

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 690 792**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/81** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

**A61K 39/12** (2006.01)

**A61K 39/02** (2006.01)

**G01N 33/569** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.12.2012 PCT/DE2012/001205**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.07.2013 WO13107436**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2012 E 12823073 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.07.2018 EP 2844759**

54 Título: **Vacunación por medio de levadura recombinante mediante generación de una respuesta inmunitaria humoral protectora contra antígenos definidos**

30 Prioridad:

**13.12.2011 DE 102011121069**

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

**22.11.2018**

73 Titular/es:

**MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT HALLE-  
WITTENBERG (100.0%)  
Universitätsplatz 10  
06108 Halle/Saale, DE**

72 Inventor/es:

**BREUNIG, KARIN y  
BEHRENS, SVEN-ERIK**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 690 792 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

Vacunación por medio de levadura recombinante mediante generación de una respuesta inmunitaria humoral protectora contra antígenos definidos

5

**Campo de la invención**

La invención se refiere a levaduras recombinantes de la especie *Kluyveromyces lactis*, que contienen el antígeno VP2 del virus de la bursitis infecciosa (IBDV), codificado por un gen exógeno integrado en el genoma de levadura, para la generación de una respuesta inmunitaria humoral, a la producción de estas levaduras y a su uso para la vacunación protectora contra patógenos que contienen estos antígenos.

10

**Estado de la técnica**

Las vacunas se emplean para prevenir enfermedades (vacunas preventivas) o para tratar enfermedades establecidas (vacunas inmunoterapéuticas). Los programas de vacunación preventiva han contribuido en los últimos, aproximadamente, 100 años, esencialmente a la reducción de enfermedades infecciosas. Las vacunas inmunoterapéuticas se desarrollan y emplean ya desde hace aproximadamente 20 años, por ejemplo contra infecciones persistentes con virus, bacterias o parásitos o contra enfermedades cancerígenas. El fin de la vacunación es la inducción de una respuesta inmunitarias celular (es decir esencialmente mediadas por células T y NK) y/o humorales (es decir esencialmente mediadas por células B/anticuerpos) así como de una memoria inmunológica ("*memory*") contra componentes antigénicos de patógenos o células malignas (tumorigénicas).

20

Las vacunas clásicas contienen los agentes patógenos totales en forma atenuada (inactivada) o forma muerta, inclusive sus materiales genéticos, ácidos nucleicos en forma de ADN o ARN. Estas vacunas clásicas necesitan para la producción en la mayoría de los casos medidas de seguridad especiales y/o el uso de animales de ensayo y/o el uso de cultivos celulares; además, con frecuencia tienen que almacenarse y transportarse de manera costosa y con el uso de cadenas de refrigeración. Además tienen el riesgo de que las sustancias a partir de la producción (por ejemplo a partir del animal de ensayo o del cultivo celular) generan efectos secundarios en el individuo vacunado o que se producen reactivaciones indeseadas del patógeno. Existen problemas también en el diagnóstico: de este modo, por ejemplo en el caso de la vacunación de animales útiles, los animales vacunados no se diferencian de animales infectados naturalmente, de modo que puede fallar el sistema de alarma preventiva, lo que se basa en la detección de nuevas infecciones. Por lo tanto, se desarrollaron las denominadas vacunas "de subunidad", que contienen solamente partes del patógeno. Una condición para ello es que los "antígenos principales" del agente patógeno respectivo sean conocidos. Los antígenos principales son en la mayoría de los casos constituyentes de superficie del patógeno, que pueden reconocerse por el sistema inmunitario, por ejemplo proteínas de una cubierta vírica o de la cápside vírica. Estos pueden también inducir en ausencia de una partícula de virus completa, una respuesta inmunitaria humoral y/o celular y una memoria inmunológica en el huésped contra el virus. Dado que en la "vacunación de subunidad" faltan así constituyentes típicos del patógeno, mediante un diagnóstico diferencial pueden diferenciarse individuos vacunados de infectados naturalmente; se habla por lo tanto también de una "vacuna marcadora de subunidad". Las desventajas de muchas vacunas de subunidad son una producción con frecuencia costosa y una inmunogenicidad con frecuencia insuficiente: mientras que los agentes patógenos pueden cultivarse de manera autoeficiente (con las limitaciones expuestas anteriormente), sus antígenos principales tienen que producirse por ingeniería genética mediante procedimientos de coste elevado y en la mayoría de los casos ineficientes y purificarse de manera costosa. Las vacunas de subunidad así obtenidas son correspondientemente sensibles, asimismo tienen que almacenarse y transportarse con frecuencia de manera refrigerada y tienen un bajo tiempo de conservación. Por estos motivos, una gran parte de las vacunas colectivas se basa aún en el principio clásico con agentes patógenos completos. Por ejemplo, la mayoría de las vacunas contra la enfermedad aviar ampliamente extendida, bursitis infecciosa (IBD) se basan hoy en día en su mayoría en virus atenuados (debilitados) o inactivados del virus que desencadena la IBD de la bursitis infecciosa (IBDV).

50

El problema de la inmunogenicidad más debilitada en las vacunas de subunidad se intenta compensar mediante el uso adicional de adyuvantes. Los adyuvantes son sustancias que han resultado empíricamente ser inmunomoduladoras. Estos refuerzan de manera no específica y con frecuencia de manera poco entendida, la reacción inmunitaria. Hasta el momento, solo están permitidos pocos adyuvantes para el uso humano. Los únicos excipientes que están permitidos por ejemplo en los EE. UU. para el uso en el ser humano son sales de aluminio, hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio. No obstante, las formulaciones de sal de aluminio provocan dificultados adicionales en el almacenamiento de la vacuna en cuestión. Además, estos adyuvantes no despliegan con todos los antígenos una eficacia suficiente.

60

La producción mediante ingeniería genética de proteínas exógenas, entre las que figuran la mayoría de las vacunas de subunidad, puede tener lugar en distintas células huésped. Además de la bacteria intestinal *Escherichia coli* se han establecido como sistemas huésped células de mamífero, que pueden proliferar en cultivos celulares, células vegetales y distintos hongos. Los sistemas microbianos tales como bacterias y hongos pueden cultivarse a gran escala de manera especialmente económica. Las células de levadura de los géneros de levadura *Saccharomyces*, *Pichia* y *Kluyveromyces* se emplean ya desde hace décadas de manera rutinaria para la expresión de proteínas

65

exógenas. Las células de levadura tienen, con respecto a las bacterias, la ventaja de que son eucariotas, es decir igualan en muchos aspectos a las células animales, y proteínas eucariotas, es decir proteínas, que se forman en células animales y/o tienen que ser funcionales, pueden producirse de manera económica en levadura en forma nativa o casi nativa (Bathurst, 1994; Gellissen & Hollenberg, 1997). Las levaduras se usaron en primer lugar solo para producir las proteínas exógenas, y las proteínas se purificaron a partir de las células de levadura y se emplearon como vacunas de subunidad. Solo desde hace poco tiempo se intenta administrar levaduras en sí o fracciones celulares de las levaduras como vacunas.

Desde hace aproximadamente 5 años, se intenta emplear *Saccharomyces cerevisiae* ("levadura de panificación", *S. cerevisiae*) en sí para la vacunación: de este modo pudo mostrarse que mediante células que expresan antígeno, administradas por vía subcutánea, de *S. cerevisiae*, pueden activarse células dendríticas y generarse respuestas inmunitarias de células T específicas de antígeno, en especial respuestas de células T citotóxicas contra determinados antígenos. Esta respuesta inmunitaria celular resulta ser protectora con respecto a la administración de determinadas células tumorales, es decir generada en animales vacunados a continuación de la vacunación de menos tumores que en los animales control. Este procedimiento se somete a prueba actualmente en aplicaciones inmunoterapéuticas en enfermedades tumorales (Stubbs et al., 2001; Lu et al., 2004).

El experto en la materia conoce las siguientes fuentes del estado de la técnica, en las que se describe una vacunación a base de levadura: una serie de patentes de los EE. UU., así por ejemplo 20090304741, 5830463 y 10738646 y 20070166323 describen el uso de *S. cerevisiae* que contienen al menos un antígeno recombinante, en la inmunoterapia. Se mostró que estas levaduras son efectivas para estimular una reacción inmunitaria, en particular una reacción inmunitaria mediada por células.

El documento WO 90/15140 divulga la inmunización de pollos con antígeno de IBDV recombinante. Este se obtuvo a partir de *Kluyveromyces lactis*, en el que se expresó el antígeno. Sin embargo, el documento WO 90/15140 divulga solamente cepas de *K. lactis*, en las que el antígeno de IBDV se expresa por medio de vectores de plásmido, no cepas de *K. lactis*, en las que el gen que expresa antígeno está integrado de manera estable en el genoma y puede expresarse de manera inducible (tema de la solicitud).

El documento WO/2006/044923 divulga una levadura (*S. cerevisiae*) que expresa de manera recombinante las distintas proteínas del virus de la hepatitis C (VHC), y que puede desencadenar una reacción inmunitaria, principalmente una respuesta de células T, contra estas proteínas de VHC y se empleará como vacuna contra la hepatitis C crónica.

El documento WO/2007/092792 describe el uso posible de *S. cerevisiae* recombinante contra infecciones por virus de la gripe, usándose una combinación de distintas cepas de levadura, cuya aplicación lleva a una inducción de células T, es decir a una respuesta inmunitaria celular.

El documento WO/2011/032119 se refiere a un procedimiento para la mejora de la eficacia de una inmunoterapia a base de levadura en pacientes. El procedimiento comprende un agente a base de levadura que modula la producción o la supervivencia de células TH17 CD4+.

En ninguna de las patentes accesibles se emplea levadura de manera demostrable para la inducción de una respuesta inmunitaria humoral protectora contra enfermedades infecciosas o tumorales (tema de esta solicitud).

Tal como *S. cerevisiae*, también la "levadura láctica" *Kluyveromyces lactis* (*K. lactis*) tiene el estado GRAS (GRAS: *generally regarded as safe* (generalmente considerado como seguro)), es decir es adecuada para la aplicación en animales o seres humanos (van Ooyen et al. 2006). Aunque morfológicamente son muy similares a la levadura de panificación *S. cerevisiae*, las líneas de desarrollo de los dos géneros se han desarrollado hace más de 100 millones de años por un precursor común en diferentes direcciones. *K. lactis* se diferencia por lo tanto en muchas propiedades fundamentalmente de *S. cerevisiae*. Algunas de estas diferencias son de gran importancia para la aplicabilidad en aplicaciones de biotecnología. La evolución de *S. cerevisiae* conllevaba la especialización del metabolismo en la fermentación alcohólica y con ello la pérdida de muchos genes de los precursores. No obstante, la fermentación alcohólica es atípica para la mayoría de las levaduras. Esta tiene lugar en *S. cerevisiae* a altas concentraciones de glucosa también cuando está presente oxígeno y la respiración mitocondrial permitiera verdaderamente un rendimiento energético mucho más eficiente a partir de la conversión de azúcar: la función de las mitocondrias, las "centrales energéticas" de la célula, se suprime en su mayor parte mediante "represión de glucosa". *K. lactis* se diferencia considerablemente de *S. cerevisiae* en la regulación de la función de las mitocondrias (Chen y Clark-Walker, 1995, Clark-Walker, 2007). *K. lactis*, en contraposición a *S. cerevisiae* pertenecen a las levaduras denominadas "Crabtree negativas". Las levaduras de este tipo no forman, en condiciones estrictamente aeróbicas, por regla general, nada de etanol sino que degradan la glucosa por completo para dar CO<sub>2</sub> a través de la actividad mitocondrial con la formación de ATP. Esta propiedad fisiológica es de importancia fundamental, dado que esta lleva a un aumento claro del rendimiento de biomasa en fermentaciones a gran escala, lo que tiene como consecuencia una clara reducción de costes en el uso de estas levaduras como productoras de proteínas recombinantes. Además, estudios en *K. lactis* han mostrado que mutaciones en la ruta de señalización de glucosa mediada por hexocinasa pueden mejorar la expresión de genes heterólogos (Donnini et al., 2004). Una

represión de glucosa reducida, en particular de genes respiratorios, es una característica de las levaduras "Crabtree negativas" y podría estar relacionada con la mejor expresión de gen exógeno observada empíricamente en tales levaduras.

5 *K. lactis* y *S. cerevisiae* presentan además diferencias considerables en la composición de los glucanos de la pared celular (Backhaus et al., 2011); estas diferencias se basan presumiblemente en diferentes glicosil transferasas en el aparato de Golgi, que participan en la maduración de glicoproteínas: Así, las glicoproteínas en *S. cerevisiae* contienen con frecuencia manosa-fosfatos, las glicoproteínas en *K. lactis* principalmente N-acetilglucosaminas terminales (Raschke y Ballou, 1972). Ha de suponerse que estas diferencias entre *S. cerevisiae* y *K. lactis* en la glicosilación y secreción de proteína así como en la biosíntesis de la pared celular tienen una influencia considerable sobre la localización intracelular, el plegamiento así como la estabilidad y por lo tanto también sobre la inmunogenicidad de proteínas exógenas expresadas de manera heteróloga (Uccelletti et al., 2004).

15 El documento WO/2010/054649 describe la producción de un sistema recombinante de *K. lactis*. En los ejemplos de aplicación indicados en ese documento se emplearon cepas recombinantes, que se habían derivado de la cepa VAK367-D4, para la vacunación mucosa u oral contra distintos antígenos. No obstante, una desventaja de la vacunación oral/mucosa es que las vacunas tienen que emplearse en grandes cantidades para conseguir una inmunización protectora.

## 20 Descripción de las figuras

25 **La Figura 1** muestra esquemáticamente la producción de la cepa vacunal VAK887, que porta el gen exógeno VP2 de IBDV, a través de recombinación homóloga en la cepa de partida VAK367-D4. A través de la transformación del plásmido Klp3-MCS (SEQ ID NO: 10), que contenía el gen VP2 de la cepa de IBDV D78, se insertó el gen VP2 exógeno a través de recombinación homóloga en el locus LAC4 cromosómico, que se había destruido mediante inserción del gen *URA3*. En la recombinación en el genoma del huésped se sustituyó el gen *URA3* por el gen VP2 y se produjo de nuevo el gen *LAC4*; cepas de levadura recombinantes pudieron obtenerse mediante selección en medio de lactosa sin uracilo. A continuación se controla la expresión de *LAC4* ( $\beta$ -galactosidasa) a través del promotor de *KIGAL80*, la expresión del gen VP2 a través del promotor de *LAC4*.

30 **La Figura 2A** muestra la expresión de VP2 de IBDV mediante la cepa VAK887 en comparación con la cepa original (VAK367) y en comparación con células de pollo infectadas con IBDV por medio de análisis de tipo Western con un anticuerpo específico de VP2.

35 **La Figura 2B** muestra el análisis de expresión de VP2 de IBDV recombinante o VP2-T2S de IBDV mutado en distintas variantes de *K. lactis* que expresan VP2. La variante VP2 de *K. lactis* original (VAK887) expresaba solamente cantidades moderadas de proteína viral. La expresión de proteína VP2 pudo aumentarse en la cepa de *K. lactis* VP2-T2S (VAK888), intercambiándose treonina en la posición de aminoácido 2 de la proteína VP2 por serina. Un aumento adicional pudo conseguirse mediante el aumento de la dosis de gen *KIGAL4* (VP2-T2S\_GAL4 = VAK890) o mediante el uso de un gen VP2 sintético optimizado por codón de levadura (oVP2-T2S = VAK910).

45 **La Figura 3** muestra que la inactivación por calor de las levaduras de acuerdo con la invención a 90° C durante 2 horas no lleva a una pérdida de la proteína VP2-T2S recombinante (Figura 3A). Se separaron en cada caso cantidades de proteína iguales a partir de levadura no inactivada, levadura inactivada y levadura de un gránulo de pienso en una SDS PAGE y en comparación con lisados celulares de células de ave, que se habían infectado con IBDV o no se habían infectado, se sometieron a prueba a una inmunotransferencia de tipo Western con un anticuerpo anti-VP2. La Figura 3 muestra además que la cantidad de VP2-T2S en la variante VAK890 asciende aproximadamente a 0,7 fg de proteína heteróloga por célula de levadura (Figura 3B). En este caso se tiñeron cantidades definidas de VP2-T2S purificado en comparación con VP2 de un número de células definido en el fermentador de *K. lactis* extraída (cepa VAK890) en la inmunotransferencia de tipo y el resultado se evaluó por densitometría.

55 **La Figura 4** explica la vacunación en ratones con células de levadura completas, inactivadas por calor, aplicadas por vía subcutánea, de la variante de *K. lactis* VAK890 en comparación con la vacunación oral con células de levadura completas de la variante *K. lactis* VAK890. La Figura 4A muestra el calendario de inmunización: se inmunizó tres veces por vía subcutánea, con respectivamente dos semanas de pausa; en comparación se alimentó dos veces durante dos semanas. Dos semanas (flecha) después de la última aplicación de levadura se examinaron muestras de suero de los ratones tratados en un ELISA específico de IBDV (Figura 4B) y en un ensayo de neutralización de IBDV en cuanto a la presencia de anticuerpos anti-VP2 (Figura 4C). La Figura 4D resume que ratones, que se trataron con *K. lactis* que expresaba VP2 (cepa KI VP2-T2S\_GAL4 (VAK890)), presentan títulos claramente más altos de anticuerpos/anticuerpos neutralizantes que ratones que se trataron con el tipo natural de *K. lactis* (cepa VAK367). Además se mostró que *K. lactis* (cepa VAK890) aplicada por vía subcutánea presentan títulos claramente más altos de anticuerpos/anticuerpos neutralizantes que ratones que se alimentaron con *K. lactis* (cepa VAK890). Los ratones, que se inmunizaron por vía oral con *K. lactis* (cepa 890), mostraron no obstante también un título elevado de anticuerpos/anticuerpos neutralizantes en comparación con

ratones que se trataron tipo natural de *K. lactis* (cepa VAK367).

La **Figura 5** muestra la vacunación oral y subcutánea en pollos con células de levadura completas, inactivadas por calor de la variante de *K. lactis* VP2-T2S\_GAL4 (VAK890). Para la vacunación oral se empleó o bien un calendario corto 1/1/1/1/1 (1 semana de alimentación, 1 semana de pausa, 1 semana de alimentación, etc.) o un calendario más largo 2/2/2 (Figura 5A). Después de 1 semana o 2 semanas de pausa después de la vacunación (Figura 7A), se infectaron todos los animales tratados con IBDV (cepa Edgar) en una concentración de 100 EID50 por animal (provocación con virus; barras negras). Después de la vacunación oral, en particular después del empleo del calendario de tratamiento prolongado, pudieron detectarse en varios animales títulos elevados de anticuerpos neutralizantes de virus. La vacunación subcutánea con *K. lactis* recombinante por el contrario generó altos títulos de anticuerpos neutralizantes de virus en todos los animales tratados (Figura 5B, C; ELISA específica de IBDV, ensayo de neutralización de IBDV). Ninguno de los animales tratados con levadura *K. lactis-levadura* recombinante murió tras la infección con IBDV, independientemente de qué calendario de tratamiento se empleó. En contraposición a esto, la tasa de mortalidad en el grupo control ascendió al 10-35 % (Figura 5C). El análisis de las lesiones en las bolsas de los animales tratados mostró que aproximadamente el 10 % de los animales tratados por vía oral después de emplear el calendario de tratamiento prolongado, no mostraron signo alguno de infección por virus tras la inoculación con IBDV: a este respecto se usó una denominada "puntuación de lesiones" – las puntuaciones 1, 2 indican ninguna bolsa o apenas bolsas dañadas; las puntuaciones 3, 4 indican bolsas dañadas y fuertemente dañadas. En contraposición a esto, todos los animales en los que se aplicó por vía subcutánea la cepa de *K. lactis* recombinante VAK890, mostraron una protección por vacuna completa contra IBDV (Figura 5C).

La **Figura 6** muestra esquemáticamente la estructura del vector Klp3-MCS (**SEQ ID NO: 10**).

#### Descripción de la invención:

La posibilidad del empleo de levaduras recombinantes para la vacunación subcutánea es conocida por el experto en la materia a partir del estado de la técnica: Stubbs et al., (2001) Nat. Med. 7: 625-629; Stubbs y Wilson (2002) Curr. Opin. Mol. Ther. 4: 35-40; Wansley et al., (2008) Clin. Cancer Res. 14: 4316-4325; documentos US 5.830.463, WO/2006/044923; WO/2007/092792 y WO/2011/032119. En los ejemplos de realización de estas publicaciones se trabajó no obstante exclusivamente con la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. "Levadura" es un concepto genérico para microorganismos eucariotas que crecen de manera unicelular con, en parte, propiedades muy diferentes debido a la evolución divergente a lo largo de cientos de millones de años (aproximadamente 100 millones de años para *S. cerevisiae* y *K. lactis*). En el caso del uso de *S. cerevisiae* y *K. lactis* con el fin de la vacunación en eucariotas superiores tales como animales o seres humanos, ha de suponerse por lo tanto que una respuesta inmunitaria desencadenada por *S. cerevisiae* se diferencia fuertemente de una respuesta inmunitaria desencadenada por *K. lactis*. Esto es válido tanto para la respuesta inmunitaria contra genes exógenos expresados en la levadura como para la respuesta inmunitaria contra antígenos propios de levadura. En el caso de inmunizaciones por vía subcutánea con células completas de *S. cerevisiae*, se generó una inducción de células T, es decir una respuesta inmunitaria celular. Una respuesta inmunitaria humoral, protectora contra un antígeno con *S. cerevisiae* recombinante de manera sencilla (es decir mediante aplicación directa de una cepa que expresa antígeno individual) no se probó hasta el momento en el estado de la técnica.

Partiendo de los antecedentes expuestos en lo anterior, se planteó el objetivo de proporcionar un procedimiento con el que pueda generarse una respuesta inmunitaria humoral, protectora, contra el antígeno VP2 del virus de la bursitis infecciosa (IBDV). Otro objetivo consistía en producir una vacuna marcadora de subunidad, con la que es posible diferenciar individuos vacunados frente a individuos infectados naturalmente. Otro objetivo consistía en producir una vacuna marcadora de subunidad que presenta al mismo tiempo propiedades fuertemente adyuvantes y por lo tanto es fuertemente inmunógena. Estos objetivos se consiguieron mediante la provisión de una levadura recombinante de la especie *Kluyveromyces lactis*, que como gen exógeno porta un gen, que codifica para un antígeno VP2 del virus de la bursitis infecciosa (IBDV), que está integrado en el genoma de la levadura, y que permite la expresión del antígeno VP2 del virus de la bursitis infecciosa (IBDV) como proteína exógena, caracterizado por que esta cepa de *Kluyveromyces lactis* se selecciona de:

*Kluyveromyces lactis* DSM 25405,  
*Kluyveromyces lactis* DSM 25406, y  
*Kluyveromyces lactis* DSM 25407.

La cepa de partida VAK 367-D4 (DSM 23097) usada para la producción de estas cepas permite la integración dirigida del gen para la expresión del antígeno VP2 del virus de la bursitis infecciosa (IBDV) como gen exógeno en el genoma de levadura. Las levaduras recombinantes, que expresan este gen exógeno, pueden producirse con este sistema rápidamente (es decir en el plazo de pocas semanas). Las levaduras pueden proliferar de manera económica en el fermentador en grandes cantidades (por ejemplo en el intervalo de kilogramos (kg)). Mediante la expresión regulada y fermentación en el procedimiento de lote alimentado (*fed-batch*) pueden expresarse también antígenos citotóxicos en este sistema de levadura. Después de la expresión del gen exógeno, se inactiva por calor la levadura y puede entonces almacenarse y transportarse como polvo sin refrigerar. El polvo de levadura puede

emplearse directamente, es decir sin fraccionamiento adicional, o bien como emulsión o como microgránulo (véanse los ejemplos de realización) como vacuna marcadora de subunidad. La formulación de antígeno y el efecto adyuvante necesario para la inmunización efectiva, es decir protectora, se garantizan por dos factores: (i) por la posibilidad de la modificación por ingeniería genética dirigida de la proteína exógena expresada, (ii) por la expresión de la proteína exógena en la levadura y el empleo directo de la levadura en forma oral o subcutánea; la levadura en sí tiene un fuerte efecto adyuvante. Se prefiere la aplicación subcutánea. Se produjo una cepa de levadura recombinante; esta expresa un antígeno de virus específico y puede usarse en el procedimiento de acuerdo con la invención para la vacunación por vía subcutánea. Se consiguió una protección preventiva completa contra una infección por el virus en cuestión. A este respecto se emplearon solamente pequeñas cantidades de levadura (por ejemplo en el intervalo de miligramos (mg) en el empleo por vía subcutánea en aves). Fue necesario solamente un empleo de 2-3 veces para alcanzar esta protección. El procedimiento de acuerdo con la invención es adecuado tanto para el empleo en el ámbito de la medicina humana como en el ámbito de la medicina veterinaria. Se prefiere el empleo del procedimiento de acuerdo con la invención en el sector de la medicina veterinaria.

El procedimiento de acuerdo con la invención se lleva a cabo con la levadura *Kluyveromyces lactis*.

La levadura *K. lactis* pertenece a las levaduras denominadas "food grade" (de grado alimentario), que tienen el estado GRAS (GRAS: *generally regarded as safe* (generalmente considerado como seguro)). Tal como la levadura de panificación, que se ha probado y ha dado buen resultado como aditivo alimentario a lo largo de miles de años, también la levadura *K. lactis* frecuentemente presente en la producción de productos lácteos para la industria alimentaria, es considerada inocua.

Además de la posibilidad explicada en "estado de la técnica" para la fermentación, la levadura *K. lactis* presenta numerosas ventajas con respecto a *S. cerevisiae* en cuanto a la expresión de genes heterólogos. *K. lactis* pertenece a las levaduras denominadas "petite negative", es decir, la pérdida del ADN mitocondrial es letal (debido al colapso del potencial de membrana mitocondrial (Chen et al., 1995; Clark-Walker, 2007)). La función mitocondrial está estrechamente acoplada a la transmisión de señales dependiente de  $eCa^{2+}$ , la producción de compuestos de oxígeno reactivos, la respuesta al estrés de la célula, la glicosilación de proteína y la integridad de la pared celular. De esta manera, la función mitocondrial influye decisivamente en la producción de glicoproteínas recombinantes y en la composición de la pared celular.

En las levaduras y mamíferos, las primeras etapas de la N-glicosilación de proteínas, que tiene lugar en el retículo endoplasmático, son iguales. No obstante, las etapas que tienen lugar en el aparato de Golgi son diferentes una de otra. Las glicosiltransferasas presentes en el aparato de Golgi son distintas en las diferentes especies de levadura. De esta manera se producen diferencias en la composición de las glicoproteínas en la pared celular. En *K. lactis*, las glicoproteínas presentan N-acetilglucosaminas terminales, en contraposición a manosa-fosfato en *S. cerevisiae*. (Raschke y Ballou, 1972). Esto podía tener repercusiones considerables en las vacunaciones sobre la estimulación del sistema inmunitario mediante las especies de levadura respectivas.

La secreción mejorada de proteínas recombinantes en mutantes de *K. lactis* con  $\alpha$ 1,6-manosil-transferasa modificada (*KIOCH1*) aclara la unión entre glicosilación de proteína/secreción y biosíntesis de la pared celular (Uccelletti et al., 2004). Las modificaciones en la glicosilación de proteína influyen además en la localización intracelular de proteínas recombinantes, que se retienen en la ruta a la secreción debido a un plegamiento erróneo.

*K. lactis* es una de las pocas especies de levadura que pueden aprovechar lactosa como fuente de carbono y de energía. La lactosa es un azúcar barato, que se produce como componente del suero de la leche en altas cantidades (por ejemplo como subproducto en la industria láctea). *K. lactis* puede alcanzar con lactosa tasas de crecimiento similares que con glucosa. La regulación de los genes que participan en el metabolismo de la lactosa se estudió intensamente. El promotor de  $\beta$ -galactosidasa fuerte (*LAC4*) puede usarse para la regulación de la expresión de genes heterólogos y producción de proteínas recombinantes. (van Ooyen et al., 2006, Breunig et al., 2000). Debido a la represión de glucosa reducida, la expresión heteróloga de genes en cultivos de *K. lactis*, que se cultivaron en medio que contiene glucosa, puede inducirse de manera rápida y eficiente mediante la adición de lactosa.

De acuerdo con la invención, a través de procedimientos de ingeniería genética se generaron las cepas de *K. lactis* mencionadas en la reivindicación 1, que representan variantes de la cepa *VAK367-D4*, que permiten la integración dirigida de genes exógenos en el locus *LAC4* del genoma de levadura (**Figura 1**). Esta integración requiere solamente una etapa a través de un plásmido construido de manera correspondiente; una selección de cepas recombinantes es posible sin el uso genes de resistencia a antibióticos, y la expresión de gen exógeno en las cepas recombinantes puede inducirse a través de los promotores *LAC4* mediante la adición de lactosa al medio. Células de *K. lactis* con genes exógenos integrados pueden generarse y caracterizarse a través de este método en pocas semanas. Ambos aspectos de este sistema son de gran importancia: por un lado es de este modo posible el cultivo reproducible de células de levadura que contienen en cada caso cantidades definidas de una proteína exógena (**Figuras 2, 3**). Mediante la integración adicional de genes del transactivador de *KiGal4* en el genoma de levadura puede aumentarse de manera significativa además la tasa de expresión del gen exógeno (Kuger et al., 1990).

En otra forma de realización, la invención se refiere a los derivados mencionados en la reivindicación 1 de la cepa de *K. lactis* VAK367-D4 para su uso en un procedimiento para la vacunación subcutánea. Se generó una serie (VAK) de variantes recombinantes basadas en la cepa de *K. lactis* VAK367-D4. En general, estas variantes expresan de manera inducible cantidades significativas de una proteína exógena, o dominios de esta proteína exógena, o dominios de esta proteína exógena fusionados con dominios de proteína de otra especie. Los dominios de proteína de otra especie emparentados a este respecto sirven para la estimulación dirigida de la respuesta inmunitaria (adyuvante) o de la compartimentación dirigida de la proteína exógena expresada en la célula de levadura. Además de los efectos adyuvantes, la compartimentación de la proteína exógena expresada es importante para la optimización de la expresión o la formulación del producto de expresión.

En otra forma de realización, el procedimiento de acuerdo con la invención se lleva a cabo con derivados de VAK367-D4 para su uso como vacuna marcadora de subunidad. El uso de *K. lactis* recombinantes, que expresan solamente antígenos de proteína definidos (proteínas exógenas), como vacuna permite en un diagnóstico diferencial la discriminación de individuos vacunados con respecto a individuos infectados naturalmente. Una de estas cepas de *K. lactis* recombinantes (véanse los ejemplos de realización) se empleó con éxito para la vacunación por vía oral y por vía subcutánea. En el caso del empleo por vía subcutánea se obtuvo una protección completa de los individuos que se van a vacunar.

Como "proteína exógena" en el sentido de esta invención quiere decirse el antígeno VP2 del virus de la bursitis infecciosa (IBDV), que es adecuado para generar una respuesta inmunitaria protectora, preferentemente una respuesta inmunitaria humoral protectora, en los seres humanos o en un animal contra un patógeno. En la forma de realización más preferida de la invención, las proteínas exógenas proceden de representantes de la familia *Birnaviridae*, tal como por ejemplo el virus IBD, y pueden inducir una respuesta inmunitaria protectora, preferentemente una respuesta inmunitaria humoral protectora.

En un ejemplo se generó una variante VP2 de *K. lactis* VAK367-D4 (VAK887), que como proteína exógena expresa el antígeno VP2 que forma la cápside del virus de la bursitis infecciosa (IBDV cepa D78) (**SEQ ID NO: 1 y 2**). Se prefiere especialmente una variante VP2-T2S de *K. lactis* VAK367-D4 (VAK888), en la que la proteína VP2 había mutado en la posición de aminoácido 2 (intercambio de treonina por serina; Jagadish et al. (1991)) y que presenta la secuencia de nucleótidos o aminoácidos de acuerdo con **SEQ ID NO: 3 y 4**.

En una forma de realización especialmente preferida de la invención se generó una variante de *K. lactis* VAK367-D4 optimizada, VP2T2S\_GAL4, en la que la proteína VP2 había mutado en la posición de aminoácido 2 (**SEQ ID NO: 3 y 4**) y que contenía adicionalmente al menos dos genes *KIGAL4* (VAK890). Se prefiere especialmente una variante de *K. lactis* VAK367-D4, oVP2-T2S, en la que el antígeno VP2 mutado se codifica mediante la secuencia de ácido nucleico optimizada por codón de levadura con la **SEQ ID NO: 5** o en la que el antígeno VP2 mutado expresado de manera recombinante presenta la secuencia de aminoácidos de acuerdo con **SEQ ID NO: 6**. La variante (VAK890) de *K. lactis* VP2-T2S\_GAL4 optimizada presenta las siguientes ventajas:

- Mediante la mutación se estabilizó la proteína exógena adicionalmente.
- Mediante la sobreexpresión del transactivador y/o mediante optimización por codón de la secuencia pudo conseguirse un aumento claro de la expresión de VP2 (**Figura 2**).
- La integración de genes *KIGAL4* adicionales estaba correlacionada también con una tasa de crecimiento más alta de esta variante de *K. lactis*.
- Esta variante de *K. lactis* presenta una reproducibilidad especialmente alta en la fermentación de alta densidad celular y la cantidad de proteína VP2 expresada (**Figura 3**).

La variante de *K. lactis* VP2-T2S\_GAL4 generada de acuerdo con la invención, que como proteína exógena expresa de manera recombinante el antígeno VP2 mutado del IBDV así como contiene copias adicionales del gen transactivador *KIGAL4* (VAK890), se depositó el 29 de noviembre de 2011 en la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares GmbH, DSMZ, Inhoffenstrasse 7B, 38124 Braunschweig, Alemania, de acuerdo con el tratado de Budapest bajo el número DSM 25405.

La variante de *K. lactis* oVP2-T2S generada de acuerdo con la invención, que como proteína exógena expresa de manera recombinante el antígeno VP2 mutado y optimizado por codón del IBDV (VAK910), se depositó el 29 de noviembre de 2011 en la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares GmbH, DSMZ, Inhoffenstrasse 7B, 38124 Braunschweig, Alemania, de acuerdo con el tratado de Budapest bajo el número DSM 25406. La variante de *K. lactis* oVP2-T2S generada de acuerdo con la invención, que como proteína exógena expresa de manera recombinante el antígeno VP2 mutado y optimizado por codón del IBDV así como contiene copias adicionales del gen transactivador *KIGAL4* (VAK911), se depositó el 29 de noviembre de 2011 en la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares GmbH, DSMZ, Inhoffenstrasse 7B, 38124 Braunschweig, Alemania, de acuerdo con el tratado de Budapest bajo el número DSM 25407.

Otra forma de realización se refiere al uso de las levaduras recombinantes de acuerdo con la invención en un procedimiento para la generación de una inmunización protectora, en particular de una inmunización humoral protectora. Un procedimiento de este tipo comprende las siguientes etapas:

- a) cultivo y proliferación de las levaduras recombinantes de acuerdo con la invención,
- b) recolección e inactivación de las levaduras,
- c) aplicación de las levaduras recombinantes de acuerdo con un calendario de inmunización que ha de establecerse,
- 5 d) determinación del título de los anticuerpos formados y/o
- e) detección de la inmunización.

El cultivo y proliferación de las levaduras recombinantes de acuerdo con la invención puede tener lugar con cualquier método disponible convencionalmente. Se prefieren especialmente a este respecto procedimientos que llevan de manera económica a rendimientos celulares elevados. Entre estos figuran procedimientos de fermentación, en particular procedimientos de la fermentación de alta densidad celular. Ha resultado especialmente ventajosa la realización de la fermentación empleando un protocolo de fermentación de lote alimentado (*fed-batch*).

En una forma de realización preferida, la inmunización humoral protectora se consigue por que las levaduras recombinantes se aplican por vía oral/mucosa o por vía subcutánea. En una forma de realización especialmente preferida de la invención, las levaduras recombinantes se aplican por vía subcutánea. En el procedimiento de acuerdo con la invención se prefiere en particular el uso de las cepas de *K. lactis* mencionadas en la reivindicación 1 para la aplicación por vía subcutánea.

Las células de levadura recombinantes se emplearán inactivadas/muertas en el procedimiento de acuerdo con la invención. Para ello se secan las levaduras después del cultivo y expresión de los genes exógenos y a continuación se inactivan. La inactivación puede llevarse a cabo con cualquier procedimiento disponible convencionalmente. Especialmente adecuada para su empleo en el procedimiento de acuerdo con la invención es la inactivación por calor (por ejemplo inactivación por calor durante 2 horas a 90 °C).

Para la vacunación por vía oral/mucosa puede emplearse por ejemplo un calendario de inmunización corto 1/1/1/1 (1 semana de alimentación, 1 semana de pausa, 1 semana de alimentación, etc.) o un calendario más largo 2/2/2 (2 semanas de alimentación, 2 semanas de pausa, 2 semanas de alimentación, etc.). Para la vacunación subcutánea puede usarse por ejemplo un empleo doble o triple con una separación, respectivamente, de dos semanas (**Figuras 4 y 5**).

Para la detección de la inmunización que ha tenido lugar se encuentran disponibles todos los métodos convencionales. En una forma de realización de la invención, para la detección de la inmunización se somete a prueba el título de anticuerpos neutralizantes de virus. Para ello pueden llevarse a cabo por ejemplo pruebas de ELISA específicas o ensayos de neutralización. En el ensayo de neutralización se mezcla un número definido de virus IBD con una cantidad definida de suero de un animal inmunizado o de un animal control. A continuación se somete a prueba para detectar una inhibición de la infección (neutralización) por los virus tratados de esta manera en el cultivo celular. Si una inmunización había sido satisfactoria, también en un experimento de "provocación", por ejemplo en un experimento de "provocación con virus". Para ello se administra a los animales tratados una dosis de un microorganismo patógeno o virus que llevaría normalmente en animales no inmunizados a la enfermedad. Si después de una provocación de este tipo no tiene lugar enfermedad alguna en los animales, se ha aducido la detección para la inmunización satisfactoria (**Figura 5**). Por último puede aducirse la detección de la inmunización también mediante inmunohistoquímica. A este respecto, después de la provocación se examinan los órganos objetivo del patógeno para detectar infección o lesión (**Figura 5**).

De acuerdo con la invención se mostró que variantes de *K. lactis* recombinantes, que se derivaron en cada caso de VAK367-D4, podían emplearse satisfactoriamente para la vacunación mediante aplicación subcutánea. La variante de cepa VAK890 expuesta en los ejemplos de realización expresa el antígeno VP2 del virus de la bursitis infecciosa (IBDV; cepa D78). En el caso de VP2 del IBDV se trata de una proteína formadora de la cápside viral. Para VP2 es conocido que el desencadenamiento de una respuesta inmunitaria humoral contra este antígeno es suficiente para proteger a un organismo infectado preventivamente frente a una infección posterior por el virus es cuestión (IBDV). El desencadenamiento de una respuesta inmunitaria humoral efectiva podía indicarse por un lado a través de la cuantificación de anticuerpos neutralizadores de virus. Por otro lado, la detección de una respuesta inmunitaria protectora se realizó a través de un "experimento de provocación con virus" y una inmunohistoquímica después de la provocación con virus. De acuerdo con la invención pudo establecerse de este modo *K. lactis* recombinante, o *K. lactis* recombinante, partiendo de la cepa VAK367-D4, en aplicaciones por vía subcutánea como efectivamente eficaz, es decir vacuna protectora hasta el 90-100 % (90-100 % corresponde al "patrón oro" en la vacunación) (**Figuras 4 y 5**). La *K. lactis* recombinante, o *K. lactis* recombinante, partiendo de la cepa VAK367-D4, se estableció por lo tanto como vacuna marcadora "de subunidad" contra agentes infecciosos, tales como por ejemplo virus. Es decir, como antígeno se usó una subunidad de proteína inmunógena, individual, de un virus. El uso como vacuna marcadora "de subunidad" implica que su uso permite la diferenciación de organismos infectados vacunados de los no vacunados. Esto es posible ejemplo a través del uso de un método de diagnóstico diferencial que detecta tanto anticuerpos contra el antígeno usado para la vacunación, como anticuerpos contra otro antígeno del agente infeccioso. Mediante la inmunización con la cepa de *K. lactis* recombinante VAK890, partiendo de la cepa VAK367-D4, pudieron generarse altos títulos de anticuerpo contra el antígeno de virus correspondiente. Para estos anticuerpos pudo mostrarse que son neutralizantes de virus. Ya a través de esta propiedad y el elevado título

medido, puede derivarse empíricamente que esta respuesta inmunitaria humoral es suficiente para proteger a un organismo frente a una infección posterior con el virus en cuestión. La prueba final pudo aducirse para el IBDV. El elevado título de anticuerpos neutralizantes de virus generados estaba correlacionado en el modelo de pollo con una protección completa de los animales vacunados contra una infección por virus posterior (Figura 5).

El uso de las cepas de *K. lactis* reivindicadas en la reivindicación 1, que representan las variantes modificadas por ingeniería genética de la cepa VAK367-D4, tal como por ejemplo *K. lactis* VP2-T2S\_GAL4 (VAK890), tiene las siguientes ventajas esenciales con respecto a los procedimientos convencionales:

1. Para el uso para la expresión de gen exógeno, *K. lactis* tiene ventajas fundamentales, esenciales, con respecto a *S. cerevisiae*, que están fundamentadas en la fisiología de *K. lactis* divergente a lo largo de millones de años de *S. cerevisiae*.

2. La expresión del gen exógeno no tiene lugar a través de vectores de plásmido, tal como se describe en el documento WO 90/15140, sino después de integración dirigida y estable del gen exógeno en un locus definido del genoma de *K. lactis*. Esto permite una alta reproducibilidad de la expresión de proteína en condiciones no selectivas. Este aspecto es esencial para la generación reproducible de la vacuna mediante cultivo de la cepa de levadura en el fermentador. El principio de la cepa VAK367-D4 y derivados de la misma se ha descrito ya para una vacunación oral (documento WO 20101054649 A2). En la presente invención se muestra ahora que la cepa VAK367-D4 y sus derivados, en particular *K. lactis* VP2-T2S\_GAL4, en el caso de vacunación por vía subcutánea con el uso de cantidades de levadura esencialmente menores lleva a la protección efectiva en infecciones por virus.

3. La expresión génica es inducible y puede aumentarse adicionalmente a través del aumento de la concentración del activador de la transcripción Gal4 y/o mediante optimización por codón de la secuencia de nucleótidos del gen exógeno adaptándose al huésped de levadura. El establecimiento de un protocolo de fermentación de lote alimentado permite la producción eficiente también de antígenos citotóxicos.

4. La integración del gen exógeno en VAK367-D4 y derivados de la misma es un "procedimiento de una etapa". Es decir, en aproximadamente 3 semanas pueden generarse nuevas cepas recombinantes; esto es especialmente importante para el rápido desarrollo de vacunas eficientes contra variantes de virus modificadas.

5. Mediante la administración por vía subcutánea de levadura recombinante del tipo *K. lactis*, en especial levadura recombinante de la cepa VAK367-D4 y derivados de la misma, pudo generarse tanto en el ratón, como en el pollo, una respuesta inmunitaria protectora. El procedimiento es fácilmente concebible: una cantidad definida de células de levadura inactivadas (muertas por calor) se inyectan bajo la piel al individuo que va a vacunarse en un procedimiento de 2-3 veces. Dos semanas después del último empleo se examina el suero del individuo que va a vacunarse para determinar la presencia y funcionalidad de anticuerpos específicos de antígeno. Mediante pruebas de neutralización por virus pudo detectarse que esta respuesta inmunitaria se basaba principalmente, si no exclusivamente, en la generación de anticuerpos neutralizantes (respuesta inmunitaria humoral protectora). Con ello, la respuesta inmunitaria inducible por *K. lactis* en la aplicación por vía subcutánea se diferencia fundamentalmente de la respuesta inmunitaria inducible por *S. cerevisiae*, que induce principalmente una respuesta de células T. Las posibilidades de una aplicación por vía subcutánea de *K. lactis* son por lo tanto fundamentalmente distintas de las posibilidades de una aplicación por vía subcutánea de *S. cerevisiae*: mientras que *K. lactis* como vacuna de subunidad puede emplearse en antígenos que pueden generar una respuesta inmunitaria humoral protectora (por ejemplo antígenos virales tales como el antígeno VP2 del virus de la bursitis infecciosa, IBVD o antígeno de hemaglutinina HA del virus de la gripe), de este modo *S. cerevisiae* puede emplearse como vacuna de subunidad en antígenos que pueden generar una respuesta inmunitaria celular protectora (tal como por ejemplo en la proteína NS3 del virus de la hepatitis C o antígenos tumorales tales como el Her-2). Estas diferencias en la forma de la respuesta inmunitaria inducible pueden atribuirse supuestamente a las propiedades fuertemente diferentes de las células de *S. cerevisiae* y *K. lactis*, que se exponen anteriormente.

En resumen, la presente invención contribuye extensamente al estado de la técnica y proporciona numerosas formas de realización ventajosas con respecto al estado de la técnica:

- Los inventores han conseguido producir vacunas marcadoras de subunidad con las que es posible diferenciar individuos vacunados frente a individuos infectados naturalmente.
- Además pueden producirse vacunas marcadoras de subunidad que presentan al mismo tiempo propiedades fuertemente adyuvantes y por lo tanto son fuertemente inmunógenas.
- Las vacunas marcadoras de subunidad de acuerdo con la invención pueden emplearse varias veces.
- Las vacunas marcadoras de subunidad de acuerdo con la invención generan una respuesta inmunitaria protectora sistémica y memoria inmunológica en el individuo que se va a vacunar.
- Con la presente invención es también posible producir vacunas contra antígenos citotóxicos.
- El procedimiento de acuerdo con la invención permite la generación más rápido posible de nuevas variantes de vacuna.
- Los procedimientos de vacunación son en particular muy económicos.
- Para la producción de las vacunas de acuerdo con la invención no son necesarios animales de ensayo o el uso de células animales o humanas en cultivo.
- Las vacunas de acuerdo con la invención no son sensibles a la temperatura, pueden transportarse y

almacenarse sin refrigeración.

- En el procedimiento de acuerdo con la invención no se usan células u organismos recombinantes vivos.
- Con el procedimiento de acuerdo con la invención es posible tanto limitar las cantidades de vacuna usada como el número de aplicaciones que son necesarias para conseguir una inmunización protectora, a un nivel mínimo.

5

## Ejemplos de realización

### 1. Generación de la cepa de *K. lactis* VAK367-D4 (*metA ura3-5 lac4::ScURA3*).

La cepa de partida VAK367 para la expresión heteróloga de proteínas exógenas tiene las siguientes propiedades: permite el cultivo hasta elevadas densidades celulares, sin que a este respecto se liberen de manera detectable proteínas intracelulares. A este respecto esta cepa se diferencia de muchas cepas de *K. lactis* estrechamente relacionadas. La cepa VAK367 se derivó mediante dos rondas de mutagénesis de la cepa CBS 2359 (Centraalbureau voor Schimmelcultures <http://www.fungalbiodiversitycentre.com>) y es auxótrofa para el aminoácido metionina y la nucleobase uracilo. De la cepa VAK367 se derivó con métodos de ingeniería genética de la cepa VAK367-D4 (depositada el 18/11/2009 en la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares GmbH (DSMZ) en Braunschweig con el número de registro DSM 23097), en la que con ayuda del plásmido pD4-2 se sustituyó la secuencia de +358 a +1181 del gen *LAC4* por el gen *ScURA3*. La cepa VAK367-D4 permite ahora la integración de genes exógenos en el locus *LAC4* sin marcadores adicionales, seleccionándose en cuanto al crecimiento de lactosa. A este respecto, en el caso del uso de un vector de integración adecuado, tal como por ejemplo Klp3-MCS (**Figura 6**) se sustituye mediante recombinación homóloga el casete de disrupción de modo que con la pérdida del marcador de *ScURA3* se reconstituye un gen *LAC4* intacto. (**Figura 1**)

25

### 2. Generación de un vector de integración que permite la expresión inducible de genes exógenos.

Vector: Klp3

Vector: Klp3-MCS (SEQ ID NO: 10)

En el caso del vector Klp3-MCS (**SEQ ID NO: 10**) (**Figura 6**) se trata de un vector de *E. coli*, a base de YRp7, que no puede replicarse de manera autónoma en levaduras, dado que se delecionó la secuencia de ARS1. Klp3-MCS (**SEQ ID NO: 10**) contiene el promotor de *K. lactis* *LAC4* y secuencias que permiten la integración en el locus de *LAC4* mediante recombinación homóloga.

Entre el promotor de *LAC4* y el inicio de la transcripción se insertó una sección de ADN que contiene el terminador de *TEF1* y el promotor de *KIGAL80*. De esta manera puede expresarse el marco de lectura de *LAC4* después de la reconstitución a través de recombinación homóloga bajo el control del promotor de *KIGAL80*. El promotor de *KIGAL80* se corregula a través del factor de transcripción *KiGal4* con el promotor de *LAC4* (Zenke et al. 1993). Esta construcción permite seguir, a través de la medición de la  $\beta$ -galactosidasa codificada por *LAC4*, la inducción de la expresión de gen exógeno. Klp3- MCS (**SEQ ID NO: 10**) permite la inserción del gen exógeno entre el promotor de *LAC4* y el terminador de *TEF1* a través de los sitios de corte únicos en el sitio de clonación múltiple (*multiple cloning site*) (MCS) (**Figura 6**). Para la integración se digiere el plásmido resultante con enzimas de restricción adecuadas de modo que el casete de expresión se separa de las secuencias de vector de *E. coli*. Después de la transformación en *K. lactis* VAK367-D4 se integra de manera cromosómica el casete de expresión; las cepas resultantes no contienen secuencias bacterianas.

40

### 3. Variante de *K. lactis* que expresa el antígeno VP2 del virus de la bursitis infecciosa (IBDV Variante D78).

Producción de la cepa de levadura recombinante

El ADNc, que codifica para IBDV D78 VP2, se amplificó a partir del plásmido pD78A (Icard et al., 2008) con ayuda de los siguientes oligonucleótidos:

IBDV\_AscI\_fwd (5'-GGCGCGCCGATGACAAACCTGCAAGATC-3') (**SEQ ID NO: 7**), que contiene un sitio de corte de restricción *AscI*, y

VP2\_NotI\_rev (5'-ATAAGAATGCGGCCGCTCACACAGCTATCCTCCTTATG-3') (**SEQ ID NO: 8**) que contiene un sitio de corte de restricción *NotI*.

50

Para la generación de VP2-T2S se usó el siguiente par de oligonucleótidos:

IBDV\_S:T\_AscI\_fwd (5'-GGCGCGCCGATGTCTAACCTGCAAGATCAAACCCA-3') (**SEQ ID NO: 9**), y VP2\_NotI\_rev (véase anteriormente).

55

Los fragmentos de ADN amplificados de este modo se clonaron después del examen y comprobación de las secuencias de nucleótidos a través de los sitios de corte *AscI* y *NotI* en el vector Klp3-MCS (**SEQ ID NO: 10**) (**Figura 6**). Después tuvo lugar la integración en el genoma (**Figura 1**). En detalle, el plásmido de integración se digirió con la enzima de restricción *EcoRI* y los fragmentos digeridos se transformaron en células VAK367-D4 competentes. Las células transformadas se sembraron en placa sobre medio YEPD y se incubaron durante la noche a 30 °C. Para encontrar colonias positivas se duplicó la placa de transformación sobre medio SM que contenía lactosa como fuente de carbono, y se incubó durante 2 días a 30 °C. Los clones positivos identificados en este procedimiento se examinaron adicionalmente.

60

65

La integración genómica de copias génicas de *KIGAL4* adicionales se llevó a cabo después de un método convencional (Kuger et al. (1990). La optimización por codón siguió a un algoritmo de *Saccharomyces cerevisiae* (mr.gene.com, Raab et al., 2010). Los fragmentos de ADN optimizados por codón se sintetizaron directamente. En la síntesis se incorporaron ya los sitios de corte de restricción 5' *Ascl* y 3' *NotI* (mr.gene.com, Regensburg, Alemania). A continuación tuvo lugar la clonación en el vector Klp3-MCS (SEQ ID NO: 10).

#### *Análisis de inmunotransferencia de tipo Western.*

Los sedimentos celulares se resuspendieron en tampón B60 (HEPES 50 mM-KOH pH 7,3; acetato de potasio 60 mM; acetato de magnesio 5 mM; Triton al 0,1 % X100; glicerol al 10 %; fluoruro de sodio 1 mM; fosfato de glicerol 20 mM; MgCl<sub>2</sub> 10 mM; DTT 1 mM; inhibidor completo de proteasa (Roche)) y se solubilizaron mediante mezclado enérgico con perlas de vidrio. El extracto se centrifugó (14000 rpm, 20 min a 4 °C) y se determinó la concentración de proteína. 40 µg del extracto de proteína se separaron por medio de SDS-PAGE en un gel al 12 %. Después se transfirieron las proteínas a una membrana. Los análisis de inmunotransferencia de tipo Western se llevaron a cabo con un antisuero de α-IBDV de conejos (1:15.000; Granzow et al., 1997) y un anticuerpo de cabra-α-conejo acoplado con HRP (1:3000, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) con el uso de métodos convencionales.

#### *Análisis de transferencia de tipo Northern.*

Para la extracción completa del ARN se enfriaron sobre hielo 5 ml de un cultivo de levadura. La lisis celular se llevó a cabo en tampón Prot K (Tris 100 mM/HCl pH 7,9, NaCl 150 mM, EDTA 25 mM, SDS al 1 %) y 50 mg de proteinasa K (Fermentas) con fuerte agitación con perlas de vidrio. Las muestras se incubaron durante 1 h a 35 °C y se extrajo el ARN, se precipitó con etanol y se resuspendió en agua DEPC. El análisis de tipo Northern se llevó a cabo tal como se describió en Engler-Blum et al., 1993, no obstante con algunas desviaciones. Se separaron 5 µg del ARN total sobre un gel de formaldehído-agarosa al 1 % y se transfirió a una membrana de nailon (Amersham HybondTM-N+, GE Healthcare). La membrana se incubó a 68 °C con una sonda de ARN marcada con DIG, que se produjo mediante una transcripción *in vitro* de fragmentos de PCR en presencia de DIG-NTP (Roche). La transferencia se trató con una solución de bloqueo y se incubó con un anticuerpo anti-DIG conjugado con fosfatasa alcalina (Roche). La determinación de la actividad de las fosfatasas alcalinas se llevó a cabo por medio de métodos convencionales.

#### *Cuantificación de VP2 expresada de manera heteróloga.*

Se usó un protocolo modificado según Saugar et al., 2005. Se cultivaron durante la noche 2000 UDO de un cultivo de levadura, que se había transformado con un plásmido de VP2 episomal (pADH1-P VP2-T2S), en un medio selectivo (YNB al 0,67 %, glucosa al 2 % y los siguientes aditivos: Ade 11 mg/l; Tyr 14 mg/l; respectivamente 38 mg/l de His, Trp, Arg, Met; 48 mg/l de Phe; respectivamente 58 mg/l de Leu, lie, Lys, Val, Thr). Después de la recolección y el lavado con agua destilada se solubilizaron las células con perlas de vidrio en tampón de lisis (Tris 10 mM (pH 8,0), NaCl 150 mM, CaCl<sub>2</sub> 20 mM, EDTA 1 mM, inhibidor completo de proteasa (Roche), pH 8,0). El extracto de proteína resultante se centrifugó (10.000 g durante 1 h a 4 °C) y la fracción soluble se estratificó sobre una almohadilla de sacarosa al 20 % (p/v) en tampón de sacarosa (Tris 10 mM pH 8,0, NaCl 150 mM, CaCl<sub>2</sub> 20 mM; contenía inhibidor completo de proteasa (Roche)). Después de la centrifugación a 170.000 g durante 3 h a 4 °C se disolvió el sedimento en 200 µl de tampón de sacarosa y se centrifugó durante 17 h más a 114.000 g en un gradiente de sacarosa del 20 a 53 % en tampón de sacarosa. El gradiente se recogió en fracciones de 700 µl y se analizó por medio de SDS-PAGE y se analizó por inmunotransferencia de tipo Western. Los complejos de proteína oligoméricos del VP2 expresado de manera heteróloga pudieron concentrarse y purificarse de esta manera. La proteína pudo detectarse y la cantidad de proteína pudo determinarse por medio de SDS PAGE y tinción con Coomassie en comparación con una proteína convencional (no mostrada). El VP2 así purificado se empleó entonces como patrón en una inmunotransferencia de tipo Western comparativa con anticuerpos anti-VP2. Se comparó la cantidad de VP2 de un número definido de células de levadura de distintas fermentaciones (**Figura 3**).

#### *Fermentación de levadura e inactivación por calor.*

Todas las fermentaciones experimentales se llevaron a cabo en un sistema de biorreactor paralelo DasGip (DasGip AG, Jülich, Alemania) con cuatro fermentadores de 2 l totalmente equipados. Las fermentaciones en la escala de producción se llevaron a cabo por la empresa Organobalance GmbH (Berlín, Alemania) o en el laboratorio propio en un biorreactor Biostat ED (B. Braun Biotech, Melsungen, Alemania) con un volumen de trabajo de 10 l. Todos los procesos de producción se llevaron a cabo en el procedimiento de lote alimentado. Se usó un medio de cultivo complejo con extracto de levadura al 2 % y peptona al 1 % y una solución alimentada con lactosa al 20 %. La temperatura del cultivo de levadura se mantuvo a 30 °C y la pO<sub>2</sub> se controló al 30 % de saturación. El valor de pH se mantuvo durante la fermentación a 5,0 mediante adición de NaOH 2 M o H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 2 M.

Para los experimentos *in vivo* en ratones y pollos se liofilizaron las levaduras y después se inactivaron por calor durante 2 h a 90 °C. Después del uso de este procedimiento, eran viables menos de 10 células por gramo de peso seco celular.

#### 4. Aplicación subcutánea en ratones

Para la aplicación subcutánea de una variante de *K. lactis*, que expresa el antígeno VP2 del virus de la bursitis infecciosa (IBDV Variante D78) (VAK890), en ratones se mezcló la levadura seca y pulverizada para la primera aplicación con adyuvante de Freund completo (CFA); en las otras aplicaciones se mezcló la levadura con adyuvante de Freund incompleto (IFA) (100 µg de material de levadura por 200 µl de CFA o IFA). Se inyectaron 200 µl de las emulsiones (con 100 µg de levadura contenida) por inmunización/refuerzo por individuo. Con ello la cantidad de VP2 administrada por inmunización subcutánea en un individuo de ratón correspondía a aproximadamente 18 ng (**Figura 3**) Después de la inyección inicial (día 0) se "reforzó" dos veces en intervalos de dos semanas (en el día 14 y 28; **Figura 4**). Después de dos semanas más se sacrificaron los animales para la obtención del suero sanguíneo mediante anestesia.

#### 5. Aplicación subcutánea en pollos

Para la aplicación subcutánea en pollos se disolvieron 5 mg de la variante de *K. lactis* seca y pulverizada, que expresa el antígeno VP2 del virus de la bursitis infecciosa (IBDV variante D78) (VAK890), en 750 µl de tampón fosfato/solución salina (PBS) así como 500 µl de agua destilada estéril y se produjo una emulsión con 1,25 ml de IFA. Se inyectaron 500 µl de esta emulsión (con 1 mg de levadura contenida) se inyectaron en el día 0, 14 así como el día 28 (**Figura 5**). Con ello, la cantidad de VP2 administrada por inmunización subcutánea de un individuo de pollo correspondía aproximadamente a 180 ng (**Figuras 3, 4**).

#### 6. "Provocación" con virus

Después de la vacunación (**Figura 5**) se infectaron individuos que van a vacunarse de pollo en el día 42 a través de la vía oral con 100 EID<sub>50</sub> de la cepa de IBDV "Edgar" y después de seis días se determinó la tasa de mortalidad. Después del posterior sacrificio de los animales con anestesia se obtuvieron los sueros y se extrajeron las bolsas de los animales. Estas se fijaron en primer lugar durante 24 horas en formalina tamponada a neutro al 10 % y a continuación se incrustó en parafina.

#### 7. Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

Los títulos de anticuerpos específicos de IBDV en los sueros de los individuos que van a vacunarse se determinaron a través de una prueba de ELISA comercial, kit IDEXX FlockChek® IBD ELISA (IDEXX Laboratories, Inc.). En el caso de los sueros de individuos que van a vacunarse de ratón se usó un anticuerpo secundario diferente del fabricante (Sigma Aldrich).

#### 8. Ensayo de neutralización.

El ensayo de neutralización para la determinación de la concentración de anticuerpos neutralizantes de virus se llevó a cabo según el protocolo de Schröder et al., 2000.

#### 9. Inmunohistoquímica.

De las bolsas incrustadas en parafina se produjeron cortes de órganos de 4 micrómetros de espesor. Después de la retirada de la parafina se tiñeron estas según procedimientos convencionales con hematoxilina y eosina. Las muestras se examinaron al microscopio y se determinó la denominada "puntuación de lesiones" en una escala de 1-4 (1 = normal hasta el 10 % de atrofia folicular; 2 = 10-30 % de atrofia folicular; 3 = 30-70 % de atrofia folicular; 4 = > 70 % de atrofia).

## 50 Resultados

### Producción y optimización de la cepa de *K. lactis* que expresa IBDV VP2

Se produjeron distintas variantes de *K. lactis* con gen IBDV VP2 integrado. Para los experimentos de vacunación se usó una variante optimizada, en la que la proteína VP2 había mutado en la posición de aminoácido 2 (intercambio de treonina por serina; Jagdish et al. (1991)), y que contenía una integración en tándem adicional de al menos dos genes *KIGAL4* (variante VP2-T2S\_GAL4; cepa VAK890). Mediante la mutación se estabilizó la proteína exógena adicionalmente; mediante la sobreexpresión del transactivador pudo conseguirse un claro aumento de la expresión de VP2 (**Figura 2**). La integración de genes *KIGAL4* adicionales estaba correlacionada también con una tasa de crecimiento más alta de esta variante de *K. lactis*. Las condiciones de crecimiento para la cepa VAK890 de *K. lactis* que expresa VP2 en cuestión se optimizaron de modo que la levadura pudo fermentar en altas densidades y con cantidad reproducible de VP2 expresada. Después de la producción se liofilizó la levadura y se inactivó a 90 °C durante 2 horas. Se realizó la detección de la inactivación: por g de material de levadura inactivado permanecieron menos de 10 células de levadura vivas. Se determinó la cantidad de VP2 por célula de levadura: esta ascendió con la cepa VAK890 aproximadamente a 0.7 fg de proteína VP2 heteróloga por célula de levadura (**Figura 3**)

*Aplicación subcutánea en ratones y pollos*

Las inmunizaciones se llevaron a cabo tal como se describe anteriormente; dos semanas después de la última aplicación se examinaron los sueros de los individuos que van a vacunarse tratados para determinar la presencia de anticuerpos neutralizantes. Para ello se usó un ELISA específico de IBDV y se llevó a cabo un ensayo de neutralización de IBDV (**Figuras 4 y 5**). Con los pollos vacunados se llevó a cabo además un experimento de "provocación con virus". Para ello se suministró a los animales una dosis de virus de 100 EID50 por animal de la cepa "Edgar" de IBDV fuertemente virulenta, una concentración que en el ave no vacunado lleva a una bursitis significativa con una tasa de mortalidad de aproximadamente el 10-35 % (**Figura 5D**). A continuación del experimento de "provocación con virus" se examinaron las bolsas de los individuos que van a vacunarse a través de inmunohistoquímica para determinar signos de infección y lesiones en las bolsas y se caracterizaron mediante la denominada "puntuación de lesiones" (**Figura 5**). Tanto los experimentos con ratones, como los experimentos con pollos mostraron que mediante la aplicación subcutánea de la cepa VAK890 de *K. lactis* podían generarse títulos elevados de anticuerpos neutralizantes de virus en prácticamente todos los animales tratados (**Figuras 4B, 4C; Figuras 5B, 5C**). Asimismo pudo mostrarse que prácticamente todos sujetos de prueba vacunados estaban protegidos contra provocación por virus y no presentaba prácticamente ningún signo de una infección por virus en sus bolsas (**Figura 5**). Todos los animales inoculados por vía subcutánea con la cepa VAK890 de *K. lactis* mostraban por lo tanto una respuesta inmunitaria humoral significativa contra VP2. Esta respuesta inmunitaria podía observarse ya después de un único refuerzo, de lo que pudo concluirse son ya suficientes dos inyecciones, que pueden llevarse a cabo además con adyuvante de Freund incompleto (inmunización y un refuerzo), para producir una protección. Además, todos los sujetos de pollo, que se habían inoculado con la cepa VAK890 de *K. lactis*, estaban protegidos contra una infección por virus posterior (**Figura 5**).

**Abreviaturas**

25	ARS1	secuencia de replicación autónoma; secuencia de nucleótidos en el ADN en el que se introduce la replicación
	Asc I	endonucleasa de restricción Asc I
	CFA	adyuvante de Freund completo
30	ADN	ácido desoxirribonucleico
	DEPC	pirocarbonato de dietilo
	DIG-NTP	digoxigenina-nucleótido trifosfato
	DSMZ	Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares GmbH
	DTT	ditiotreitól
35	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
	EcoRI	endonucleasa de restricción EcoR I
	EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
	EID50	dosis infecciosa de huevo o embrión – número de virus infecciosos que es necesario para desencadenar una infección en huevos infectados al 50 %
40	ELISA	ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
	GAL4	activador de la transcripción específico de levadura
	GRAS	generally regarded as safe (generalmente considerado como seguro)
	HEPES	ácido 2-(4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil)-etanosulfónico
	Hpa I	endonucleasa de restricción Hpa I
45	HRP	peroxidasa del rábano
	IBDV	virus de la bursitis infecciosa
	IFA	adyuvante de Freund incompleto
	<i>K. lactis</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>
	<i>KIGAL4</i>	gen de <i>K. lactis</i> que codifica para la proteína KIGal4/Lac9
50	<i>KIGAL80</i>	gen de <i>K. lactis</i> que codifica para la proteína KIGal80
	<i>LAC4</i>	gen de <i>K. lactis</i> que codifica para una enzima β-galactosidasa
	Not I	endonucleasa de restricción Not I
	UDO	unidad de densidad óptica
	PBS	tampón fosfato/solución salina
55	PCR	reacción en cadena de la polimerasa
	ARN	ácido ribonucleico
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	<i>Sal I</i>	endonucleasa de restricción Sal I
	SDS	dodecilsulfato de sodio
60	SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida con el uso de SDS
	TEF1	gen de <i>Arxula adenivorans</i> que codifica para el factor de traducción EF-1 alfa
	VP2	proteína de virus que forma la cápside del IBDV
	VP2-T2S	VP2 con un intercambio de aminoácido de treonina por serina en la posición 2
	VAK	cepa de vacuna
65	YEPD	extracto de levadura peptona dextrosa
	YRp7	vector lanzadera de <i>S. cerevisiae-E.coli</i> , registro de Genbank U03501 (Botstein et al., 1979)

**Lista de referencias**

- 5 Backhaus, K. et al. Milk and sugar: Regulation of cell wall synthesis in the milk yeast *Kluyveromyces lactis*. *European Journal of Cell Biology* 90, 745-750 (2011).
- Bathurst, I.C. Protein Expression in Yeast as an Approach to Production of Recombinant Malaria Antigens. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 50, 20 -26 (1994).
- 10 Botstein D, Falco, S.C., Stewart, S.E., Brennan, M., Scherer, S., Stinchcomb, D.T., Struhl, K. & Davis, R.W. Sterile host yeast (SHY): a eukaryotic system of biological containment for recombinant DNA experiments. *Gene* 8, 17-24 (1979).
- Breunig et al. Regulation of primary carbon metabolism in *Kluyveromyces lactis*. *Enzyme Microb. Technol* 26, 771-780 (2000).
- 15 Chen, X.J. & Clark-Walker, G.D. Specific mutations in alpha- and gamma-subunits of F1-ATPase affect mitochondrial genome integrity in the petite-negative yeast *Kluyveromyces lactis*. *EMBO J* 14, 3277-3286 (1995).
- Clark-Walker, G.D. The F1-ATPase inhibitor *Inh1* (IF1) affects suppression of mtDNA loss-lethality in *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Research* 7, 665-674 (2007).
- 20 Donnini, C. et al. Improved Production of Heterologous Proteins by a Glucose Repression-Defective Mutant of *Kluyveromyces lactis*. *Appl Environ Microbiol* 70, 2632-2638 (2004).
- 25 Engler-Blum, G., Meier, M., Frank, J. & Muller, G.A. Reduction of Background Problems in Nonradioactive Northern and Southern Blot Analyses Enables Higher Sensitivity Than <sup>32</sup>P-Based Hybridizations. *Analytical Biochemistry* 210, 235-244 (1993).
- Gellissen G., Hollenberg C.P. Application of yeasts in gene expression studies: a comparison of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* and *Kluyveromyces lactis* -- a review. *Gene* 190(1), 87-97 (1997).
- 30 Granzow, H. et al. A second form of infectious bursal disease virus-associated tubule contains VP4. *J Virol* 71, 8879-8885 (1997).
- 35 Jagadish, M.N., Laughton, D.L., Azad, A.A. & Macreadie, I.G. Stable synthesis of viral protein 2 of infectious bursal disease virus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 108, 275-279 (1991).
- Icard, A.H., Sellers, H.S., & Mundt, E. Detection of infectious bursal disease virus isolates with unknown antigenic properties by reverse genetics. *Avian Dis.* 52, 590-8. (2008)
- 40 Kuger, P., Gödecke, A. & Breunig, K.D. A mutation in the Zn-finger of the GAL4 homolog LAC9 results in glucose repression of its target genes. *Nucleic Acids Res* 18, 745-751 (1990).
- 45 Lu, Y. et al. Mutation-Selective Tumor Remission with Ras-Targeted, Whole Yeast-Based Immunotherapy. *Cancer Research* 64, 5084 -5088 (2004).
- Raab, D., Graf, M., Notka, F., Schödl, T. & Wagner, R. The GeneOptimizer Algorithm: using a sliding window approach to cope with the vast sequence space in multiparameter DNA sequence optimization. *Syst Synth Biol* 4, 215-225 (2010).
- 50 Raschke, W.C. & Ballou, C.E. Characterization of a yeast mannan containing N-acetyl-D-glucosamine as an immunochemical determinant. *Biochemistry* 11, 3807-3816 (1972).
- Saugar, I. et al. Structural Polymorphism of the Major Capsid Protein of a Double-Stranded RNA Virus: An Amphipathic [alpha] Helix as a Molecular Switch. *Structure* 13, 1007-1017 (2005).
- 55 Schröder, A., van Loon, A.A.W.M., Goovaerts, D. & Mundt, E. Chimeras in noncoding regions between serotypes I and II of segment A of infectious bursal disease virus are viable and show pathogenic phenotype in chickens. *Journal of General Virology* 81, 533 -540 (2000).
- 60 Stubbs, A.C. et al. Whole recombinant yeast vaccine activates dendritic cells and elicits protective cell-mediated immunity. *Nat. Med* 7, 625-629 (2001).
- 65 Stubbs, A.C. and Wilson, C.C. Recombinant yeast as a vaccine vector for the induction of cytotoxic T-lymphocyte responses. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 4: 35-40 (2002)

Uccelletti, D., Farina, F., Mancini, P. & Palleschi, C. KIPMR1 inactivation and calcium addition enhance secretion of non-hyperglycosylated heterologous proteins in *Kluyveromyces lactis*. *Journal of Biotechnology* 109, 93-101 (2004).

5 Van Ooyen, A.J.J. et al. Heterologous protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Research* 6, 381-392 (2006).

Wansley E.K. et al., Vaccination with a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing a tumor antigen breaks immune tolerance and elicits therapeutic antitumor responses. *Clin. Cancer Res.* 14: 4316-4325 (2008).

10 Zenke et al. Gal80 proteins of *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae* are highly conserved but contribute differently to glucose repression of the galactose regulon. *Molecular and Cellular Biology* 13:7566-7576 (1993)

15 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

<120> Generación de una respuesta inmunitaria humoral por medio de vacunación a base de levadura

20 <130> MLU\_Breu\_1

<160> 10

25 <170> BiSSAP 1.0

<210> 1

<211> 1371

<212> ADN

30 <213> *Birnaviridae*

<220>

<221> fuente

<222> 1..1371

35 <223> /mol\_type="ADN" /organismo="*Birnaviridae*"

<400> 1

ES 2 690 792 T3

```

atgacaaacc tgcaagatca aaccaaacag attgttccgt tcatacggag ctttctgatg      60
ccaacaaccg gaccggcgtc cattccggac gacaccctgg agaagcacac tctcagggtca      120
gagacctcga cctacaattt gactgtgggg gacacagggt cagggctaat tgtctttttc      180
cctggattcc ctggctcaat tgtgggtgct cactacacac tgcagggcaa tgggaactac      240
aagttcgatc agatgctcct gactgccag aacctaccgg ccagttacaa ctactgcagg      300
ctagtgagtc ggagtctcac agtgaggtca agcacacttc ctggtggcgt ttatgacta      360
aacggcacca taaacgccgt gaccttcaa ggaagcctga gtgaactgac agatgttagc      420
tacaatgggt tgatgtctgc aacagccaac atcaacgaca aaattgggaa cgtcctagta      480
ggggaagggg tcaccgtcct cagcttacc acatcatatg atcttgggta tgtgaggctt      540
ggtgacccca ttcccgaat agggcttgac ccaaaaatgg tagccacatg tgacagcagt      600
gacaggccca gagtctacac cataactgca gccgatgatt accaattctc atcacagtac      660
caaccagggtg gggtaacaat cacactgttc tcagccaaca ttgatgcat cacaagcctc      720
agcgttgggg gagagctcgt gtttcaaca agcgtccacg gccttgtact gggcgccacc      780
atctacctca taggctttga tgggacaacg gtaatcacca gggctgtggc cgcaaacaat      840
gggctgacga ccggcaccga caaccttatg ccattcaatc ttgtgattcc aacaaacgag      900
ataaccagc caatcacatc catcaaactg gagatagtga cctccaaaag tggtggtcag      960
gcaggggatc agatgtcatg gtcggcaaga gggagcctag cagtgacgat ccatgggtggc     1020
aactatccag gggccctccg tcccgtcacg ctagtggcct acgaaagagt ggcaacagga     1080
tccgtcgtta cggtcgctgg ggtgagcaac ttcgagctga tcccaaatcc tgaactagca     1140
aagaacctgg ttacagaata cggccgattt gaccaggag ccatgaaacta cacaaaattg     1200
atactgagtg agagggaccg tcttggcatc aagaccgtct ggccaacaag ggagtacact     1260
gactttcgtg aatacttcat ggaggtggcc gacctcaact ctcccctgaa gattgcagga     1320

gcattcggct tcaaagacat aatccgggcc ataaggagga tagctgtgtg a                1371

```

5 <210> 2  
 <211> 456  
 <212> PRT  
 <213> *Bimaviridae*

10 <220>  
 <221> FUENTE  
 <222> 1..456  
 <223> /mol\_type="proteína"/organismo="*Bimaviridae*"

15 <400> 2

Met Thr Asn Leu Gln Asp Gln Thr Gln Gln Ile Val Pro Phe Ile Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Leu Met Pro Thr Thr Gly Pro Ala Ser Ile Pro Asp Asp Thr  
 20 25 30  
 Leu Glu Lys His Thr Leu Arg Ser Glu Thr Ser Thr Tyr Asn Leu Thr  
 35 40 45  
 Val Gly Asp Thr Gly Ser Gly Leu Ile Val Phe Phe Pro Gly Phe Pro  
 50 55 60  
 Gly Ser Ile Val Gly Ala His Tyr Thr Leu Gln Gly Asn Gly Asn Tyr  
 65 70 75 80  
 Lys Phe Asp Gln Met Leu Leu Thr Ala Gln Asn Leu Pro Ala Ser Tyr  
 85 90 95  
 Asn Tyr Cys Arg Leu Val Ser Arg Ser Leu Thr Val Arg Ser Ser Thr  
 100 105 110  
 Leu Pro Gly Gly Val Tyr Ala Leu Asn Gly Thr Ile Asn Ala Val Thr  
 115 120 125  
 Phe Gln Gly Ser Leu Ser Glu Leu Thr Asp Val Ser Tyr Asn Gly Leu  
 130 135 140  
 Met Ser Ala Thr Ala Asn Ile Asn Asp Lys Ile Gly Asn Val Leu Val  
 145 150 155 160  
 Gly Glu Gly Val Thr Val Leu Ser Leu Pro Thr Ser Tyr Asp Leu Gly  
 165 170 175  
 Tyr Val Arg Leu Gly Asp Pro Ile Pro Ala Ile Gly Leu Asp Pro Lys  
 180 185 190  
 Met Val Ala Thr Cys Asp Ser Ser Asp Arg Pro Arg Val Tyr Thr Ile  
 195 200 205  
 Thr Ala Ala Asp Asp Tyr Gln Phe Ser Ser Gln Tyr Gln Pro Gly Gly  
 210 215 220  
 Val Thr Ile Thr Leu Phe Ser Ala Asn Ile Asp Ala Ile Thr Ser Leu  
 225 230 235 240  
 Ser Val Gly Gly Glu Leu Val Phe Gln Thr Ser Val His Gly Leu Val  
 245 250 255  
 Leu Gly Ala Thr Ile Tyr Leu Ile Gly Phe Asp Gly Thr Thr Val Ile  
 260 265 270  
 Thr Arg Ala Val Ala Ala Asn Asn Gly Leu Thr Thr Gly Thr Asp Asn  
 275 280 285  
 Leu Met Pro Phe Asn Leu Val Ile Pro Thr Asn Glu Ile Thr Gln Pro  
 290 295 300  
 Ile Thr Ser Ile Lys Leu Glu Ile Val Thr Ser Lys Ser Gly Gly Gln  
 305 310 315 320  
 Ala Gly Asp Gln Met Ser Trp Ser Ala Arg Gly Ser Leu Ala Val Thr  
 325 330 335  
 Ile His Gly Gly Asn Tyr Pro Gly Ala Leu Arg Pro Val Thr Leu Val  
 340 345 350  
 Ala Tyr Glu Arg Val Ala Thr Gly Ser Val Val Thr Val Ala Gly Val  
 355 360 365  
 Ser Asn Phe Glu Leu Ile Pro Asn Pro Glu Leu Ala Lys Asn Leu Val  
 370 375 380  
 Thr Glu Tyr Gly Arg Phe Asp Pro Gly Ala Met Asn Tyr Thr Lys Leu  
 385 390 395 400  
 Ile Leu Ser Glu Arg Asp Arg Leu Gly Ile Lys Thr Val Trp Pro Thr  
 405 410 415  
 Arg Glu Tyr Thr Asp Phe Arg Glu Tyr Phe Met Glu Val Ala Asp Leu  
 420 425 430  
 Asn Ser Pro Leu Lys Ile Ala Gly Ala Phe Gly Phe Lys Asp Ile Ile  
 435 440 445  
 Arg Ala Ile Arg Arg Ile Ala Val  
 450 455

5 <210> 3  
 <211> 1371  
 <212> ADN  
 <213> *Bimaviridae*

10 <220>  
 <221> fuente  
 <222> 1..1371  
 <223> /mol\_type="ADN" /organismo="*Bimaviridae*"

ES 2 690 792 T3

<400> 3

```

atgtctaacc tgcaagatca aaccaacag attgttccgt tcatacggag ctttctgatg      60
ccaacaaccg gaccggcgtc cattccggac gacaccctgg agaagcacac tetcagggtca    120
gagacctcga cctacaatft gactgtgggg gacacagggg cagggctaata tgtctttttc    180
cctggattcc ctggctcaat tgtgggtgct cactacacac tgcagggcaa tgggaactac     240
aagttcgatc agatgctcct gactgcccag aacctaccgg ccagttacaa ctactgcagg     300
ctagtgagtc ggagtctcac agtgagggtca agcacacttc ctgggtggcgt ttatgacta     360
aacggcacca taaacgccgt gaccttcaa ggaagcctga gtgaactgac agatgttagc     420
tacaatgggt tgatgtctgc aacagccaac atcaacgaca aaattgggaa cgtcctagta     480
ggggaagggg tcaccgtcct cagcttacc acatcatatg atcttgggta tgtgaggctt     540
ggtgacccca ttcccgaat agggcttgac ccaaaaatgg tagccacatg tgacagcagt     600
gacaggccca gagtctacac cataactgca gccgatgatt accaattctc atcacagtac     660
caaccagggt gggtaacaat cacactgttc tcagccaaca ttgatgcat cacaagcctc     720
agcgttgggg gagagctcgt gtttcaaca agcgtccacg gccttgtact gggcgccacc     780
atctacctca taggctttga tgggacaacg gtaatcacca gggctgtggc cgcaaacaaat     840
gggctgacga ccggcaccga caaccttatg ccattcaatc ttgtgattcc aacaacgag     900
ataaccagc caatcacatc catcaaactg gagatagtga cctccaaaag tgggtggtcag     960
gcaggggatc agatgtcatg gtcggcaaga gggagcctag cagtgacgat ccatggtggc    1020
aactatccag gggccctccg tcccgtcacg ctagtggcct acgaaagagt ggcaacagga    1080
tccgtcgta cggtcgttg ggtgagcaac ttcgagctga tcccaaatcc tgaactagca    1140
aagaacctgg ttacagaata cggccgattt gaccaggag ccatgaacta cacaaaattg    1200
atactgagtg agagggaccg tcttggcatc aagaccgtct ggccaacaag ggagtacact    1260
gactttcgtg aatacttcat ggaggtggcc gacctcaact ctcccctgaa gattgcagga    1320
gcattcggct tcaaagacat aatccgggcc ataaggagga tagctgtgtg a              1371

```

5

```

<210> 4
<211> 456
<212> PRT
<213> Birnaviridae

```

10

```

<220>
<221> FUENTE
<222> 1..456
<223> /mol_type="proteína" /organismo="Birnaviridae"

```

15

<400> 4

Met Ser Asn Leu Gln Asp Gln Thr Gln Gln Ile Val Pro Phe Ile Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Leu Met Pro Thr Thr Gly Pro Ala Ser Ile Pro Asp Asp Thr  
 20 25 30  
 Leu Glu Lys His Thr Leu Arg Ser Glu Thr Ser Thr Tyr Asn Leu Thr  
 35 40 45  
 Val Gly Asp Thr Gly Ser Gly Leu Ile Val Phe Phe Pro Gly Phe Pro  
 50 55 60  
 Gly Ser Ile Val Gly Ala His Tyr Thr Leu Gln Gly Asn Gly Asn Tyr  
 65 70 75 80  
 Lys Phe Asp Gln Met Leu Leu Thr Ala Gln Asn Leu Pro Ala Ser Tyr  
 85 90 95  
 Asn Tyr Cys Arg Leu Val Ser Arg Ser Leu Thr Val Arg Ser Ser Thr  
 100 105 110  
 Leu Pro Gly Gly Val Tyr Ala Leu Asn Gly Thr Ile Asn Ala Val Thr  
 115 120 125  
 Phe Gln Gly Ser Leu Ser Glu Leu Thr Asp Val Ser Tyr Asn Gly Leu  
 130 135 140  
 Met Ser Ala Thr Ala Asn Ile Asn Asp Lys Ile Gly Asn Val Leu Val  
 145 150 155 160  
 Gly Glu Gly Val Thr Val Leu Ser Leu Pro Thr Ser Tyr Asp Leu Gly  
 165 170 175  
 Tyr Val Arg Leu Gly Asp Pro Ile Pro Ala Ile Gly Leu Asp Pro Lys  
 180 185 190  
 Met Val Ala Thr Cys Asp Ser Ser Asp Arg Pro Arg Val Tyr Thr Ile  
 195 200 205  
 Thr Ala Ala Asp Asp Tyr Gln Phe Ser Ser Gln Tyr Gln Pro Gly Gly  
 210 215 220  
 Val Thr Ile Thr Leu Phe Ser Ala Asn Ile Asp Ala Ile Thr Ser Leu  
 225 230 235 240  
 Ser Val Gly Gly Glu Leu Val Phe Gln Thr Ser Val His Gly Leu Val  
 245 250 255  
 Leu Gly Ala Thr Ile Tyr Leu Ile Gly Phe Asp Gly Thr Thr Val Ile  
 260 265 270  
 Thr Arg Ala Val Ala Ala Asn Asn Gly Leu Thr Thr Gly Thr Asp Asn  
 275 280 285  
 Leu Met Pro Phe Asn Leu Val Ile Pro Thr Asn Glu Ile Thr Gln Pro  
 290 295 300  
 Ile Thr Ser Ile Lys Leu Glu Ile Val Thr Ser Lys Ser Gly Gly Gln  
 305 310 315 320  
 Ala Gly Asp Gln Met Ser Trp Ser Ala Arg Gly Ser Leu Ala Val Thr  
 325 330 335  
 Ile His Gly Gly Asn Tyr Pro Gly Ala Leu Arg Pro Val Thr Leu Val  
 340 345 350  
 Ala Tyr Glu Arg Val Ala Thr Gly Ser Val Val Thr Val Ala Gly Val  
 355 360 365  
 Ser Asn Phe Glu Leu Ile Pro Asn Pro Glu Leu Ala Lys Asn Leu Val  
 370 375 380  
 Thr Glu Tyr Gly Arg Phe Asp Pro Gly Ala Met Asn Tyr Thr Lys Leu  
 385 390 395 400  
 Ile Leu Ser Glu Arg Asp Arg Leu Gly Ile Lys Thr Val Trp Pro Thr  
 405 410 415  
 Arg Glu Tyr Thr Asp Phe Arg Glu Tyr Phe Met Glu Val Ala Asp Leu  
 420 425 430  
 Asn Ser Pro Leu Lys Ile Ala Gly Ala Phe Gly Phe Lys Asp Ile Ile  
 435 440 445  
 Arg Ala Ile Arg Arg Ile Ala Val  
 450 455

<210> 5  
 <211> 1371  
 <212> ADN  
 <213> *Birnaviridae*

5

<220>  
 <221> fuente  
 <222> 1..1371  
 <223> /mol\_type="ADN"  
 /organismo="Birnaviridae"

10

ES 2 690 792 T3

<400> 5

```

atgtccaact tacaagacca aaccaacaa atcgtccctt ttatcagatc cttattaatg      60
cctactaccg gtcctgcttc tattcctgat gacaccttgg aaaaacacac cttgagatcc     120
gaaacttcaa cctataactt gactgtcggg gacactgggt ctggtttaat cgttttcttc     180
cctggttttc ctggttcaat tgtcggtgcc cactatacct tacaaggtaa cggttaactat     240
aagttcgatc aaatgttggt gaccgcccaa aatttgctcg cctcctataa ctattgtaga     300
ttggtttcta gatctttaac cgtcagatca tccactttgc ctggtggtgt ctatgctttg     360
aacggtacaa tcaacgctgt cacatttcaa ggttccttgt ccgaattgac cgatgtctcc     420
tataacggtt taatgtccgc tactgccaat atcaatgaca aaattggtaa cgtcttagtc     480
ggggaagggtg ttactgtttt gagtttgcca acctcttatg acttgggtta tgtcagattg     540
ggtgacccta ttcctgctat cggtttagac caaaaatgg ttgccacttg tgactctagt     600
gatagaccaa gagtctatac catcactgct gccgatgact atcaattctc ctcccaatat     660
caacctgggtg gtgtcactat caccttgttc tctgccaaca tgcacgctat aacatctttg     720
tccgtcgggtg gtgaattggt attccaaacc tccgtccatg gtttagtatt gggtgccacc     780
atctatttga ttggtttcga cgggtacaacc gtcattacta gagccgttgc tgccaacaat     840
ggttaacca ctggtactga caacttgatg ccattcaact tggtaatccc taccaacgaa     900
atcacacaac caatcacatc catcaaattg gaaattgtca cctccaaatc cggtggtcaa     960
gccggtgacc aaatgtcatg gagtgctaga ggttcattag ccgtaaccat ccacgggtggt    1020
aactatcctg gtgccttgag acctgtcact ttagtcgcct atgaaagagt tgctactggt    1080
tccgtcggtta ctggtgccgg tgtttcaaac ttcgaattga tcccaaacc agaattggcc    1140
aaaaacttgg ttaccgaata tggtagattc gaccctgggt ctatgaacta taaaaaattg    1200
atcttatccg aaagagacag attgggtatc aaaactgtct ggcctactag agaataatcc    1260
gactttagag aatatttcat ggaagtcgcc gacttaaatt cccattgaa aatcgccggt    1320
gcctttggtt ttaaggacat cattagagcc attagaagaa tagccgtctg a              1371

```

5 <210> 6  
 <211> 456  
 <212> PRT  
 <213> *Birnaviridae*

10 <220>  
 <221> FUENTE  
 <222> 1..456  
 <223> /mol\_type="proteína" /organismo= *Birnaviridae*

15 <400> 6

Met Ser Asn Leu Gln Asp Gln Thr Gln Gln Ile Val Pro Phe Ile Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Leu Met Pro Thr Thr Gly Pro Ala Ser Ile Pro Asp Asp Thr  
 20 25 30  
 Leu Glu Lys His Thr Leu Arg Ser Glu Thr Ser Thr Tyr Asn Leu Thr  
 35 40 45  
 Val Gly Asp Thr Gly Ser Gly Leu Ile Val Phe Phe Pro Gly Phe Pro  
 50 55 60  
 Gly Ser Ile Val Gly Ala His Tyr Thr Leu Gln Gly Asn Gly Asn Tyr  
 65 70 75 80  
 Lys Phe Asp Gln Met Leu Leu Thr Ala Gln Asn Leu Pro Ala Ser Tyr  
 85 90 95  
 Asn Tyr Cys Arg Leu Val Ser Arg Ser Leu Thr Val Arg Ser Ser Thr  
 100 105 110  
 Leu Pro Gly Gly Val Tyr Ala Leu Asn Gly Thr Ile Asn Ala Val Thr  
 115 120 125  
 Phe Gln Gly Ser Leu Ser Glu Leu Thr Asp Val Ser Tyr Asn Gly Leu  
 130 135 140  
 Met Ser Ala Thr Ala Asn Ile Asn Asp Lys Ile Gly Asn Val Leu Val  
 145 150 155 160  
 Gly Glu Gly Val Thr Val Leu Ser Leu Pro Thr Ser Tyr Asp Leu Gly  
 165 170 175  
 Tyr Val Arg Leu Gly Asp Pro Ile Pro Ala Ile Gly Leu Asp Pro Lys  
 180 185 190  
 Met Val Ala Thr Cys Asp Ser Ser Asp Arg Pro Arg Val Tyr Thr Ile  
 195 200 205  
 Thr Ala Ala Asp Asp Tyr Gln Phe Ser Ser Gln Tyr Gln Pro Gly Gly  
 210 215 220  
 Val Thr Ile Thr Leu Phe Ser Ala Asn Ile Asp Ala Ile Thr Ser Leu  
 225 230 235 240  
 Ser Val Gly Gly Glu Leu Val Phe Gln Thr Ser Val His Gly Leu Val  
 245 250 255  
 Leu Gly Ala Thr Ile Tyr Leu Ile Gly Phe Asp Gly Thr Thr Val Ile  
 260 265 270  
 Thr Arg Ala Val Ala Ala Asn Asn Gly Leu Thr Thr Gly Thr Asp Asn  
 275 280 285  
 Leu Met Pro Phe Asn Leu Val Ile Pro Thr Asn Glu Ile Thr Gln Pro  
 290 295 300  
 Ile Thr Ser Ile Lys Leu Glu Ile Val Thr Ser Lys Ser Gly Gly Gln  
 305 310 315 320  
 Ala Gly Asp Gln Met Ser Trp Ser Ala Arg Gly Ser Leu Ala Val Thr  
 325 330 335  
 Ile His Gly Gly Asn Tyr Pro Gly Ala Leu Arg Pro Val Thr Leu Val  
 340 345 350  
 Ala Tyr Glu Arg Val Ala Thr Gly Ser Val Val Thr Val Ala Gly Val  
 355 360 365  
 Ser Asn Phe Glu Leu Ile Pro Asn Pro Glu Leu Ala Lys Asn Leu Val  
 370 375 380  
 Thr Glu Tyr Gly Arg Phe Asp Pro Gly Ala Met Asn Tyr Thr Lys Leu  
 385 390 395 400  
 Ile Leu Ser Glu Arg Asp Arg Leu Gly Ile Lys Thr Val Trp Pro Thr  
 405 410 415  
 Arg Glu Tyr Thr Asp Phe Arg Glu Tyr Phe Met Glu Val Ala Asp Leu  
 420 425 430  
 Asn Ser Pro Leu Lys Ile Ala Gly Ala Phe Gly Phe Lys Asp Ile Ile  
 435 440 445  
 Arg Ala Ile Arg Arg Ile Ala Val  
 450 455

<210> 7  
 <211> 28  
 5 <212> ADN  
 <213> construcción sintética

<220>  
 <221> fuente

10 <222> 1..28

<223> /mol\_type="ADN" /nota= "oligonucleótido para amplificación por PCR" /organismo= construcción sintética"

<400> 7

**ggcgcgccga tgacaaacct gcaagatc** 28

5 <210> 8  
 <211> 38  
 <212> ADN  
 <213> construcción sintética

10 <220>  
 <221> fuente  
 <222> 1..38  
 <223> /mol\_type="ADN" /nota="oligonucleótido para amplificación por PCR" /organismo= construcción sintética"

15 <400> 8  
**ataagaatgc ggccgctcac acagctatcc tccttatg** 38

20 <210> 9  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> construcción sintética

25 <220>  
 <221> fuente  
 <222> 1..35  
 <223> /mol\_type="ADN" /nota="oligonucleótido para la amplificación por PCR" /organismo= construcción sintética"

30 <400> 9  
**ggcgcgccga tgtctaacct gcaagatcaa accca** 35

35 <210> 10  
 <211> 8157  
 <212> ADN  
 <213> construcción sintética

40 <220>  
 <221> fuente  
 <222> 1..8157  
 <223> /mol\_type="ADN" /nota= vector de plásmido" /organismo="construcción sintética"

40 <400> 10

**agggtggcact tttcggggaa atgtgcgcgg aaccctatt tgtttatfff tctaaataca** 60

**ttcaaatatg tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat aatattgaaa** 120

**aaggaagagt atgagtattc aacatttccg tgtcgcctt attccctfff ttgcggcatt** 180

**ttgccttcct gtttttgctc acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg ctgaagatca** 240

**gttgggtgca cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga tccttgagag** 300

**ttttcgcccc gaagaacgtt ttccaatgat gagcactfff aaagttctgc tatgtggcgc** 360

**ggtattatcc cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcggg cggccgatac actattctca** 420

ES 2 690 792 T3

gaatgacttg gttgagtact caccagtcac agaaaagcat cttacggatg gcatgacagt 480  
 aagagaatta tgcagtgctg ccataaccat gagtgataac actgcgcca acttacttct 540  
 gacaacgatc ggaggaccga aggagctaac cgcttttttg cacaaatgg gggatcatgt 600  
 aactcgcctt gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg acgagcgtga 660  
 caccacgatg cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg gcgaactact 720  
 tactctagct tcccggcaac aattaataga ctggatggag gcggataaag ttgcaggacc 780  
 acttctgcgc tcggcccttc cggttggtg gtttattgct gataaatctg gagccggtga 840  
 gcgtgggtct cgcggtatca ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct cccgtatcgt 900  
 agttatctac acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac agatcgtga 960  
 gataggtgcc tcaactgatta agcattggta actgtcagac caagtttact catataact 1020  
 ttagattgat ttaaaacttc attttaatt taaaaggatc taggtgaaga tcctttttga 1080  
 taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcgctt cactgagcgt cagaccccgt 1140  
 agaaaagatc aaaggatcct cttgagatcc ttttttctg cgcgtaatct gctgcttgca 1200  
 aacaaaaaaa ccaccgctac cagcggtygt ttgtttgccc gatcaagagc taccaactct 1260  
 ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgtac ttctagtga 1320  
 gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc tcgctctgct 1380  
 aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg ggttgactc 1440  
 aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acggggggtt cgtgcacaca 1500  
 gcccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg agctatgaga 1560  
 aagcggcacg cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat ccggtaaagc gcagggtcgg 1620  
 aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc tggatcttt atagtcctgt 1680  
 cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag gggggcggag 1740  
 cctatggaaa aacgccagca acgcccctt tttacggttc ctggcctttt gctggccttt 1800  
 tgctcacatg ttctttcctg cgttatccc tgattctgtg gataaccgta ttaccgcctt 1860  
 tgagttagct gataccgctc gccgcagccg aacgaccgag cgcagcaggt cagttagcga 1920  
 ggaagcggaa gagcgcctaa tacgcaaac gcctctcccc gcgcgttggc cgattcatta 1980  
 atgcagctgg cacgacaggt ttcccactg gaaagcgggc agtgagcga acgcaattaa 2040  
 tgtgagttag ctcaactcatt aggcaccca ggctttacac tttatgctcc cggctcgtat 2100  
 gttgtgtgga attgtgagcg gataacaatt tcacacagga aacagctatg accatgatta 2160  
 cgccaagcgc gcaattaacc ctactaaag ggaacaaaag ctgggtaccg ggcccgcgac 2220  
 ctaaccattc aatgattca taactatctc ctagccagaa ttcgtacca actcttggga 2280  
 aatcaggagg ctgatattcg ccagtaagct tcatagaagt gttcaagttt attttgttag 2340  
 caaagatcgt gtacttctga acagtctcaa acccatagta aaatacaact ggggatatac 2400  
 gagagttaac cgtgactaca gctagagaac cattagaacc tttttcgaca ctcaactccat 2460

ES 2 690 792 T3

ggatgttttg cttcattaaa tcaatattgt acttcttcca gttcttaaag tccttaggtt 2520  
 catcattatt cgttggaggt ctccagaaag tgattgaaga accctcaaac ttgctggaaa 2580  
 tttccttacc cttgaccttt aggctttcaa ttttacccaa caatttgccc aagataaaat 2640  
 gcaatccact ggattcaact gagacataac gtttaccgtc gttgatcttc gcagcttttt 2700  
 ctgctgtctc tgtaacaaaa tcgggtacct tcaatggaag ttcagcttgg ccccaggcaa 2760  
 tttcatgacc tgcctttaga acaccagcat catctttcaa cacggcaaca acataagttg 2820  
 tatcagaagg aatagtaaca gattcttctg gctttaaaga tggaacgtcg attgtctttc 2880  
 ccgtgtcctt gtcgataaac aataagtggc ctgtcgtaat gaagtcgtgc ttatttgatg 2940  
 ttgttacaga tccgtgcgca attttaatat gaacgggttc aataaccttc ttatactcta 3000  
 caaggcccgg agtaggatta tgctcactgt tacacaaacc atccatgatg aacactccgt 3060  
 catgaacctc ttccttaaag tcaccaccat aagcataagc tttatgcaac ttaccatctg 3120  
 cagtactaac atcttcgaat tcaataccgt gatttgccca ttcccagata aagccacctt 3180  
 ggtaaaactt ctcctttagt aacaactctt gatattcttt caaagagcca ggaccgttac 3240  
 ccattgcatg gccgtactca cacaagatca aaggcttttc aaacttacca ttttcatcag 3300  
 tgtggttctt cctccacctt tccataattt caaatgttgg gtacatgaaa ctaaagatat 3360  
 ctgcactcaa agcgttcaag tcaccctcat aatgcacaag tctggttaga tccaattgtt 3420  
 taattaactt gtacatggct ttgtggttcc tgccataaca agcttcgta cccaaggacc 3480  
 agataataat cgaaggatga ttgacatctc ttaggacaag ttgggaagct ctgtctaagt 3540  
 acgcgacctc gtactctgga ttatctgata agtaatgggc attaacatcg tagagtttat 3600  
 ttttagtate tggatattca gcctccaagt tcgtatgacg attaaatggc tcttgaacac 3660  
 catgagtttc aagatctgcc tcgtcaatga cccagaagcc cagcttatcg aagaggctat 3720  
 acaccttagg atggtttgga taatgcgagt tacgaacagc attgatgtta aacttcttca 3780  
 ttagaatcaa gtcccataca acaaaatcta atggcacagc tctaccgaac cttggatggc 3840  
 gatcatgtct gttgacacct ctaaagagaa tgtctttgcc attaacagta atgttaccgt 3900  
 ccttcaactc cacttgtctg aaaccaacat ggtgcttaat agattgaatc acactgccat 3960  
 cagatccaat taaatccaac tggacttgt acaaagtagg attttctgcg gtccaatgtt 4020  
 ctggggcctt gacgttgatc ttgaaagctg tttcttcggt ctttttggtg gagaaggaaa 4080  
 taaattcttt agttgaaaaa gtcgtgttcc cattctctc gttcaacaaa gagcttgcac 4140  
 cgtaaacttt agatccatct tcaggttcgt aaagtgtgaa attgatgtga tcataagaag 4200  
 aaccctggac atcaactttc acagaaagct ctgcacctc atactgagag tccacaaaag 4260  
 ttgtagtac cctaactgtc tcaatatggg ccttcttagg caattttagt aaagaaactg 4320  
 ctctgtaaat accagagagc caccattgat cttggtctc gatataagtg gaatcggacc 4380  
 acttgaaaac cttgacgacc actaagtttt cgccctcaga aacgtacttt tggatatcaa 4440  
 attcagcccc gttacgggac cccttattga aaccacata ttgaccatta acataaagct 4500

ES 2 690 792 T3

cgtaacaatt gtccacaccc tcaaattctca atctgtgctc gaacgactca atcgatttcg 4560  
 aatctaattc aaaagttcta gcataaacac cagtaggatt tacagtggga ggatttggga 4620  
 tgtcgattgg gatagggtag tgtacgttcg tgtaaattgg tttaccgtac ttccagtctt 4680  
 cctgaagtcc ccaatgggat ggcacagaaa tgggtctcca tttctttgcc gtttcccagt 4740  
 ctaaattctt agcatccgga gcgtcaagag gtgcatcaaa caacgcaaaa gcccaaggcc 4800  
 cattgagaga ttcgaaaata tcctgatcat agtagtaagc cctagtaggc aatctatctt 4860  
 cgtgaacctt tttggggttc cttaaattct caggaataag gcaagccatg gtgccgtcct 4920  
 gccgagatat tgtgtacact ggatcaaata ataacacttt caaagtgact aatcacaaat 4980  
 tgtcccaaga tatactatag ctctctgttt aacctttata ttgtcaaaaa gggacaatga 5040  
 atgaaagtac aaacacaaac acaaacacaa tgggaaggag tgtccagggt ggtgattcct 5100  
 gactgtactg attcgacgga gttttatttg atttcgttga agtggttaaa gtgaataatt 5160  
 cttgaattga gaggaacaaa gagtggataa aataacggaa tggagaggtc cgagcgatga 5220  
 ataatgtacg attcgggaaga ctatgagccg gctgaacctg aggttatgga ccaactaacgt 5280  
 cctggttgac aagagtagtc atgtaataca aacgtaaatg tgatatttaa tagaatataa 5340  
 gtagatatag ttaaaaagaa gaagaagaat agaaagaata aggttattag aaatttagag 5400  
 tcattttaaa caattgataa cttgggttaa agctcgaagt tttgttgata gtagtttttt 5460  
 tttttgtttt agttggtttg ttcaatagta taaggttaca gggtgcgaga caaacgttgt 5520  
 aacacttttc atctccccc gctaatacacc tagtcgagag ctcgttttcg acactggatg 5580  
 gcggcgttag tatcgaatcg acagcagtat agcgaccagc attcacatac gattgacgca 5640  
 tgatattact ttctgcgcac ttaacttcgc atctgggcag atgatgtcga ggcgaaaaaa 5700  
 aatataaatc acgctaacat ttgattaaaa tagaacaact acaatataaa aaaactatac 5760  
 aatgacaag ttcttgaaaa caagaatctt tttattgtca gtactgagtc gaggcggccg 5820  
 ctggccaccc ggggtctagag gcgcgccgtc gacggtagag cttctcgatg agtatgtgtg 5880  
 tttatttttt ttttattttt tttgccaaat tctgctcttt cctaaatttc aagtgttgag 5940  
 cttgttatcc gctcacaatt ccagcttttg tctcttcacc tttccaact acaagcga 6000  
 cataacaaaa gaataataat tctcctaaga aacacaagcc tcatatacct ttcgagttag 6060  
 ggaagaacat cttctctcat gatacacatt gattcgagct attaaatacc tttttctcaa 6120  
 tcgaaatctc aagtaaaaca gcaatgaaaa cattacgtaa ctaaagggtg tcaccactag 6180  
 aatcatacc cttcacactc gacttcaagt agtgaatggt gtagcaacaa agtccaaata 6240  
 ccaatgtcaa ccaagtaacc gaccgacta ctagaaaaag acgctgttgc tcggaccaca 6300  
 aatttccgct acacttttca caactatact gaagatacaa aaaacgtgtg tgggtatggc 6360  
 tggctaccag gtcgcctggt taaaccaagt caacgtgata catatgtacg ttccaacact 6420  
 aagcctacc taagtttcgg ctacaggct aggcattat taacatgcaa gacaagggag 6480  
 aagcaaagca aagaccaacc gaaaccacc agagcacct gaactttgcg gtgaacagaa 6540

ES 2 690 792 T3

ttccgcaaca tatctgagga taccatgatc tcgttttcct actccatgatg ggaatcaccc	6600
actgttgtcc gtaaatatga ccaaattcct accttgattc ctcacgaata atcgcagtcc	6660
gaaaagccgt tccaaaagcc agtccacagt ccatcaattg gtatgatgat tgtttttttg	6720
ttcaaaactga cacactaacg gtgtggaatg cgaagagtga gcttaccctt ctcctctttg	6780
ctagcagtac ttgcctacct acctactcta ctacgctgcc atattgtcta acattcggct	6840
ttctctatth ctacctggcc tggatggctc cgtctcgccc gcctcacaca catacattcc	6900
tccccctctc gcctgcccc taataattaa acaagttaac aaaaggcgtt acctcttccg	6960
catcctctcc aatctcatac gattccccct tcatccgact tacccaacaa gatacaggat	7020
ctcagtgaaa gatccttctt gccctccctg tctgttgctt actctacatg cgacttggaa	7080
ggccaaagga ctatcgcagt attattcgcc gggaaaccgc gagttccctg ctcttttctt	7140
tcaaaccagg cagcaaacca ggtgaacaca ctctgatgta gtgcagtccc taagtccttt	7200
gaagattcgg ggagctagct acccacgcga atgtaacaaa agaacattta cttttgtggg	7260
gggtgaaaaa gtcgattagg atcttgagc acagaaactg cgcaggggtt tttttcatct	7320
tggagaagca actggctaaa ttcgacacaa acaaaaactg aaaaatggaa aataaaaaat	7380
gaaaaagcaa gctgaattcg aagaaggag aattccgcct tctgcaacca cactaatggt	7440
tggtagtcaa tagatacgc ttagaagggt actatthtat gagtcgatcc ccgcggtgga	7500
gctccaattc gccctatagt gagtcgtatt acgcgcgctc actggccgct gttttacaac	7560
gtcgtgactg ggaaaaccct ggcgttacc aacttaatcg ccttgagca catccccctt	7620
tcgccagctg gcgtaatagc gaagaggccc gcaccgatcg cccttcccaa cagttgcgca	7680
gcctgaatgg cgaatggcgc gacgcgccct gtagcggcgc attaagcgcg gcgggtgtgg	7740
tggttacgcg cagcgtgacc gctacacttg ccagcgccct agcgcgccgct cctttcgctt	7800
tcttcccttc ctttctcgcc acgttcgccc gctttccccg tcaagctcta aatcgggggc	7860
tccctttagg gttccgattt agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg	7920
gtgatggttc acgtagtggg ccatcgccct gatagacggg ttttcgccct ttgacgttgg	7980
agtccacgtt ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct	8040
cggtctattc ttttgattta taagggattt tgccgatttc ggctattgg ttaaaaaatg	8100
agctgattta acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgctt acaattt	8157

**REIVINDICACIONES**

1. Levadura recombinante de la especie *Kluyveromyces lactis*, que como gen exógeno porta un gen, que codifica para un antígeno VP2 del virus de la bursitis infecciosa (IBDV), que está integrado en el genoma de la levadura, y que permite la expresión del antígeno VP2 del virus de la bursitis infecciosa (IBDV) como proteína exógena, **caracterizada por que** esta cepa de *Kluyveromyces lactis* se selecciona de:
- 5
- Kluyveromyces lactis* DSM 25405,  
*Kluyveromyces lactis* DSM 25406, y  
*Kluyveromyces lactis* DSM 25407.
- 10
2. Levadura recombinante según la reivindicación 1, **caracterizada por que** la expresión de gen exógeno tiene lugar de manera constitutiva o por que la expresión de gen exógeno es inducible.
- 15
3. Levadura recombinante según las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizada por que** la expresión de gen exógeno puede cuantificarse indirectamente a través de la expresión de un gen indicador endógeno.
4. Levadura recombinante según una o varias de las reivindicaciones anteriores para su uso en un procedimiento para la vacunación subcutánea.
- 20
5. Levadura recombinante según la reivindicación 4, **caracterizada por que** las levaduras recombinantes se usan como vacunas marcadoras de subunidad.
6. Levadura recombinante según la reivindicación 5, **caracterizada por que** las vacunas marcadoras de subunidad se usan para diferenciar individuos vacunados frente a individuos infectados de modo natural.
- 25
7. Levadura recombinante según las reivindicaciones 5 o 6, **caracterizada por que** las vacunas marcadoras de subunidad presentan al mismo tiempo propiedades fuertemente adyuvantes.
- 30
8. Levadura recombinante según una de las reivindicaciones 5 a 7, **caracterizada por que** las vacunas marcadoras de subunidad son fuertemente inmunógenas.
9. Levadura recombinante según la reivindicación 1 para su uso en un procedimiento para la vacunación subcutánea por medio de células de levadura completas de una levadura recombinante, **caracterizada por que** se genera una inmunización humoral protectora contra proteína exógena expresada y el procedimiento comprende las siguientes etapas:
- 35
- a) cultivo y proliferación de las levaduras recombinantes,  
b) recolección e inactivación de las levaduras,  
c) aplicación de las levaduras recombinantes de acuerdo con un calendario de inmunización que ha de establecerse,  
d) determinación del título de los anticuerpos formados y/o  
e) detección de la inmunización.
- 40
10. Levadura recombinante para su uso según la reivindicación 9, **caracterizada por que** por medio de aplicación subcutánea de células de levadura completas de una levadura recombinante de la especie *Kluyveromyces lactis* se genera una inmunización humoral protectora contra proteína exógena expresada.
- 45
11. Par de oligonucleótidos que presenta una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9.
- 50
12. Vectores de expresión Klp3 o Klp3-MCS de acuerdo con SEQ ID NO: 10, que portan un gen exógeno, **caracterizados por que** el gen exógeno presenta la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 5, para la integración en la cepa de partida de *Kluyveromyces lactis* VAK367-D4, depositada con DSM 23097.
- 55
13. Vector de expresión según la reivindicación 12, **caracterizado por que** el gen exógeno codifica para la proteína VP2-T2S de IBDV con la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 4 o la proteína oVP2-T2S de IBDV con la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 6.
- 60

Figura 1

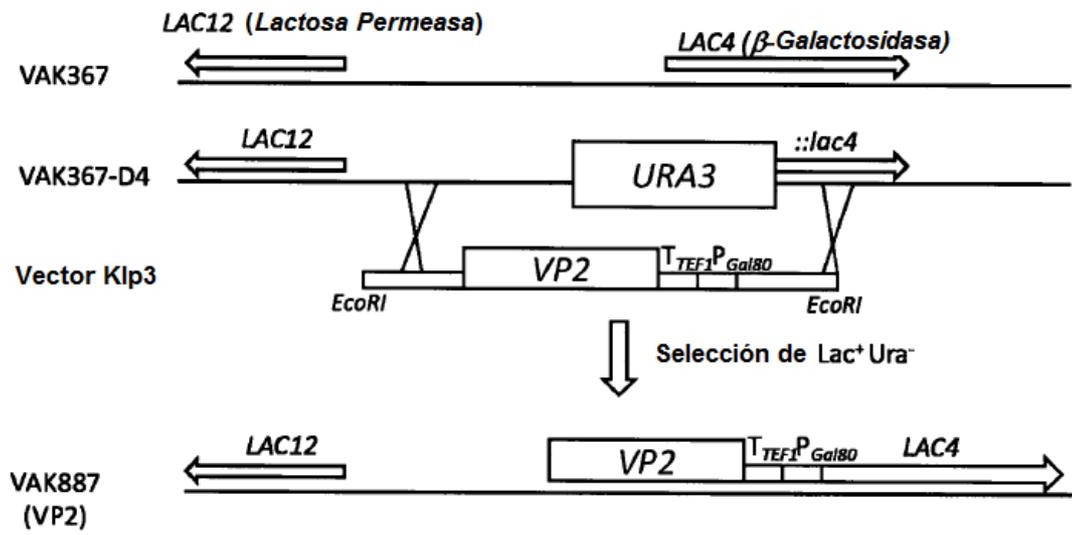


Figura 2A

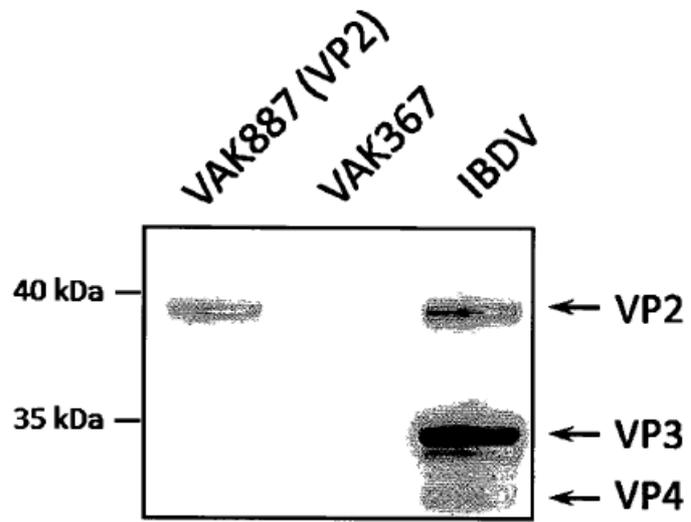


Figura 2B

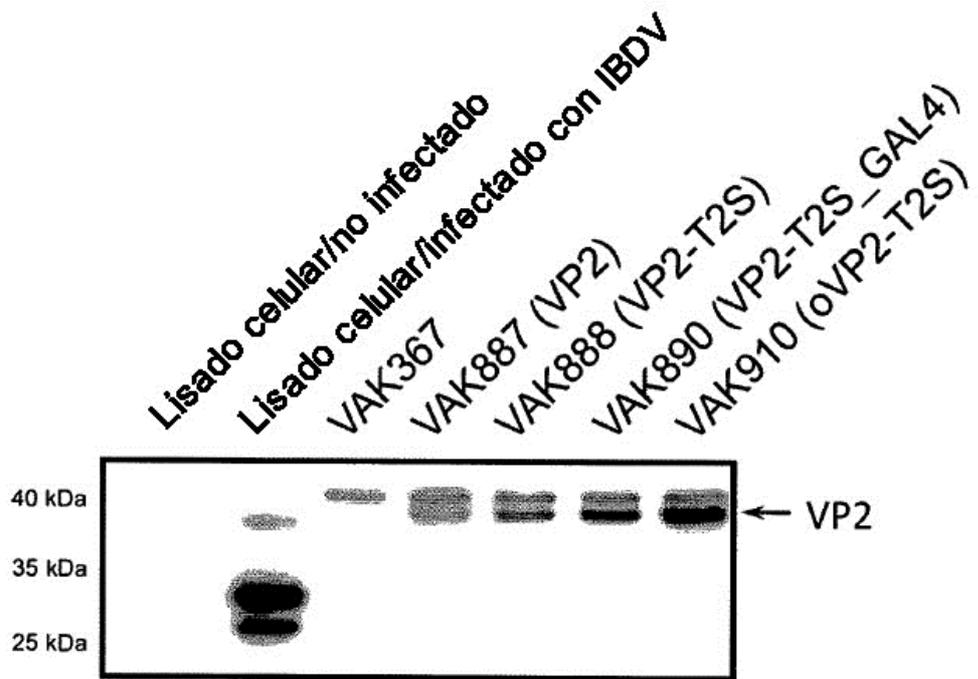


Figura 3A

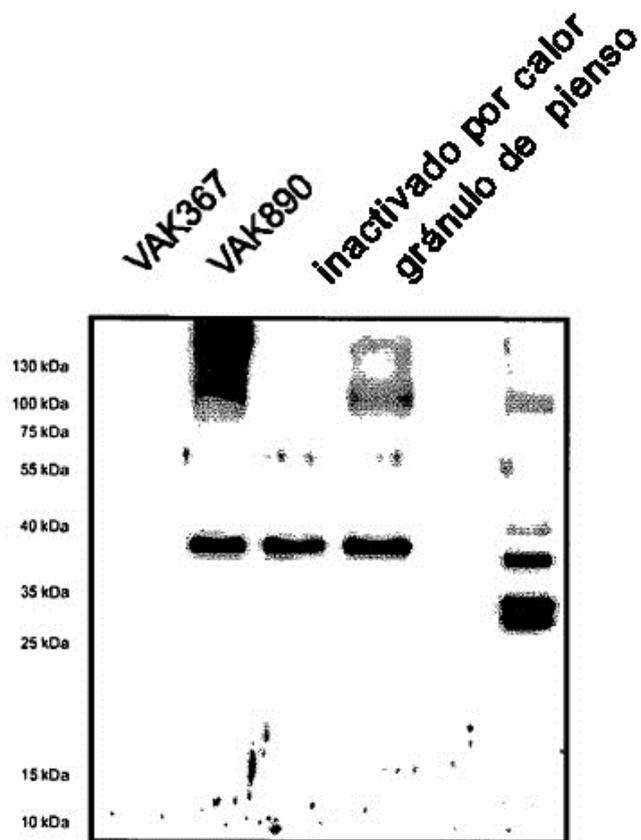


Figura 3B

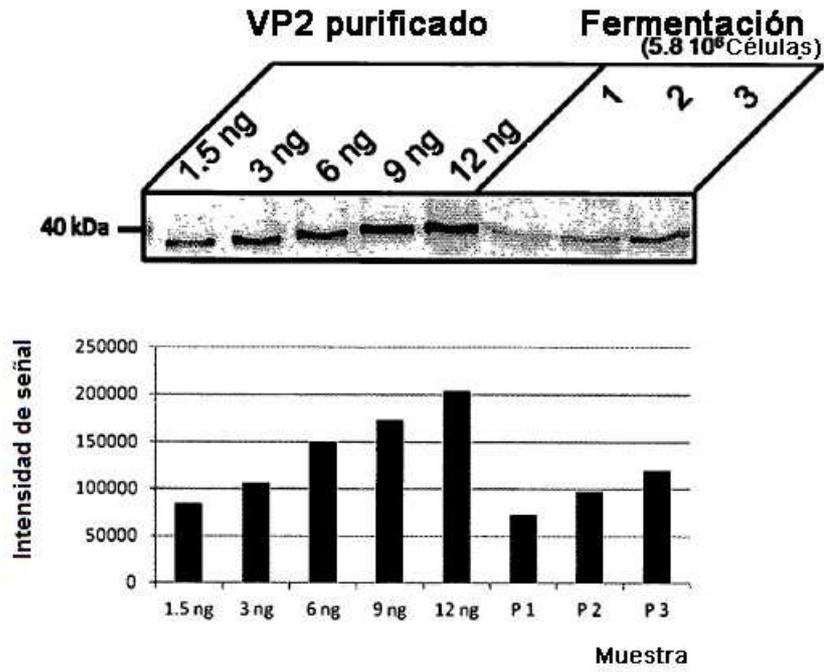


Figura 4A

Esquema de inmunización

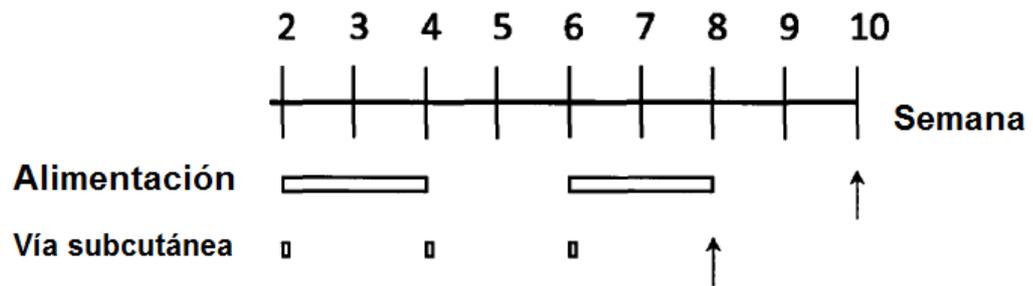


Figura 4B

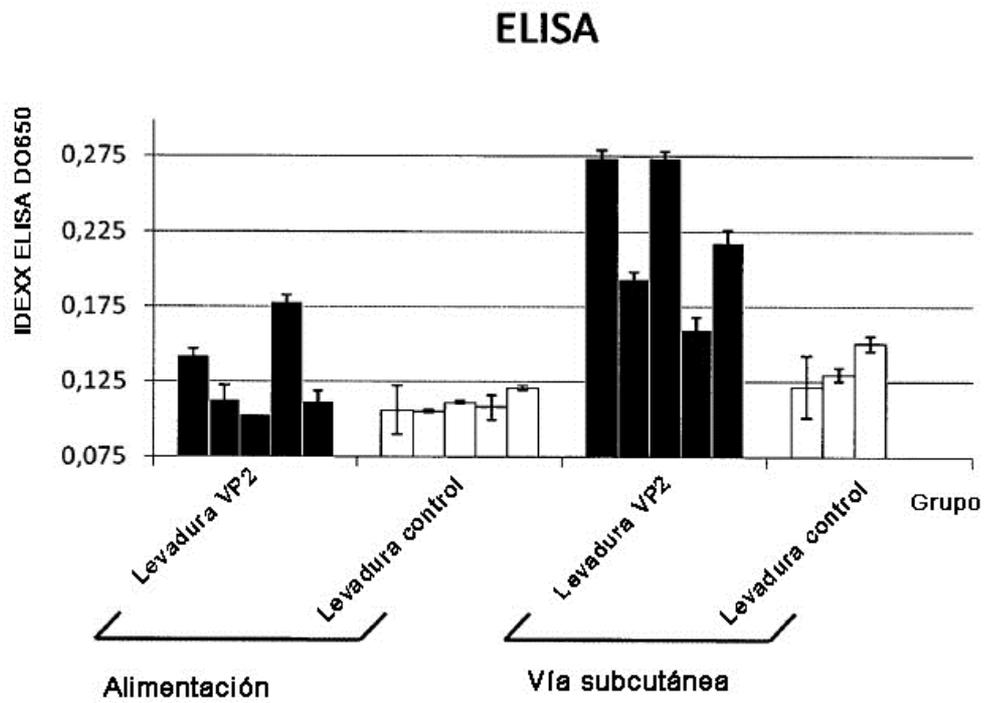


Figura 4C

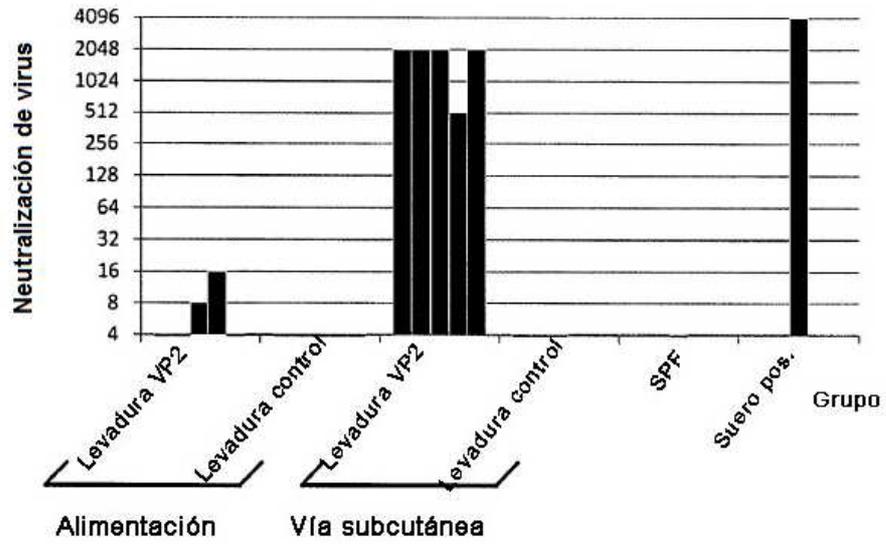


Figura 4D

	Grupo	ELISA	VN N.º positivo
Alimentación	Levadura VP2	$0,13 \pm 0,031$	40 %
	Levadura control	$0,11 \pm 0,006$	0 %
Via subcutánea	Levadura VP2	$0,22 \pm 0,05$	100 %
	Levadura control	$0,13 \pm 0,015$	0 %

Figura 5A

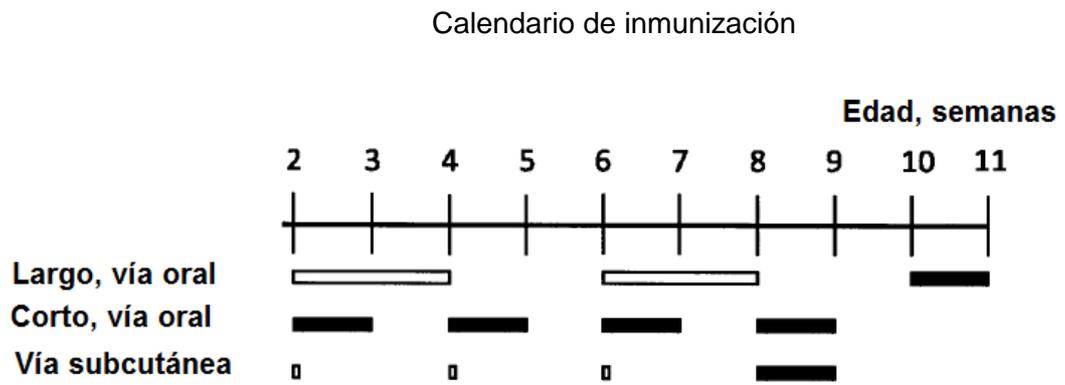


Figura 5B

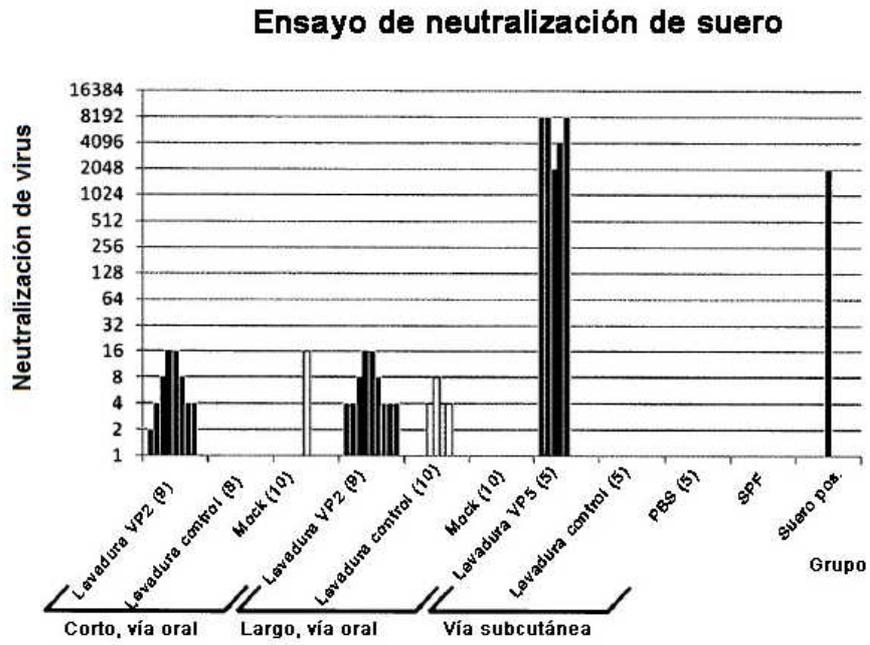


Figura 5C

Grupo	ELISA (título)	VN	Mortalidad	Puntuación de lesiones
Alimentación				
Levadura VP2, corto (9)	1	6,89 ± 5,75	0/9	4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4
Levadura control, corto (8)	1	0	3/8	4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4
Mock, corto (10)	1	1,6 ± 5,06	1/10	4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4
Levadura VP2, largo (9)	35,56 ± 36,12	7,56 ± 5,08	0/9	1, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4
Levadura control, largo (10)	9,4 ± 19,6	2 ± 2,91	1/10	4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4
Mock, largo (10)	4 ± 2,58	0	0/10	4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4
Levadura VP2, largo, saponina (10)	68,8 ± 70,87	6,8 ± 5,46	0/10	2, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4
Levadura control, largo, saponina (9)	3,7 ± 38	0,89 ± 1,76	1/9	4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4
Mock, largo, saponina (9)	1	0	0/9	4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4
Via subcutánea				
Levadura VP2 (5)	2707 ± 823,4	3072 ± 1448,2	0/5	1, 1, 1, 1, 3
Levadura control (5)	1	> 8	1/5	4, 4, 4, 4, 4, 4
PBS (5)	1	> 8	1/5	4, 4, 4, 4, 4, 4

Figura 6

