JTBaker 2092
Histidina	0,06	1,2	JTBaker N327
Leucina	0,09	1,8	JTBaker 2083
Glucosa monohidratada	22,5	450,0	EMD 1.08342.2500
Ácido succínico	9,45	189,0	EMD SX 1040-3

10

La formulación del medio U4S, ajustada a pH 6,9, es la siguiente:

Componente	g/l	20 l	Fuente
YNB sin sulfato de amonio y aminoácidos	3,4	68,0	Difco 233520
Sulfato de amonio	10,0	200,0	EMD AX13853
O			
YNB sin aminoácidos	13,4	268,0	Difco
Adenina	0,08	1,6	Sigma A9795
Triptófano	0,08	1,6	JTBaker 2092
Histidina	0,08	1,6	JTBaker N327
Leucina	0,12	2,4	JTBaker 2083
Glucosa monohidratada	30,0	600,0	EMD 1.08342.2500
Ácido succínico	9,45	189,0	EMD SX 1040-3

Ejemplo 2 Efecto del pH del medio sobre el crecimiento celular y pH del cultivo

Se probó el efecto del pH del medio sobre el crecimiento celular y el pH del cultivo, como se muestra en la Figura 1. Se cultivaron células en medio U2 complementado con tampón Bis-Tris, pH 7,2 o tampón fosfato, pH 7,2. Se cultivaron cultivos de control en medio U2 sin tampón añadido al medio. Para las condiciones marcadas como control (mismas que el pH del medio 5,5) o pH del medio 7,2, el medio de crecimiento para estos controles tanto se ajustó a pH 5,5 como a pH 7,2 con base (NaOH) antes de inocular con la levadura. Los cultivos se incubaron a 30 °C y se monitorizaron para la cifra de células y el pH del cultivo durante hasta 16 horas. Los resultados indican que los tampones a niveles de pH variables afectaron las tasas de crecimiento de la levadura. Como se muestra en la Figura 1, los tiempos de duplicación oscilaron de 2,8 a 4,5 horas. El pH en medio a pH 7 no tamponado fue -5,5 a 2,0 UL/ml, que indica la necesidad de alguna forma de agente de tamponamiento para mantener el pH a un nivel neutro.

Ejemplo 3 Efecto del pH del medio sobre el espesor de la pared celular

Se probó el efecto del pH del medio para determinar si tenía algún efecto sobre el espesor de la pared celular. Los medios y condiciones de crecimiento fueron los mismos que en el Ejemplo 1. Se recogieron cultivos a densidades que oscilaban de 0,5 a 2,0 UL/ml. En la leyenda para la Figura 2, la densidad cuando los cultivos se recogieron se enumera como el número siguiente a la marca de guión, por ejemplo, control-0,6 significa que células cultivadas en medios no tamponados a pH 5,5 se recogieron a continuación cuando las células alcanzaron 0,6 UL/ml de densidad. Las condiciones para los matraces 1-3 (por ejemplo 1-0,5, 2-2,0 ó 3-1,0) se enumeran debajo de la figura y la densidad celular en la recogida se marca en la leyenda. El protocolo de ensayo de lisis usado fue del siguiente modo: (1) resuspender 10 UL de células lavadas en 1 ml de Tris-BME; (2) sacar una muestra a "Tiempo 0" y medir la DO a 600 nm; (3) añadir 20 U de glucanasa; (4) girar a 30 °C; (5) cada 10 minutos, tomar una muestra y medir la DO.

Como puede observarse en la Figura 2, el cultivo de control (medio pH ~5,5) muestra lisis menos eficiente a medida que aumenta la densidad celular. El matraz 2 muestra el efecto del medio a pH 7,2 sin tampón. El matraz 2 muestra el efecto del medio a pH 7,2 con tampón Bis-Tris. El matraz 3 muestra el efecto del medio a pH 7,2 con tampón fosfato.

Así, los resultados indican que cultivar levadura tamponada a aproximadamente pH 5,5 o mayor mantiene la pared celular flexible y sensible a la digestión con enzimas digestoras de la pared celular (por ejemplo, haciendo esferoplastos con liticasa/glucanasa) a todas las densidades de recogida. A diferencia, con el procedimiento estándar comúnmente usado en muchos laboratorios de levadura, la sensibilidad se perdió a densidades de recogida >0,5 UL/ml. Para facilitar la comparación, frecuentemente se usan 0,5 UL/ml con medio de crecimiento estándar para la comparación con crecimiento a pH neutro a cualquier densidad.

Ejemplo 4 Construcción de células 75-15

Se manipuló una proteína de fusión llamada TK75-15 para expresar proteína HA de la gripe sobre la pared celular usando la secuencia Aga2, accionada por el promotor *TEF2*. En esta construcción, la proteína se construyó con el extremo C de la secuencia de HA con respecto a la secuencia de Aga2. Esta proteína, cuando se expresa en células que también expresan Agalp (en este caso, accionado por el promotor *CUP1*), se localiza en la pared celular externa de la célula de levadura, además de en el citosol. La proteína de fusión que comprende el antígeno HA de la gripe es un polipéptido individual con los siguientes elementos de secuencia fusionados en marco del extremo N a C (estando representada la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión en el presente documento por SEC ID N°: 1): 1) la secuencia de proteínas Aga2 de *S. cerevisiae* de longitud completa (posiciones 1 a 87 de SEC ID N°: 1), que incluye su secuencia señal natural que elige como diana ER de 18 aminoácidos (posiciones 1 a 18 de (SEC ID N°: 1; 2) un espaciador para separar Aga2 del cuerpo de HA (posiciones 88 y 89); 3) proteína HA de la gripe que carece de su secuencia señal (posiciones 90 a 600 de SEC ID N°: 1), y que carece de los 36 residuos de HA del extremo C, eliminando así su anclaje de membrana del extremo C y cola citoplásmica; 4) un espaciador de triglicina para separar el cuerpo de la proteína HA de la marca de histidina (posiciones 601-603 de SEC ID N°: 1); y 5) una

marca de hexahistidina del extremo C (posiciones 604-609 de SEC ID N°: 1). Una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína de fusión de SEC ID N°: 1 se representa en el presente documento por SEC ID N°: 2. Esta proteína de fusión y Tarmogen que la expresa puede llamarse 75-15.

La secuencia de proteínas usada es la siguiente (SEC ID N°: 1):

MQLLRCSFISVIA SVLAQELTTICEQIPSTLESTPYSLSSTTTILANGK 50
 AMQGVFEYYKSVTFVSNCGSHPSTTSKGSPI NTQYVFTSDTICIGYHANN 100
 STDTVDTVLEKNVTVTHSVNLL EDSHNGKLCRLKGIAPLQLGKCNIAGWL 150
 LGNPECDPLL PVR SWSYIVETPNSENGICYPGDFIDYEELREQLSSVSSF 200
 ERFEIFPKESSWP NHNTNGVTAACSH EGKSSFYRNLLWLTEKEGSYPK LK 250
 NSYV NKKGKEVLVLWGIHHP SNSKEQQLYQ NENAYVSVVTSNYNRRFTP 300
 EIAERP KVRDQAGRMNYYW TLLKPGDTIIFEANGNLIAPMYAFALSRGFG 350
 SGIITSNASMHECNTK CQTPLGAINSSLPYQNIHPVTIGERPKYVRS AKL 400
 RMVTGLRNIPSIQSRGLFGA IAGFIEGGWTGMIDGWYGYHHQNEQSGSYA 450
 ADQKSTQNAINGITNKVNTVIEKMNIQFTA VGKEFNKLEKRMENLNKKVD 500
 DGFLDIW TYNAELLVLENER TLD FHD SNMKNLYEKVKSQ LKNNAKEIGN 550
 GCFEFYHKCDNECMESVRNGTYDYPKYSEESKLNREKVDG VKLES MGIYQ 600
 GGGHHHHHH*

5

La secuencia de ácidos nucleicos correspondiente es la siguiente (SEC ID N°: 2):

1 ATGCAGTTAC TTCGCTGTTT TTCAATATTT TCTGTTATTG CTT CAGTTTT
 51 AGCACAGGAA CTGACA ACTA TATGCGAGCA AATCCCCTCA CCAACTTTAG
 101 AATCGACGCC GTACTCTTTG TCAACGACTA CTATTTTGGC CAACGGGAAG
 151 GCAATGCAAG GAGTTTTTGA ATATTACAAA TCAGTAACGT TTGTCAGTAA
 201 TTGCGGTTCT CACCCCTCAA CACTAGCAA AGGCAGCCCC ATAAACACAC
 251 AGTATGTTTT TACTAGTGAC ACAATATGTA TAGGCTACCA TGCGAACAAT
 301 TCAACCGACA CTGTTGACAC AGTACTCGAG AAGAATGTGA CAGTGACACA
 351 CTCTGTTAAC CTGCTCGAAG ACAGCCACAA CGGAAACTA TGTAGATTAA
 401 AAGGAATAGC CCCACTACAA TTGGGGAAAT GTAACATCGC CGGATGGCTC
 451 TTGGGGAATC CAGAATGCGA CCCACTGCTT CCAGTGAGAT CATGGTCCTA
 501 CATTGTAGAA ACACCAA ACT CTGAGAATGG AATATGTTAT CCAGGAGATT
 551 TCATCGACTA TGAGGAGCTG AGGGAGCAAT TGAGCTCAGT GTCATCATT C
 601 GAAAGATTCG AAATATTTCC CAAAGAAAGC TCATGGCCCA ACCACAACAC
 651 AAACGGAGTA ACGGCAGCAT GCTCCCATGA GGGGAAAAGC AGTTTTTACA
 701 GAAATTTGCT ATGGCTGACG GAGAAGGAGG GCTCATACCC AAAGCTGAAA
 751 AATTCTTATG TGAACAAAAA AGGGAAAGAA GTCCTTGTAC TGTGGGGTAT
 801 TCATCACCCG TCTAACAGTA AGGAACAACA GAATCTCTAT CAGAATGAAA
 851 ATGCTTATGT CTCTGTAGTG ACTTCAAATT ATAACAGGAG ATTTACCCCG
 901 GAAATAGCAG AAAGACCCAA AGTAAGAGAT CAAGCTGGGA GGATGAACTA
 951 TTA CTGGACC TTGCTAAAAC CCGGAGACAC AATAATATTT GAGGCAAATG
 1001 GAAATCTAAT AGCACCAATG TATGCTTTCG CACTGAGTAG AGGCTTTGGG
 1051 TCCGGCATCA TCACCTCAA CGCATCAATG CATGAGTGTA ACACGAAGTG
 1101 TCAAACACCC CTGGGAGCTA TAAACAGCAG TCTCCCTTAC CAGAATATAC
 1151 ACCCAGTCAC AATAGGAGAG CGCCAAAAT ACGTCAGGAG TGCCAAATTG
 1201 AGGATGGTTA CAGGACTAAG GAACATTCCG TCCATTCAAT CCAGAGGTCT
 1251 ATTTGGAGCC ATTGCCGGTT TTATTGAAGG GGGATGGACT GGAATGATAG
 1301 ATGGATGGTA TGGTTATCAT CATCAGAATG AACAGGGATC AGGCTATGCA
 1351 GCGGATCAA AAAGCACACA AAATGCCATT AACGGGATTA CAAACAAGGT
 1401 GAACACTGTT ATCGAGAAAA TGAACATTCA ATTCACAGCT GTGGGTAAAG
 1451 AATTCAACAA ATTAGAAAAA AGGATGGAAA ATTTAAATAA AAAAGTTGAT
 1501 GATGGATTT C TGGACATTTG GACATATAAT GCAGAATTGT TAGTTCTACT
 1551 GGAAAATGAA AGGACTCTGG ACTTCCATGA CTCAAATATG AAGAATCTGT
 1601 ATGAGAAAGT AAAAAGCCAA TTAAGAATA ATGCCAAAGA AATCGGAAAT
 1651 GGATGTTTTG AGTTCTACCA CAAGTGTGAC AATGAATGCA TGGAAAGTGT
 1701 AAGAAATGGG ACTTATGATT ATCCCAAATA TTCAGAAGAG TCAAAGTTGA
 1751 ACAGGGAAAA GG TAGATGGA GTGAAATTGG AATCAATGGG GATCTATCAG
 1801 GGTGGCGGGC ATCACCATCA CCATCACTAG TGA

Ejemplo 5 El efecto de diferentes tampones (medios a pH 6,5) sobre el crecimiento de células 75-15 y el pH del cultivo

Se probaron diferentes agentes de tamponamiento sobre las células 75-15 para determinar su efecto sobre el crecimiento celular y también el efecto sobre el pH del cultivo. Estos tampones se muestran en la Figura 3 e incluyeron succinato, citrato y carbonato. Ninguno de los tampones provocó que se formara precipitado. Todos los tampones usados se disolvieron bien en medio de crecimiento estándar. El pH de todos los cultivos de prueba se ajustó a pH 6,5 antes de la inoculación con levadura. A continuación, los cultivos se cultivaron en matraces con agitación a 30 °C durante hasta 15 horas. Se observó crecimiento de mínimo a ningún crecimiento cuando las células se cultivaron en tampón carbonato. Como puede apreciarse en la Figura 3, el uso de diferentes agentes de tamponamiento afectó las tasas de crecimiento. El crecimiento fue más rápido a pH neutro (al menos pH 5,5). En particular, los medios con tampón succinato rindieron mejor en términos de tiempo de duplicación (~2,5 h de tiempo de duplicación). A diferencia, si las células de levadura se cultivaron a pH inferior a 5,5 (condiciones más ácidas), entonces el tiempo de duplicación fue más lento a ~3,5 h. El citrato tuvo tiempo de duplicación similar (~3,5 h). El citrato a 0,05 M tuvo una mayor capacidad de tamponamiento que el succinato a 0,02 M. En estos experimentos, todos los cultivos recibieron cobre 0,35 mM para la inducción de la expresión.

Ejemplo 6 Efecto de diversos agentes de tamponamiento sobre la lisis de células

La Figura 4 muestra los resultados de experimentos realizados con diferentes agentes de tamponamiento tales como succinato y citrato. Los cultivos se cultivaron como se describe en el Ejemplo 1. La capacidad de la levadura para ser lisada por glucanasa se midió usando el protocolo de ensayo de lisis anterior. La levadura en el cultivo de control (pH del medio ~5,2) mostró lisis menos eficaz por glucanasa a medida que aumentó la densidad celular (densidades celulares indicadas por el número después del guión, como se ha descrito anteriormente para la Figura 2). Sin embargo, para los medios tamponados tanto succinato como citrato, la densidad celular en el momento de la recogida no tuvo ningún efecto sobre la capacidad de la levadura para ser lisada por las enzimas digestivas de la pared celular en el ensayo de lisis descrito anteriormente. La levadura en los medios tamponados con succinato y citrato siguió siendo susceptible a la lisis a densidades celulares crecientes (por ejemplo, 0,5 UL/ml, 0,9 UL/ml y 2,1 ó 2,2 UL/ml).

Ejemplo 7 Estudio de formulación de medios

Se probó la contribución de otros agentes añadidos a los medios de cultivo de levadura y los resultados se muestran en la Figura 5. U2 o U4 se refiere a la composición del medio básico. Como la expresión de proteínas está bajo el control del promotor *CUP1* inducible por cobre, se añade cobre 0,35 mM a los medios para inducir a las células de levadura para expresar la proteína HA. Soytone (Soy en la Figura 5), es una mezcla comercialmente disponible de nutrientes derivados por digestión péptica de sojas. La adición de soytone dio el crecimiento más rápido y el mayor rendimiento (30 UL/ml). El uso de ácido succínico 0,08 M mostró mejor capacidad de tamponamiento. Las células se cultivaron a 30 °C para los tiempos indicados sobre el eje x.

La Figura 6 muestra los resultados para el estudio de formulación de medios que usaron Guava Technologies para la determinación de la viabilidad celular. Se cultivó la cepa de levadura 75-15 en la que se expresa Aga2-HA inducible por cobre a 30 °C en matraces agitados. Cuando se añade cobre al cultivo, la proteína Aga2-HA se expresa y aparecerá sobre la superficie celular, que representa el número de células de levadura que muestran HA sobre la superficie (% de señal positiva). La viabilidad celular también puede determinarse usando otros procedimientos (por ejemplo, hemocitómetro o azul de tripano). La mayor señal se observó con U2, incluso a una densidad celular de 8 UL/ml, que está más allá de la densidad celular a la que las células tienden a ralentizarse en su tasa de crecimiento. Los cultivos usando soytone mostraron un claro efecto de la densidad celular, con altas densidades que muestran una disminución en la proteína. El uso de U4 dio baja señal en general. Estos resultados también demuestran la accesibilidad de la detección debido a los efectos que el pH tiene sobre la pared celular y la capacidad de anticuerpos específicos para HA para detectar la proteína expresada en la superficie.

Se realizaron experimentos adicionales usando diferente concentración de Soytone. La Figura 7 ilustra los resultados. No se observó diferencia en el crecimiento o pH entre 0,5 g/l y 1 g/l de Soytone. Se observó crecimiento más rápido en medio U4-YNB que en medio U2.

Ejemplo 8 Diferencia en la accesibilidad de HA cuando la levadura se cultiva a condiciones de pH neutro

Se evaluó la accesibilidad de antígenos particulares a interacciones de otros agentes, tales como un anticuerpo para la detección, usando niveles de pH variables de los medios. La Figura 8 muestra un ensayo de inmunotransferencia de hemaglutinina (HA) de la gripe liberable de levadura intacta cuando las células de levadura se cultivaron a pH inferior a 5 y también cuando la levadura se cultivó a un pH superior a 6. La levadura cultivada a pH neutro hace que la HA expresada en la superficie sea mucho más accesible a la detección de anticuerpos, como se ha determinado tiñendo por citometría de flujo, tanto en el número de células que expresan HA como la cantidad de HA por célula. Además, la levadura cultivada a pH neutro fue más fácil de manipular para la liberación de la HA unida por disulfuro mediante tratamiento con ditiotreitól (agente reductor de disulfuro).

Ejemplo 9 El efecto de pH neutro sobre la producción de citocinas

5 Se examinó el efecto de cultivar levadura a pH neutro sobre la producción de citocinas usando células dendríticas (CD) cargadas con levadura YVEC (que no expresan un antígeno heterólogo) cultivadas en medio en el que el pH se mantuvo o no se mantuvo por encima de pH 5,5. Se cargaron células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón con 10 levaduras por CD incubando juntos en medio RPMI durante 48 h a 37 °C. A continuación, los sobrenadantes se analizaron para citocinas secretadas. La Figura 9 muestra los resultados de estos experimentos. El panel inferior muestra que hay un aumento sustancial de secreción de IFN-gamma de células dendríticas cargadas con la levadura que se cultivó a pH neutro (es decir, al menos 5,5 o superior) que está ausente cuando la levadura se cultiva en medio en el que el pH se dejó disminuir a menos de 5,5.

10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende levadura de *Saccharomyces*, en la que la levadura expresa un antígeno heterólogo, y en la que la levadura se ha cultivado en un medio que se mantiene a un nivel de pH de entre 5,5 y 8, de forma que el pH del medio no disminuya por debajo de pH 5,5, para su uso en un procedimiento de provocación de una respuesta inmunitaria en un individuo, como profiláctico o terapéutico para una enfermedad o afección.
2. La composición para su uso según la reivindicación 1, para su uso en inducir una respuesta inmunitaria tipo Th1 en un individuo que está afectado con una enfermedad o trastorno que se beneficiaría de una respuesta inmunitaria tipo Th1 potenciada.
- 10 3. La composición para su uso según la reivindicación 1, en la que la enfermedad o afección es una enfermedad infecciosa o cáncer.
4. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el medio está tamponado con un agente de tamponamiento.
5. La composición, para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el medio está tamponado con succinato.
- 15 6. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el medio está tamponado con Bis-Tris, citrato o fosfato.
7. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el medio se mantiene a un nivel de pH de entre 6 y 8.
- 20 8. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el antígeno heterólogo se expresa sobre la superficie de la levadura.
9. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la levadura es *Saccharomyces cerevisiae*.
10. Un procedimiento de cultivo de levadura de *Saccharomyces* que comprende:
 - 25 (a) cultivar la levadura en un medio que se mantiene a un nivel de pH de entre 5,5 y 8, en la que la levadura se cultiva de forma que el pH del medio no disminuya por debajo de pH 5,5, en la que la levadura se cultiva durante al menos tres horas o más a un nivel de pH entre 5,5 y 8, en la que la levadura expresa un antígeno heterólogo; y
 - (b) formular una composición que comprende dicha levadura y un excipiente y/o vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 30 11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que el medio se mantiene a un nivel de pH de entre 6 y 8.
12. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 11, en el que el medio está tamponado con un agente de tamponamiento.
13. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en el que el medio está tamponado con succinato, Bis-Tris, citrato o fosfato.
- 35 14. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 11, en el que el procedimiento comprende además liofilizar la levadura.

Figura 1 Efecto del pH del medio sobre el crecimiento celular y el pH del cultivo

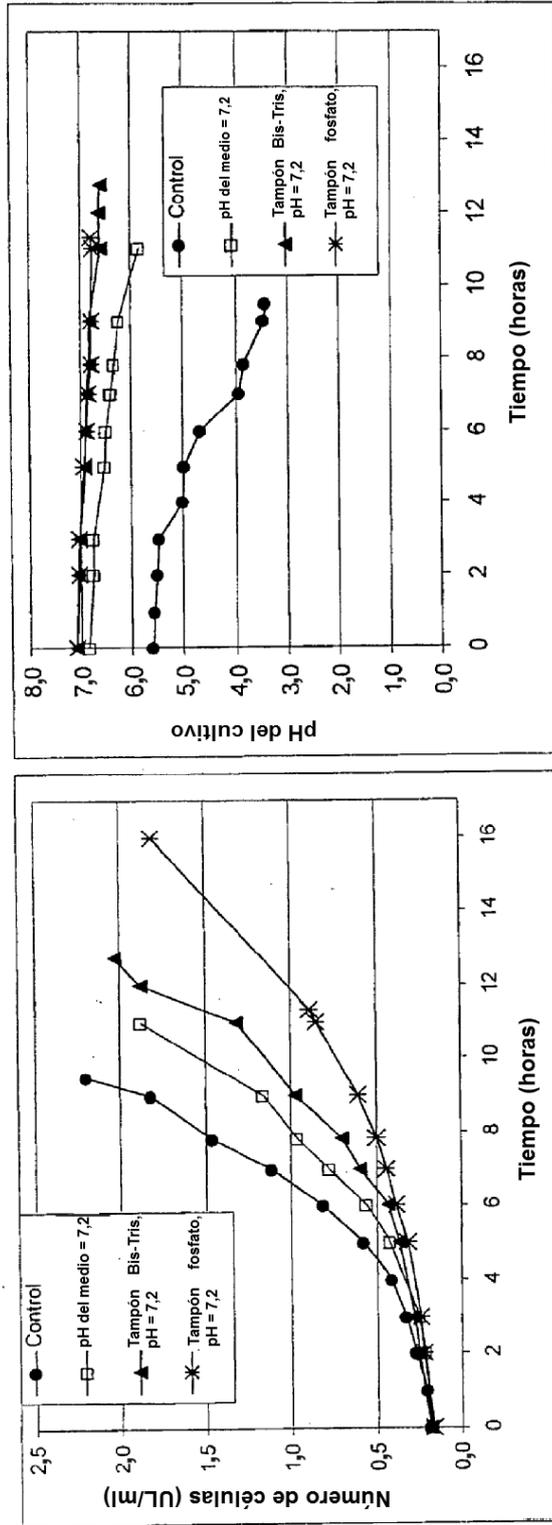
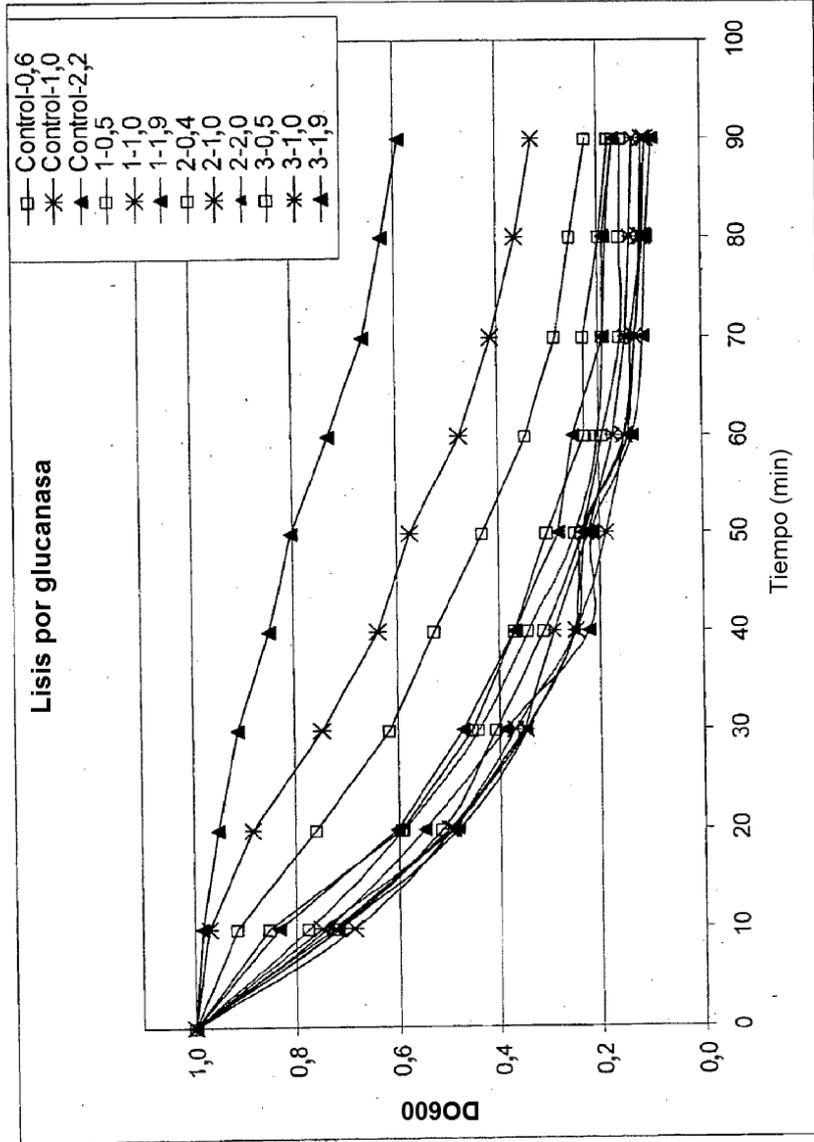


Figura 2 Efecto del pH del medio sobre el espesor de la pared celular



- El cultivo de control (pH del medio ~ 5,5) muestra lisis menos eficiente a medida que aumenta la densidad celular.
- Matraz 1 = pH del medio 7,2, sin tampón
- Matraz 2 = pH del medio 7,2, tampón Bis-Tris
- Matraz 3 = pH del medio 7,2, tampón fosfato

Figura 3 Prueba de diferentes tampones (medio de pH 6,5)

Efectos sobre el crecimiento celular y el pH del cultivo

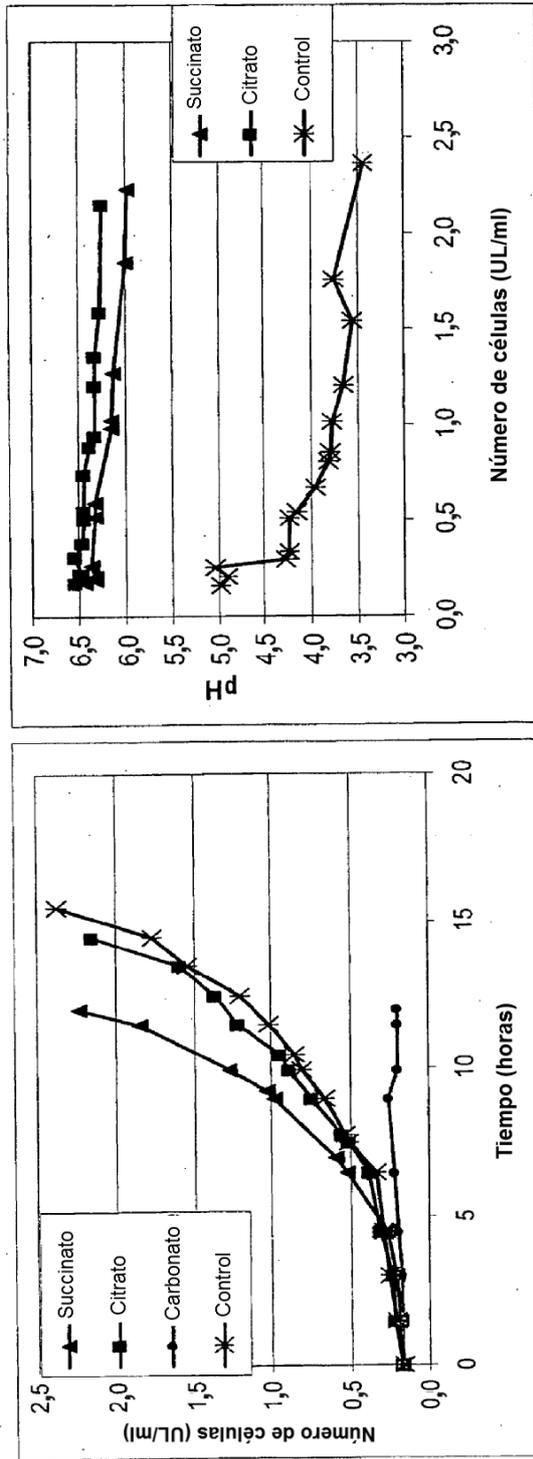


Figura 4 Prueba de nuevos tampones (medio de pH 6,5)

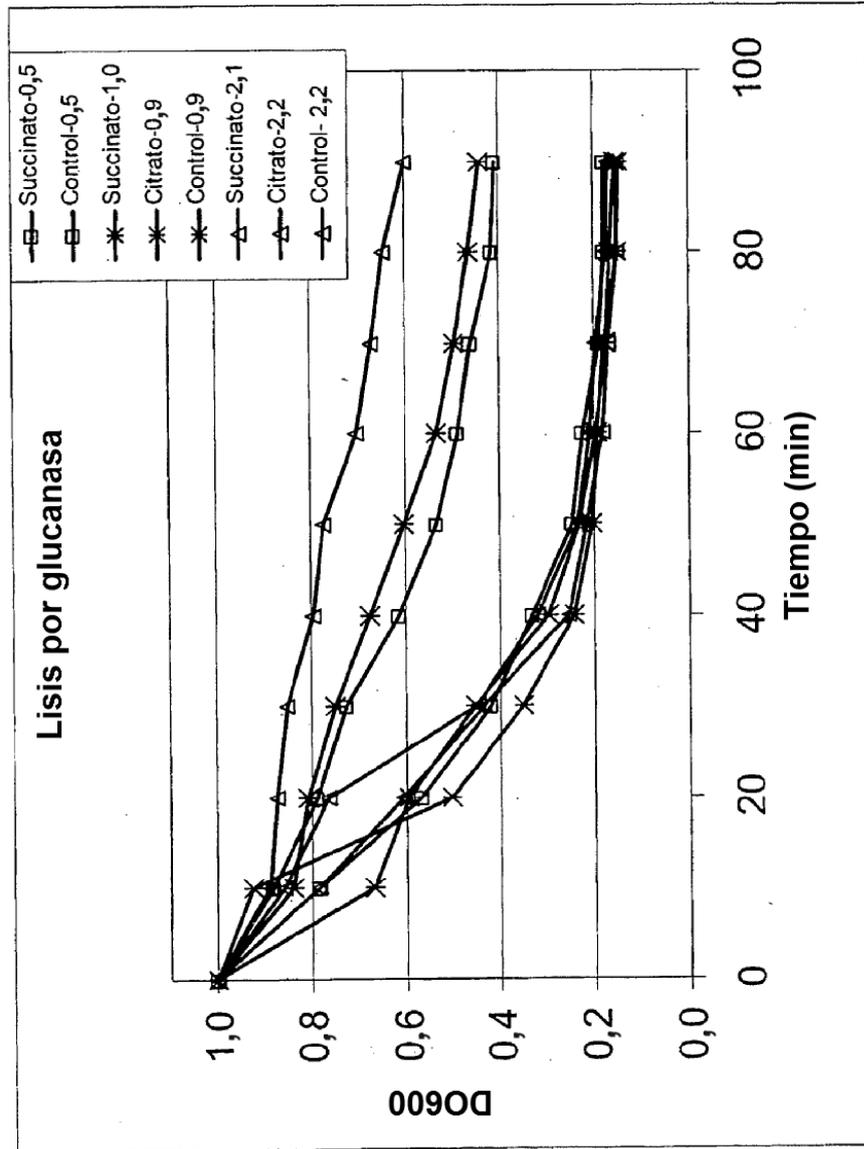


Figura 5 Estudio de formulación de medios

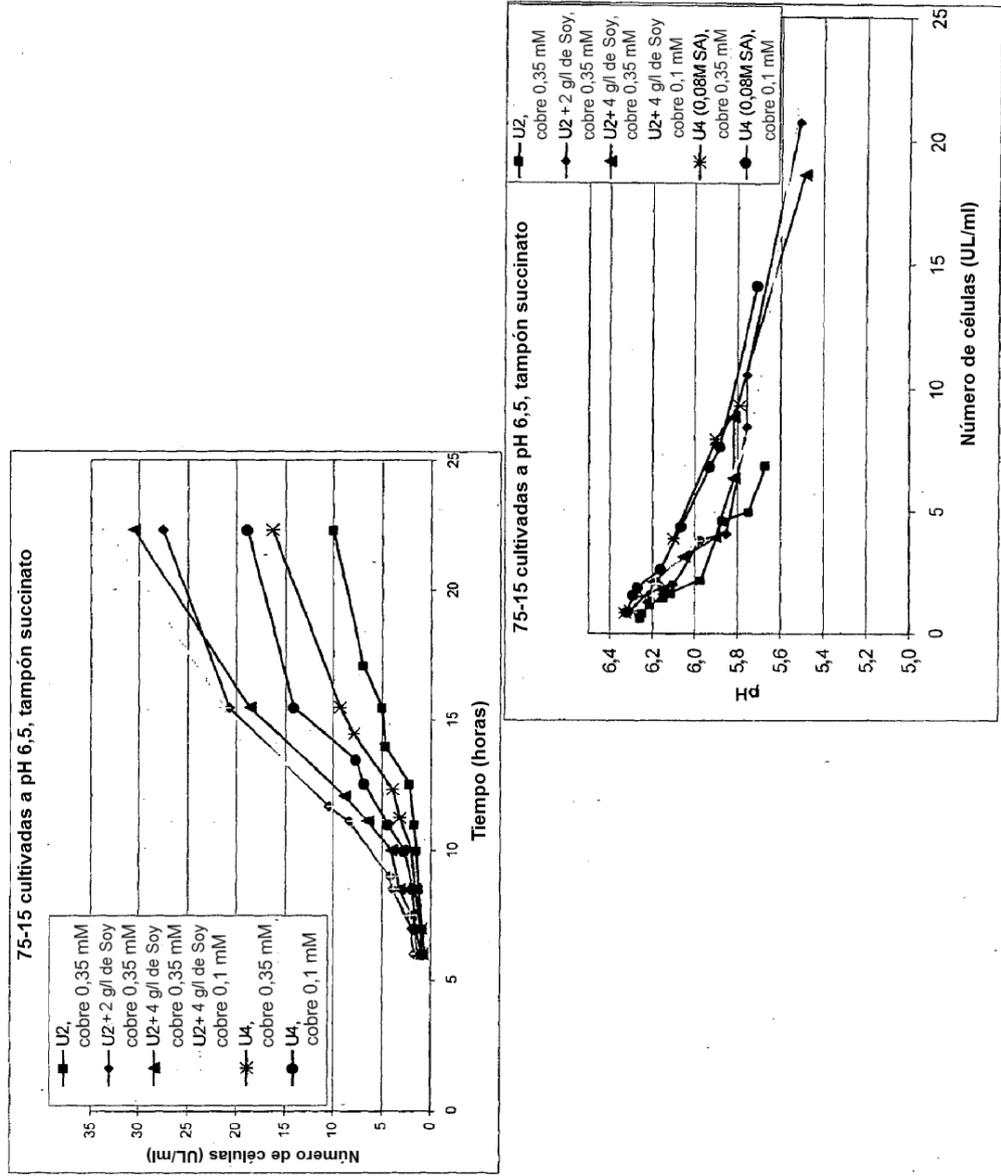


Figura 6 Detección de la expresión de HA de levadura

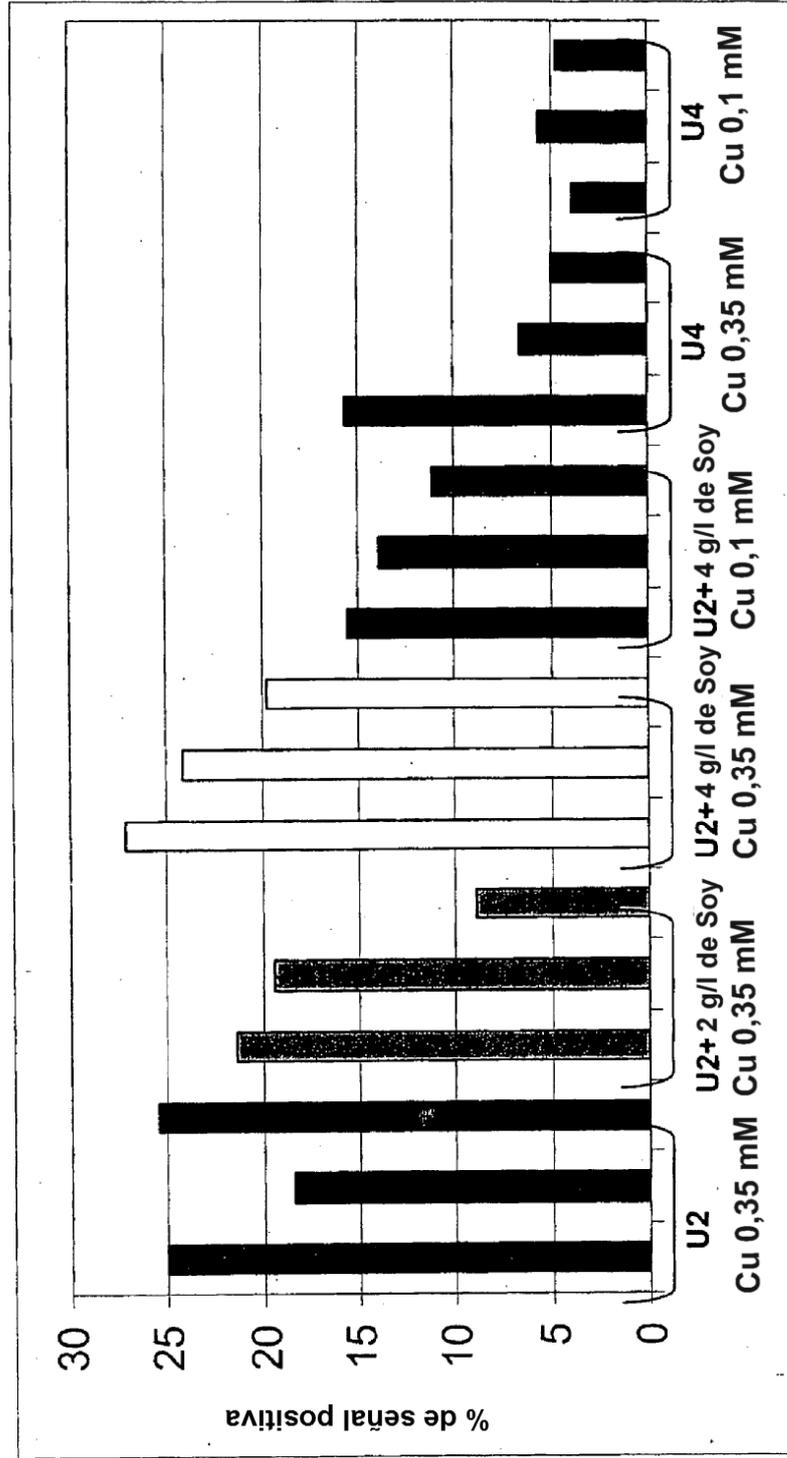
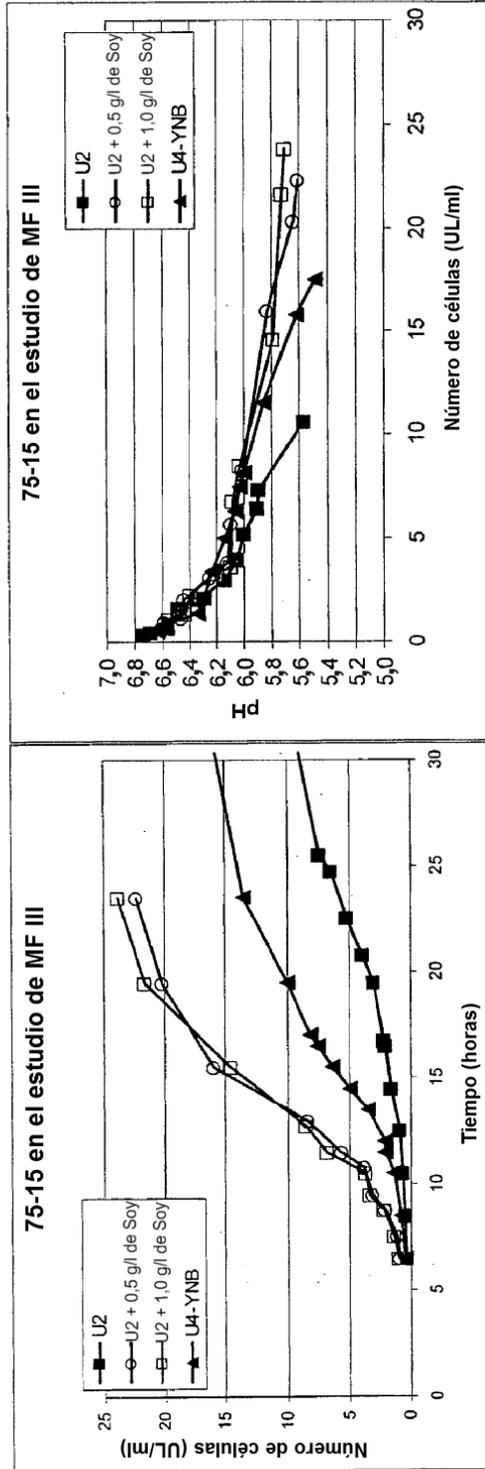


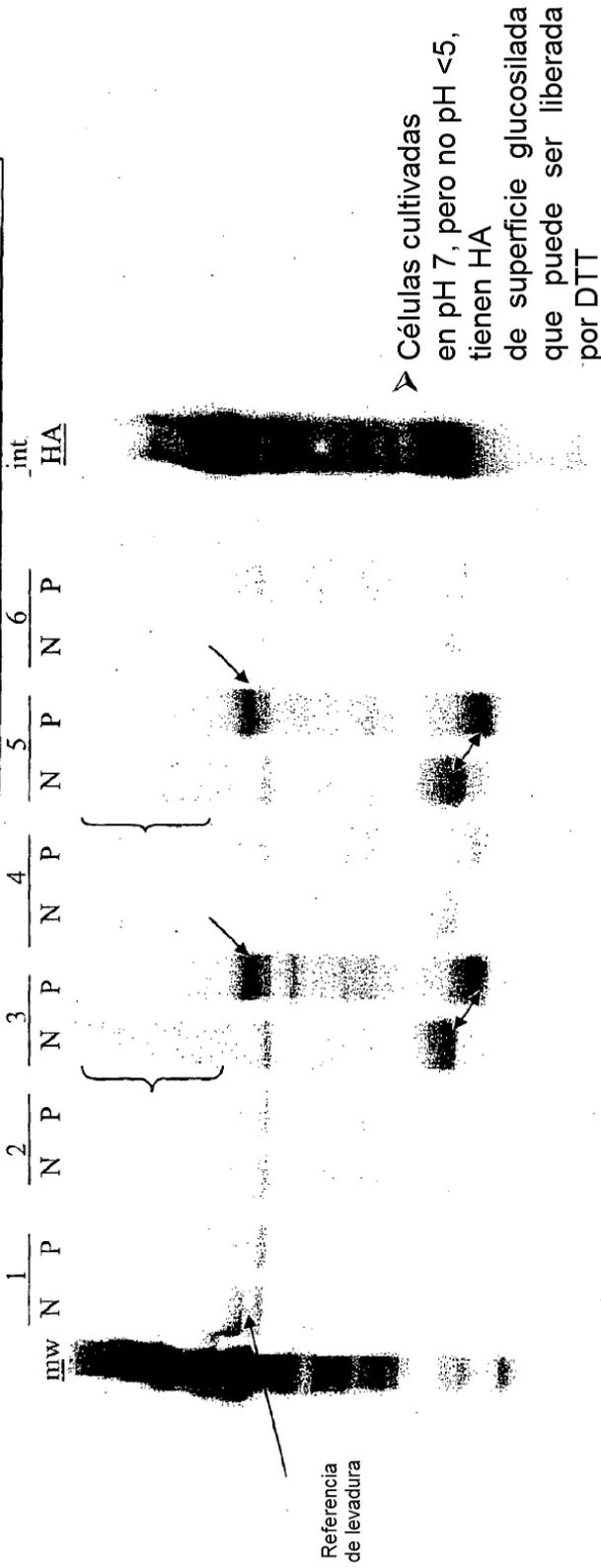
Figura 7 Estudio de formulación de medios sobre el crecimiento celular y perfiles de pH



Medios	Tiempo de duplicación (horas)	Número de células en el "pico"	Número cuando pH = 6
U2	4,0	~7 UL/ml	5 UL/ml
U4-YNB	2,5	~10 UL/ml	8 UL/ml
U2 + 0,5 g/l de Soytone	2,0	~15 UL/ml	8 UL/ml
U2 + 1,0 g/l de Soytone	2,0	~15 UL/ml	8 UL/ml

Figura 8 El efecto de los niveles de pH del medio sobre antígeno

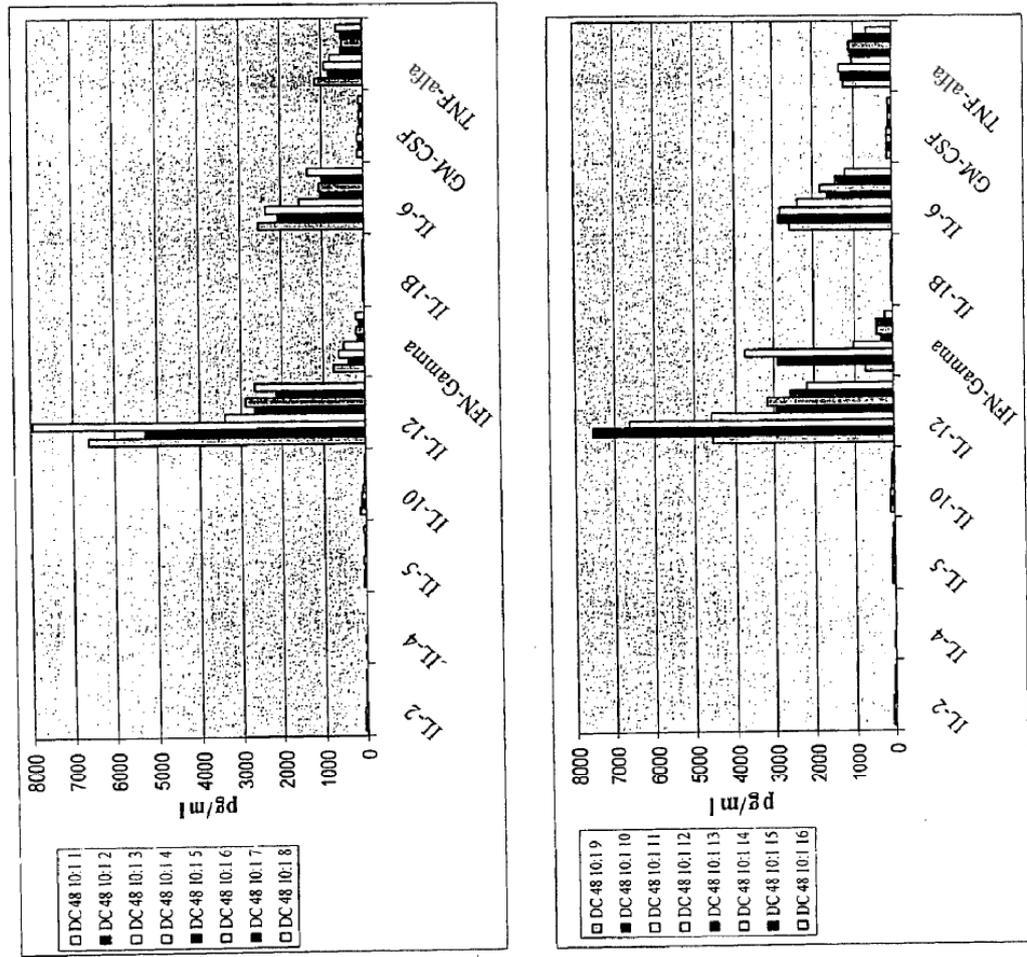
Cultivadas en BT-UDM (pH 6,7-6,8 en la recogida)	Cultivadas en UDM (pH 4,0-4,3 en la recogida)
1 - YEX con Cu2+	2 - YEX con Cu2+
3 - GIB103	4 - GIB103
5 - GIB103 con Cu2+	6 - GIB103 con Cu2+



mAb anti-His de Novagen 1:1000

NB 126-51

Figura 9 El efecto del pH neutro sobre la producción de citocinas



Vivas frente a H-K
Cultivadas a pH bajo
CD 10:1 48 h

Muestra n°	Densidad de recogida
9, 13	0,6 UL/ml
10, 14	2,6 UL/ml
11, 15	3,3 UL/ml
12, 16	6 UL/ml

Vivas frente a H-K
Cultivadas a pH neutro
CD 10:1 48 h