



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112014014390-0 B1



(22) Data do Depósito: 12/12/2012

(45) Data de Concessão: 09/08/2022

(54) Título: LEVEDURA RECOMBINANTE, SEUS USOS, MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO DE VACINA SUBCUTÂNEA, OLIGONUCLEOTÍDEO, E VETOR DE EXPRESSÃO

(51) Int.Cl.: C12N 15/81; A61K 39/00; A61K 39/12; A61K 39/02; G01N 33/569.

(30) Prioridade Unionista: 13/12/2011 DE 10 2011 121 069.9.

(73) Titular(es): MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT HALLE-WITTENBERG.

(72) Inventor(es): KARIN BREUNIG; SVEN-ERIK BEHRENS.

(86) Pedido PCT: PCT DE2012001205 de 12/12/2012

(87) Publicação PCT: WO 2013/107436 de 25/07/2013

(85) Data do Início da Fase Nacional: 12/06/2014

(57) Resumo: LEVEDURA RECOMBINANTE, SEUS USOS, PROCESSO PARA VACINAÇÃO, OLIGONUCLEOTÍDEO, VETOR DE EXPRESSÃO, E MÉTODO DE PRODUÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO DE VACINA. A invenção refere-se a leveduras recombinantes da espécie *Kluyveromyces lactis* para a produção de uma resposta imunológica humoral contra antígenos definidos, a produção dessas leveduras e seu uso para a vacinação protetora contra patógenos e células malignas, que contêm esses antígenos.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"LEVEDURA RECOMBINANTE, SEUS USOS, MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO DE VACINA SUBCUTÂNEA, OLIGONUCLEOTÍDEO, E VETOR DE EXPRESSÃO"**.

Campo da Invenção

[0001] A invenção se refere a leveduras recombinantes para a produção de uma resposta imunológica humoral contra antígenos definidos, à produção dessas leveduras e ao seu uso para a vacinação protetora contra patógenos e células malignas, que contêm esses antígenos.

Estado da Técnica

[0002] As vacinas são usadas, para prevenir doenças (vacinas preventivas) ou para tratar doenças estabelecidas (vacinas imunoterapêuticas). Programas de vacinação preventiva contribuíram nos últimos cerca de 100 anos substancialmente para a redução de doenças infecciosas. Vacinas imunoterapêuticas são desenvolvidas e usadas apenas a cerca de 20 anos, por exemplo, contra infecções persistentes com vírus, bactérias ou parasitas ou contra doenças cancerígenas. O objetivo da vacinação é a indução de resposta imunológica células (isto é, essencialmente mediada por células T e NK) e/ou humoral (isto é, essencialmente mediada por células /anticorpos B), bem como de uma memória imunológica ("*memory*") contra componentes antigênicos de patógenos ou células malignas (tumorogênicas).

[0003] Vacinas clássicas contêm todo o agente patogênico em forma atenuada (inativada) ou morta, inclusive seu material genético, ácidos nucleicos na forma de DNA ou RNA. Para a produção, essas vacinas clássicas necessitam geralmente de medidas de segurança particulares e/ou a utilização de cobaias e/ou a utilização de culturas celulares; além disso, muitas vezes essas são caras e devem ser arma-

zenadas e transportadas utilizando cadeias de frio. Além disso, as vacinas envolvem o risco, de que as substâncias da produção (por exemplo, da covaia ou da cultura celular) produzam efeitos colaterais no indivíduo vacinado ou que ocorram reativações indesejadas do patógeno. Os problemas existem também no diagnóstico: assim, por exemplo, no caso da vacinação de gado, os animais vacinados não conseguem ser diferenciados de animais naturalmente infectados, de modo que o sistema de prevenção precoce, que se baseia na detecção de novas infecções, pode falhar. Por conseguinte, foram desenvolvidas as chamadas vacinas "*subunidade*", que contêm somente partes do agente patogênico. A condição para isso é que "antígenos principais" do respectivo patógeno sejam conhecidos. Os antígenos principais são geralmente componentes superficiais do patógeno, que podem ser reconhecidos pelo sistema imunológico, por exemplo, proteínas de um envelope viral ou da cápside do vírus. Esses, também na presença de uma partícula de vírus completa, podem induzir uma resposta imunológica humoral e/ou celular e uma memória imunológica no hospedeira contra o vírus. Visto que na "*vacinação subunidade*" faltam, portanto, componentes típicos do patógeno, indivíduos vacinados podem ser distinguidos de indivíduos infectados naturalmente através de um diagnóstico diferencial; fala-se, por conseguinte, também de uma "*vacina comercial subunidade*". As desvantagens de muitas vacinas *subunidade* são muitas vezes uma produção dispendiosa e uma imunogenicidade muitas vezes insuficiente: enquanto os próprios agentes patogênicos podem cultivados eficientemente (com as restrições citadas acima), seis antígenos principais precisam ser produzidos geneticamente com custos intensos e geralmente processos ineficientes e são purificados de forma dispendiosa. Vacinas *subunidade* obtidas assim são correspondentemente sensíveis, muitas vezes também precisam ser armazenadas e transportadas refrigeradas e têm uma baixa durabilidade. Por esses motivos, uma grande parte das

vacinas em massa continua a se basear no princípio clássico com agentes patogênicos completos. Por exemplo, a maioria das vacinas contra a doença de aves bursite infecciosa (IBD) amplamente difundida, baseia-se atualmente na maioria em vírus atenuados (enfraquecidos) ou inativados do vírus causador de IBD da bursite infecciosa (IBDV).

[0004] Tenta-se compensar o problema da imunogenicidade mais fraca nas vacinas *subunidade* através do uso adicional de adjuvantes. Os adjuvantes são substâncias, que foram provadas empiricamente como sendo estimulantes imunológicos. Esses reforçam a resposta imunológica de forma inespecífica e muitas vezes de maneira pouco entendida. Até agora, são permitidos apenas poucos adjuvantes para o uso humano. Os únicos agentes auxiliares, que são permitidos, por exemplo, nos EUA para o uso no ser humano, são sais de alumínio, hidróxido de alumínio e fosfato de alumínio. As formulações de sal de alumínio causam, contudo, dificuldades adicionais no armazenamento da referida vacina. Além disso, esses adjuvantes não desenvolvem uma eficiência satisfatória com todos os antígenos.

[0005] A construção genética de proteínas exógenas, nas quais são incluídas a maioria das vacinas *subunidade*, pode ser efetuada em várias células hospedeiras. Além da bactéria intestinal *Escherichia coli* são estabelecidas células de mamíferos, que podem se multiplicar em culturas celulares, células vegetais e diversos fungos, como sistemas hospedeiros. Sistemas microbianos, tais como bactérias e fungos, podem ser cultivados de forma particularmente econômica em grande escala. Células de levedura dos gêneros de levedura *Saccharomyces*, *Pichia* e *Kluyveromyces* já são usadas há décadas de forma rotineira para a expressão de proteínas exógenas. Células de levedura têm a vantagem, comparadas com as bactérias, de que essas são eucariotas, isto é, elas são semelhantes em muitos aspectos com as células animais e as pro-

teínas eucarióticas, isto é, proteínas, que são formadas nas células animais e/ou devem ser funcionais, podem ser produzidas economicamente em leveduras em forma natural ou quase natural (Bathurst, 1994; Gellissen & Hollenberg, (1997). Inicialmente, as leveduras foram usadas somente para produzir as proteínas exógenas e as proteínas foram purificadas a partir das células de levedura e usadas como vacinas *subunidade*. Apenas há pouco tempo, tentou-se administrar as próprias leveduras ou frações celulares das leveduras como vacinas.

[0006] Há cerca de 5 anos tenta-se usar a própria *Saccharomyces cerevisiae* ("fermento para panificação", *S. cerevisiae*) para a vacinação: assim, foi possível mostrar, que através de células de *S. cerevisiae* que exprimem antígeno, aplicadas por via subcutânea, podem ser ativadas células dendríticas e produzidas respostas imunológicas da célula T específicas para antígeno, especialmente respostas citotóxicas da célula T contra certos antígenos. Essa resposta imunológica celular provou ser protetora em relação à administração de certas células tumorais, isto é, nos animais vacinados formaram-se menos tumores após a vacinação do que em animais de controle. Atualmente, esse processo também é testado em aplicações imunoterapêuticas em doenças tumorais (Stubbs e colaboradores, 2001; Lu e colaboradores, 2004).

[0007] O especialista conhece as seguintes fontes do estado da técnica, nas quais é descrita uma vacinação com base em leveduras:

[0008] Uma série de patentes norte-americanas, assim, por exemplo, 20090304741, 5830463 e 10738646 e 20070166323 descrevem a utilização de *S. cerevisiae* que contêm pelo menos um antígeno recombinante, na imunoterapia. Foi mostrado, que essas leveduras são eficazes, para estimular uma reação imunológica, em particular, uma resposta imunológica mediada por uma célula.

[0009] A WO/2006/044923 publica leveduras (*S. cerevisiae*), que

exprimem várias proteínas do vírus da hepatite C (HCV) de forma recombinante e que pode provocar uma resposta imunológica, principalmente uma célula T, contra essas proteínas HCV e que deve ser usada como vacina contra a hepatite C crônica.

[0010] A WO/2007/092792 descreve o possível uso de *S. cerevisiae* recombinante contra infecções pelo vírus da influenza, sendo utilizada uma combinação de várias cepas de levedura, cuja aplicação leva a uma indução de célula T, portanto, a uma resposta imunológica celular.

[0011] A WO/2011/032119 se refere a um processo para o aperfeiçoamento da eficácia de uma imunoterapia em pacientes. O processo compreende um agente à base de levedura, que modula a produção ou a sobrevivência de células CD4+ TH17.

[0012] Em nenhuma das patentes acessíveis a levedura é comprovadamente usada para a indução de uma resposta imunológica humoral protetora contra doenças infecciosas ou tumores (tópico desse pedido). Além disso, foram usadas ou as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* ou *Pichia pastoris*, mas não *Kluyveromyces lactis* (tópico desse pedido).

[0013] Tal como *S. cerevisiae*, assim a "levedura do leite" *Kluyveromyces lactis* (*K. lactis*) possui o status de GRAS (GRAS: *generally regarded as safe*), isto é, essa é apropriada para a aplicação no animal ou ser humano (van Ooyen e colaboradores 2006). Embora morfologicamente muito semelhantes às leveduras para panificação, *S. cerevisiae*, as linhas de desenvolvimento dos dois gêneros desenvolveram-se durante 100 milhões de anos a partir de um precursor comum em diferentes direções. *K. lactis* distingue-se, por conseguinte, em muitas propriedades essenciais de *S. cerevisiae*. Algumas dessas diferenças são de grande importância para a utilidade em aplicações biotecnológicas. A evolução de *S. cerevisiae* ocasionou a especialização do metabolismo na fermentação alcoólica e, com isso, a perda de muitos genes dos precursores. A fermentação alcoólica, contudo, é atípica para a maioria das

leveduras. Na *S. cerevisiae*, a fermentação também é efetuada com altas concentrações de glicose, quando há oxigênio e a respiração mitocondrial, na verdade, permitiu um rendimento energético muito mais eficiente da reação do açúcar: a função das mitocôndrias, as "usinas de energia" da célula, é amplamente suprimida através da "repressão da glicose". A *K. lactis* distingue-se consideravelmente de *S. cerevisiae* na regulação da função das mitocôndrias (Chen and Clark-Walker, 1995, Clark-Walker, 2007). A *K. lactis*, ao contrário da *S. cerevisiae*, pertence às chamadas leveduras "de efeito Crabtree negativo". Tais leveduras, via de regra, não formam qualquer etanol em condições rigidamente aeróbicas, mas sim, desintegram a glicose completamente em CO₂ através da atividade mitocondrial formando ATP. Essa propriedade fisiológica é de fundamental importância, visto que essa leva a um nítido aumento do rendimento da biomassa em fermentações em escala industrial, o que tem como consequência uma nítida redução de custos na utilização dessas leveduras como produtoras de proteínas recombinantes. Além disso, os estudos em *K. lactis* mostraram, que as mutações na via de sinalização de glicose mediada pela hexoquinase podem melhorar a expressão de genes heterólogos (Donnini e colaboradores, 2004). Uma expressão de glicose reduzida, em particular, de genes respiratórios, é uma característica das leveduras de efeito "Crabtree negativo" e poderia estar relacionada com a melhor expressão de gene exógeno empiricamente observada nessas leveduras.

[0014] As *K. lactis* e *S. cerevisiae* apresentam, além disso, diferenças consideráveis na composição dos glucanos da parede celular (Backhaus e colaboradores, 2011); essas diferenças baseiam-se supostamente em diferentes glicosiltransferases no aparelho de Golgi, que participa na maturação de glicoproteínas: assim, as glicoproteínas em *S. cerevisiae* contêm muitas vezes fosfatos de manose, as glicoproteí-

nas em *K. lactis* principalmente N-acetilglucosaminas terminais (Raschke und Ballou, 1972). Supõe-se, que essas diferenças entre *S. cerevisiae* e *K. lactis* na glicosilação e secreção de proteínas, bem como na biossíntese da parede celular têm uma influência considerável sobre a localização intracelular, a dobra, bem como sobre a estabilidade e, dessa maneira, também sobre a imunogenicidade de proteínas exógenas expressas de forma heteróloga (Uccellitti e colaboradores, 2004).

[0015] A WO/2010/054649 descreve a produção de um sistema recombinante de *K. lactis*. Nos exemplos de aplicação indicado na mesma, as cepas recombinantes, que foram derivadas da cepa VAK367-D4, foram usados para a vacinação da mucosa ou oral contra vários antígenos. A desvantagem da vacinação oral/da mucosa, contudo, é que as vacinas precisam ser usadas em grandes quantidades, para atingir uma imunização protetora.

Descrição das Figuras

[0016] A **Figura 1** mostra esquematicamente a produção da cepa de vacina VAK887, que porta o gene exógeno IBDV VP2, através de recombinação homóloga na cepa de partida VAK367-D4. Através da transformação do plasmídeo Klp3-MCS (**SEQ ID NO.: 10**), que continha o gene VP2 da cepa IBDV D78, o gene exógeno VP2, através de recombinação homóloga, foi usado no locus cromossomal LAC4, que estava destruído devido a inserção do gene *URA3*. Na recombinação no genoma hospedeiro o gene *URA3* foi substituído pelo gene VP2 e o gene LAC4 é novamente produzido; cepas de levedura recombinantes puderam ser obtidas através da seleção em meio de lactose sem uracila. A seguir, a expressão de *LAC4* (β -galactosidase) é controlada através do promotor *KIGAL80*, a expressão do gene VP2 através do promotor LAC4.

[0017] A **Figura 2A** mostra a expressão de IBDV VP2 através da cepa VAK887 em comparação com a cepa de origem (VAK367) e em

comparação com células de frangos infectadas com o IBDV por meio de análise Western com um anticorpo específico de VP2. A **Figura 2B** mostra a análise de expressão de IBDV VP2 recombinante ou IBDV VP2-T2S mutado em diversas variantes de *K. lactis* que exprimem VP2. A variante de *K. lactis* original (VAK887) exprimiu quantidades apenas moderadas de proteína viral. A expressão de proteína VP2 pôde ser aumentada na cepa de *K. lactis* VP2-T2S (VAK888), em que a treonina na posição de aminoácido 2 da proteína VP2 foi substituída por serina. Foi possível obter um outro aumento através da elevação da dose gênica *KIGAL4* (VP2-T2S GAL4 = VAK890) ou através da utilização de um códon de levedura do gene VP2 sintético otimizado (oVP2-T2S = VAK910).

[0018] A **Figura 3** mostra que a inativação pelo calor das leveduras de acordo com a invenção a 90 °C durante 2 horas não leva a uma perda da proteína recombinante VP2-T2S (Figura 3A). Quantidades em cada caso iguais de proteína de leveduras não inativadas, leveduras inativadas e leveduras de um pellet de alimento foram separadas em um SDS PAGE e testadas em um Western-Blot com um anticorpo anti-VP2 em comparação com lisados celulares de células de aves, que estavam infectadas ou não infectadas com IBDV. A Figura 3 mostra, além disso, que a quantidade de VP2-T2S na variante VAK890 importa em cerca de 0,7 fg de proteína heteróloga por célula de levedura (Figura 3B). Aqui, quantidades definidas de VP2-T2S purificadas, em comparação com VP2 de um número de células definido de *K. lactis* (cepa VAK890) cultivadas no fermentador, foram tingidas no Western Blot e o resultado foi avaliado densitometricamente.

[0019] A **Figura 4** esclarece a vacinação em camundongos com células completas de levedura de *K. lactis* variante VAK890, inativadas com calor, aplicadas por via subcutânea, em comparação com a vacinação oral com células completas de *K. lactis* variante VAK890. A Figura

4A mostra o esquema de imunização: foi imunizado três vezes por via subcutânea, com duas semanas de pausa cada; para a comparação, os camundongos foram alimentados duas vezes durante duas semanas. Duas semanas (seta) depois da última aplicação de levedura, amostras de soro dos camundongos tratados foram testados em um ELISA específico para IBDV (Figura 4B) e em um ensaio de neutralização de IBDV para a es de anticorpo anti-VP2 (Figura 4C). A Figura 4D resume, que camundongos, que foram tratados com *K. lactis* que exprimem VP2 (cepa KI VP2-T2SGAL4 (VAK490)), apresentam títulos de anticorpos/anticorpos neutralizantes mais elevados do que camundongos, que foram tratados com *K. lactis* de tipo selvagem (cepa VAK367). Além disso, foi mostrado, que *K. lactis* (cepa VAK890) aplicados por via subcutânea apresentam títulos nitidamente mais elevados de anticorpos/anticorpos neutralizantes do que camundongos, que foram alimentados com *K. lactis* (cepa VAK890). Camundongos, que foram imunizados com *K. lactis* (cepa VAK890) mostraram, contudo, também um título aumentado de anticorpos/anticorpos neutralizantes em comparação com camundongos, que foram tratados com *K. lactis* de tipo selvagem (cepa VAK367).

[0020] A **Figura 5** mostra a vacinação oral e subcutânea em frangos com células de levedura completas de *K. lactis* variante VP2-T2SGAL4 (VAK890), inativadas com calor. Para a vacinação oral, aplicou-se ou um esquema curto 1/1/1/1/1 (alimentar por 1 semana, 1 semana de pausa, alimentar por 1 semana e assim por diante) ou um esquema mais longo 2/2/2 (Figura 5A). Depois de 1 semana ou 2 semanas de pausa depois da vacinação, todos os animais tratados foram infectados com IBDV (cepa Edgar) em uma concentração de 100 EID₅₀ por animal (vírus *challenge*; barras pretas). Depois da vacinação oral, em particular, depois da aplicação do esquema de tratamento prolongado, conseguiu-

se detectar em vários animais um título aumentado de anticorpos neutralizantes de vírus. A vacinação subcutânea com *K. lactis* recombinante, ao contrário, produziu altos títulos de anticorpos neutralizantes de vírus e todos os animais tratados (Figura 5B, C; ELISA específico para IBDV, ensaio de neutralização IBDV). Nenhum dos animais tratados com levedura de *K. lactis* recombinante morreu depois da infecção com IBDV, independente do fato, qual esquema de tratamento foi usado. Ao contrário disso, a taxa de mortalidade no grupo de controle fez 10-35% (Figura 5C). A análise das lesões nas bursas dos animais tratados mostrou, que cerca de 10% dos animais tratados por via oral não apresentaram quaisquer indícios de uma infecção viral depois da inoculação com IBDV, depois da aplicação do esquema de tratamento prolongado: nesse caso, foi usada uma chamada "contagem de lesões" – as contagens 1, 2 não ou quase não indicam bursas lesionadas; as contagens 3, 4 indicam bursas lesionadas e fortemente lesionadas. Ao contrário disso, todos os animais, nos quais o *K. lactis* recombinante cepa VAK890 foi aplicado por via subcutânea, mostraram uma completa proteção da vacina contra IBDV (Figura 5C).

[0021] A **Figura 6** mostra esquematicamente a formação do vetor Klp3-MCS (**SEQ ID NO.: 10**).

Descrição da Invenção:

[0022] A possibilidade de aplicar leveduras recombinantes para a vacinação subcutânea é conhecida pelo especialista do estado da técnica: Stubbs e colaboradores (2001), Nat. Med. 7: 625-629; Stubbs and Wilson (2002) Curr. Opin. Mol. Ther. 4: 35-40; Wansley e colaboradores (2008) Clin. Cancer Res. 14: 4316-4325; US 5.830.463, WO/2006/044923; WO/2007/092792 e WO/2011/032119. Nos exemplos de execução dessas publicações, trabalhou-se, contudo, exclusivamente com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. "Levedura" é um

nome genérico para microrganismos eucarióticos de crescimento unicelular, em parte, com propriedades muito diferentes devido à evolução divergente durante mais de centenas de milhões de anos (cerca de 100 milhões de anos para *S. cerevisiae* e *K. lactis*). Ao usar *S. cerevisiae* e *K. lactis* com a finalidade da vacinação em eucariontes superiores, tais como animal ou ser humano, deve-se partir, por conseguinte, do fato, de que uma resposta imunológica causada pela *S. cerevisiae* distingue-se muito de uma resposta imunológica causada pela *K. lactis*. Isso vale tanto para a resposta imunológica contra os antígenos exógenos expressados na levedura, como também para a resposta imunológica contra antígenos próprios da levedura. Em imunizações subcutâneas com células de *S. cerevisiae* completas, foi produzida uma indução de célula T, portanto, uma resposta imunológica *celular*. Uma resposta imunológica *humoral* protetora contra um antígeno com *S. cerevisiae* recombinante de maneira simples (isto é, através de aplicação direta de uma única cepa que exprime antígeno) não foi confirmada até agora no estado da técnica.

[0023] Com base no fundamento apresentado acima, o objetivo é o de proporcionar um processo, com o qual pode ser produzida uma resposta imunológica contra certos antígenos. Um outro objetivo consistiu em produzir uma vacina marcadora *subunidade*, com a qual é possível distinguir indivíduos vacinados daqueles naturalmente infectados. Um outro objetivo consistiu em produzir uma vacina marcadora *subunidade*, que apresenta ao mesmo tempo propriedades fortemente adjuvantes e, com isso, é altamente imunogênica.

[0024] Esses objetivos foram atingidos através da disponibilização de um sistema de expressão baseado em levedura, que permite a integração específica de genes exógenos no genoma da levedura. Leveduras recombinantes, que exprimem genes exógenos, podem ser rapida-

mente produzidas com esse sistema (isto é, dentro de poucas semanas). As leveduras podem proliferar-se a baixos custos no fermentador em grandes quantidades (por exemplo, na faixa de quilograma (kg)). Através da expressão e fermentação regulada no processo com alimentação em batelada (*fed-batch*), os antígenos citotóxicos também podem ser exprimidos nesse sistema de levedura. Após a expressão do gene exógeno, a levedura é ativada por calor e pode, então, ser armazenada e transportada sem resfriamento como pó. A levedura em pó pode ser usada diretamente como vacina marcadora *subunidade*, isto é, sem outro fracionamento ou como emulsão ou como pellet (vide os exemplos de execução). A formulação do antígeno e o efeito adjuvante necessário para a imunização eficaz, isto é, protetora, são assegurados por dois fatores: (i) através da possibilidade da modificação genética específica da proteína exógena expressa, (ii) através da expressão da proteína exógena na levedura e da aplicação direta da levedura em forma oral ou subcutânea; a própria levedura tem um forte efeito adjuvante. É dada preferência à aplicação subcutânea. Foi produzida uma cepa de levedura recombinante; essa exprime um antígeno de vírus específico e pode ser usada no processo de acordo com a invenção para a vacinação subcutânea. Através do respectivo vírus foi obtida uma proteção protetora total contra uma infecção. Nesse caso, foram usadas apenas quantidades muito pequenas de levedura (por exemplo, na faixa de miligrama (mg) na aplicação subcutânea em aves). Apenas uma aplicação de 2 a 3 vezes foi necessária, para obter essa proteção.

[0025] O processo de acordo com a invenção é apropriado tanto para a aplicação na área da medicina humana, como também na área da medicina-veterinária. A aplicação preferida do processo de acordo com a invenção é na área da medicina-veterinária.

[0026] O processo de acordo com a invenção é efetuado com leveduras. Leveduras apropriadas são, por exemplo, leveduras dos gêneros

Saccharomyces spec., *Pichia spec.* e *Kluyveromyces spec.*. Em uma forma de concretização preferida, o processo de acordo com a invenção é efetuado com leveduras do gênero *Saccharomyces spec.* e *Kluyveromyces spec.*. Neste caso, a utilização de *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces lactis* (K. lactis) é particularmente preferida. Na forma de concretização mais preferida, o processo de acordo com a invenção é efetuado com a levedura *Kluyveromyces lactis*.

[0027] A levedura *K. lactis* pertence às chamadas leveduras "food grade", que têm o status de GRAS (GRAS: generally regarded as safe) (geralmente considerado como seguro). Tal como as leveduras para panificação, que são testadas e aprovadas ao longo de milhares de anos como aditivo alimentar, a levedura *K. lactis* frequentemente representada nos produtos lácteos, é considerada também para a indústria alimentícia como sendo inofensiva.

[0028] Além da possibilidade para a fermentação esclarecida sob "estado da técnica", a levedura *K. lactis*, comparada com a *S. cerevisiae*, apresenta inúmeras vantagens com respeito à expressão de genes heterólogos. A *K. lactis* pertence às chamadas leveduras "petite negative" (negativas pequenas), isto é, a perda do DNA mitocondrial é letal (devido ao colapso do potencial de membrana mitocondrial (Chen e colaboradores, 1995, Clark-Walker, 2007)). A função da mitocôndria está estreitamente acoplado à transmissão de sinal dependente de Ca^{2+} , à produção de compostos de oxigênio reativos, à resposta ao estresse da célula, à glicosilação da proteína e à integridade da parede celular. Com isso, a função da mitocôndria influencia decisivamente a produção de glicoproteínas recombinantes e a composição da parede celular.

[0029] Nas leveduras e mamíferos, as primeiras etapas da N-glicosilação de proteínas, que se realizam na retícula endoplasmática, é igual. Contudo, as etapas que se realizam no aparelho de Golgi divergem umas das outras. As glicosiltransferases presentes no aparelho de

Golgi são diferentes nas diversas espécies de leveduras. Com isso, ocorrem diferenças na composição das glicoproteínas na parede celular. Na *K. lactis*, as glicoproteínas apresentam N-acetilglucosaminas terminais, ao contrário do fosfato de manose na *S. cerevisiae*. (Raschke und Ballou, 1972). Nas vacinações isso poderia ter efeitos consideráveis sobre a estimulação do sistema imunológico através das respectivas espécies de leveduras.

[0030] A melhor secreção de proteínas recombinantes em mutantes de *K. lactis* com α 1,6-manosil transferase modificada (*KIOCH1*) ilustra a ligação entre a glicosilação de proteína/secreção e a biossíntese da parede celular (Uccelletti e colaboradores, 2004). Modificações na glicosilação de proteína influenciam, além disso, a localização intracelular de proteínas recombinantes, que são retidas no trajeto para a secreção devido à falta de dobra.

[0031] A *K. lactis* é uma das poucas espécies de leveduras, que podem aproveitar a lactose como fonte de carbono e energia. A lactose é um açúcar barato, que é obtida em grandes quantidades como componente do soro de leite (por exemplo, como subproduto na indústria de laticínios). A *K. lactis* com a lactose pode obter taxas de crescimento semelhantes às com a glicose. A regulação dos genes envolvidos no metabolismo da lactose foi intensamente examinada. O forte promotor de β -galactosidase (LAC4) pode ser usado para a regulação da expressão de genes heterólogos e produção de proteínas recombinantes (van Ooyen e colaboradores, 2006, Breunig e colaboradores, 2000). Devido à repressão de glicose reduzida, a expressão heteróloga de genes em culturas de *K. lactis*, que foram cultivadas em meio contendo glicose, pode ser induzida de forma rápida e eficiente através da adição de lactose.

[0032] De acordo com a invenção, através de processos genéticos, é gerada uma cepa de *K. lactis* preferivelmente *VAK367-D4* e variantes

dessa cepa, que permite a integração específica de genes exógenos no locus *LAC4* do genoma da levedura (**Figura 1**). Essa integração requer apenas uma etapa através de um plasmídeo construído de forma correspondente; uma seleção de cepas recombinantes é possível sem o uso de genes de resistência aos antibióticos e a expressão de genes exógenos nas cepas recombinantes pode ser induzida através do promotor *LAC4* mediante a adição de lactose no meio. Células de *K. lactis* com genes exógenos integrados podem ser geradas e caracterizadas em poucas semanas através desse método. Os dois aspectos desse sistema são de grande importância: por um lado, dessa maneira, é possível o cultivo reproduzível de células de levedura, que contêm, em cada caso, quantidades definidas de uma proteína exógena (**Figuras 2, 3**). Por outro lado, na aplicação para a vacinação contra antígenos plásticos (não modificáveis) (tais como, por exemplo, o antígeno da influenza hemaglutinina), podem ser geradas novas cepas de leveduras em pouco tempo, por exemplo, quando ocorrem novas cepas do vírus da influenza, potencialmente pandêmicas. Nesse caso, a probabilidade é alta, que as cepas de *K. lactis* recombinantes recentemente geradas apresentem propriedades semelhantes às cepas testadas (por exemplo, em relação ao seu comportamento de crescimento no fermentador). Através da integração adicional de genes do transativador *KlGal4* no genoma da levedura, a taxa de expressão do gene exógeno, além disso, pode aumentar significativamente (Kuger e colaboradores, 1990).

[0033] Em uma outra forma de concretização, o processo de acordo com a invenção é efetuado com uma cepa de *K. lactis* especial, a *VAK367-D4* e descendentes dessa. Foi gerada uma série (VAK) na cepa de *K. lactis* *VAK367-D4* de variantes recombinantes construtivas. Em geral, essas variantes exprimem quantidades significativas induzíveis de uma proteína exógena ou domínios dessa proteína exógena ou domínios dessa proteína

exógena fusionada com domínios de proteína de espécie exógena. Os domínios de proteína de espécie afins, nesse caso, servem para a estimulação específica da resposta imunológica (adjuvante) ou para a separação em compartimentos da proteína exógena expressa na célula da levedura. Além dos efeitos do adjuvante, a separação em compartimentos da proteína exógena expressa é importante para a otimização da expressão ou para a formulação do produto de expressão.

[0034] Em uma outra forma de concretização, o processo de acordo com a invenção é efetuado com *VAK367-D4* e descendentes dessa no uso como vacina de marcação *subunidade*. O uso de *K. lactis* recombinantes, que exprimem apenas antígenos de proteínas definidos (proteínas exógenas), como vacina, permite em um diagnóstico diferencial a discriminação de indivíduos vacinados em relação aos naturalmente infectados. Uma dessas cepas de *K. lactis* recombinantes (vide os exemplos de execução), foi usada com êxito para a vacinação oral e subcutânea. Na aplicação subcutânea, obteve-se uma proteção total do indivíduo vacinado. Como "proteína exógena" no sentido desta invenção, são entendidos todos os peptídeos, polipeptídeos e proteínas, que são apropriados para produzir uma resposta imunológica protetora, preferivelmente uma resposta imunológica humoral protetora, seja no homem ou em um animal, contra um patógeno ou células cancerígenas degeneradas. As proteínas exógenas podem ser originárias de agentes patogênicos ou tumores de qualquer espécie, para os quais foram caracterizados antígenos, que por si só são capazes de induzir uma resposta imunológica protetora, preferivelmente uma resposta imunológica humoral protetora.

[0035] Em uma forma de concretização preferida, as proteínas exógenas são derivadas de agentes patogênicos (vírus, bactérias, parasitas), para os quais foram caracterizados antígenos, que por si só são capazes de induzir uma resposta imunológica protetora, preferivelmente

uma resposta imunológica humoral protetora.

Proteínas exógenas, que são derivadas de parasitas

Necator americanus; *Ancylostoma duodenale*; proteína ASP, proteases degradadoras de hemoglobina

Leishmania: gp63, antígeno promastigot 46 kD, LACK

Plasmodium: proteína CSP, CSA-1, CSA-3, EXP1, SSP2, STARP, SALSA, MSP1, MSP2, MSP3, AMA-1, GLURP, Pfs25, Pfs 28, Pvs25, Pvs28, Pfs 48/45, Pfs 230

Schistosoma: TP1, Sm23, ShGSTs 26 e 28, paramiosina, mio-sina de parasitos, Sm14

Proteínas exógenas, que são derivadas de bactérias

Mycobacterium tuberculosis: Ag85A, Hsp65, R8307, 19 kD, 45 kD, 10.4

Helicobacter pylori: VacA, LagA, NAP, hsp, urease, catalase

Streptococcus do grupo A: M, SCPA peptidase, exotoxinas SPEA e SPEC, proteína de ligação à fibronectina (*Fibronectin binding protein*)

Streptococcus pneumoniae: PspA, Psa A, BHV 3, BHV 4

Salmonella typhimurium: antígeno Vi

Shigella: LPS

Vibrio cholera: CTB

Escherichia coli ETEC: LT, LT-ST, CTB

Yersinia pestis: F1, V.

Proteínas exógenas, que são derivadas de células tumorais/tumores (antígenos associados a tumores, TAA)

CEA

5T4

MUC1

MART 1

HER-2

Especialmente preferidas são proteínas exógenas, que são derivadas de vírus.

Caliciviridae (Norwal, HEV): NV 60 kD; HEV)RF2

Reoviridae (rota): VP7, VP4

Retroviridae (HIV): Gag, Pol, Nef, Env, gp160, gp120, gp140, gp41

Flaviviridae (gênero Flavivirus: WNV, dengue, YF, TBE, JEV): preM-Env, NS3, NS4, NS5

Flaviviridae (gênero Pestivirus BVDV, CSFV, BDV. Gênero Hepacivirus HCV): E1, E2, E^{RNS} (Pesti), C, NS3, NS4, NS5

Hepadnaviridae (HBV): antígeno HBS

Paramyxoviridae (*Pneumovirinae*: RSV): F, G, SH, M

Rhabdoviridae (raiva): G

Herpesviridae (EBV, HSV2): gp350/220 (EBV), gB2, gD2 (HSV)

Coronaviridae (*SARS*): CoV, N, M, S

Orthomyxoviridae (influenza A, B): HA, NA, M1, M2, NP

Papillomaviridae: L2, E6, E7.

[0036] Na forma de concretização mais preferida da invenção, as proteínas exógenas são derivadas de representantes da família *Bimaviridae*, tal como, por exemplo, do vírus IBD e são capazes de induzir uma resposta imunológica protetora, preferivelmente uma resposta imunológica humoral protetora.

[0037] Em uma forma de concretização preferida da invenção, foi produzida uma variante de *K. lactis* VAK367-D4 VP2 (VAK887 que, como proteína exógena, exprime o antígeno VP2 formador da cápside do vírus da bursite infecciosa (IBDV cepa D78) (**SEQ ID NO: 1 e 2**). É dada particular preferência a uma variante de *K. lactis* VAK367-D4, VP2-T2S (VAK888), na qual a proteína VP2 estava mutada em uma posição

de aminoácido 2 (substituição da treonina por serina; Jagadish e colaboradores (1991)) e que apresenta a sequência de nucleotídeos ou de aminoácidos de acordo com a **SEQ ID NO: 3 e 4**.

[0038] Em uma forma de concretização particularmente preferida da invenção, foi produzida uma variante de *K. lactis* VAK367-D4, VP2T2S_GAL4, na qual a proteína VP2 estava mutada em uma posição de aminoácido 2 (**SEQ ID NO: 3 e 4**) e que continha adicionalmente pelo menos dois genes KIGAL4 (VAK890). É dada particular preferência a uma variante de *K. lactis* VAK367-D4, oVP2-T2S, na qual o antígeno VP2 mutado é codificado pela levedura sequência de ácidos de nucleotídeos otimizada com códon com a **SEQ ID NO: 5** ou na qual o antígeno VP2 mutado expresso de forma recombinante apresenta a sequência de aminoácido de acordo com a **SEQ ID NO: 6**. A variante de *K. lactis* oVP2-T2S_GAL4 (VAK911) otimizada apresenta as seguintes vantagens:

- através da mutação, a proteína exógena foi adicionalmente estabilizada.

- Através da superexpressão do ativador trans e/ou através da otimização do códon da sequência, pôde ser obtido um nítido aumento da expressão de VP2 (**Figura 2**).

- A integração de genes *KIGAL4* adicionais correlacionou-se também com uma maior taxa de crescimento dessa variante de *K. lactis*.

- Essa variante de *K. lactis* apresenta uma capacidade de reprodução particularmente alta na fermentação de alta densidade celular e na quantidade de proteína VP2 expressa (**Figura 3**).

[0039] A variante de *K. lactis* VP2-T2SGAL4 produzida de acordo com a invenção que, como proteína exógena, exprime o antígeno VP2 mutado do IBVDV de forma recombinante, bem como contém outras cópias do gene do transativador *KIGAL4* (VAK890), foi depositada em 29 de novembro de 2011 na Deutsche Sammlung von Mikroorganismen

und Zellkulturen GmbH, DSMZ, Inhoffenstrasse 7B, 38124 Braunschweig, Alemanha, de acordo com o Contrato de Budapest sob o número DSM 25405.

[0040] A variante de *K. lactis* oVP2-TS2_GAL4 produzida de acordo com a invenção que, como proteína exógena, exprime o antígeno VP2 otimizado com códon do IBDV de forma recombinante, bem como contém outras cópias do gene transativador *KIGAL4* (VAK890), foi depositada em 29 de novembro de 2011 na Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DSMZ, Inhoffenstrasse 7B, 38124 Braunschweig, Alemanha, de acordo com o Contrato de Budapest sob o número DSM 25406.

[0041] A variante de *K. lactis* oVP2-TS2 produzida de acordo com a invenção que, como proteína exógena, exprime o antígeno VP2 otimizado com códon do IBDV de forma recombinante, bem como contém outras cópias do gene transativador *KIGAL4* (VAK911), foi depositada em 29 de novembro de 2011 na Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DSMZ, Inhoffenstrasse 7B, 38124 Braunschweig, Alemanha, de acordo com o Contrato de Budapest sob o número DSM 25407.

[0042] Uma outra forma de concretização se refere ao uso das leveduras recombinantes de acordo com a invenção em um processo para a produção de uma imunização protetora, em particular, de uma imunização humoral protetora. Um tal processo compreende as seguintes etapas:

cultivar e propagar as leveduras recombinantes de acordo com a invenção,

coletar e inativar as leveduras,

aplicar as leveduras recombinantes de acordo com um esquema de imunização a ser fixado,

determinar o título dos anticorpos formados e/ou

detectar a imunização.

[0043] O cultivo e propagação das leveduras recombinantes de acordo com a invenção podem ser efetuados com qualquer processo convencionalmente disponível. Nesse caso, são particularmente preferidos os processos, que a baixos custos levam a altos rendimentos celulares. Nesses incluem-se os processos de fermentação, em particular, processos da fermentação de alta densidade celular. A realização da fermentação com aplicação de um protocolo de fermentação com alimentação em batelada (*fed-batch*) provou ser particularmente vantajosa.

[0044] Em uma forma de concretização preferida, a imunização humoral protetora é obtida pelo fato, de que as leveduras recombinantes são aplicadas por via oral/da mucosa ou subcutânea. Em uma forma de concretização particularmente preferida da invenção, as leveduras recombinantes são aplicadas por via subcutânea. No processo de acordo com a invenção, é preferido, em particular, o uso de *K. lactis*, especialmente das variantes geneticamente modificadas *VAK367-D4* e a variante *VAK890* derivada dessa e variantes dessas, para a aplicação subcutânea.

[0045] As células de leveduras recombinantes deveriam ser usadas inativadas/mortas no processo de acordo com a invenção. Para isso, as leveduras, após o cultivo e expressão dos genes exógenos, são secadas e, em seguida, inativadas. A inativação pode ser efetuada com qualquer processo convencionalmente disponível. A ativação pelo calor (por exemplo, inativação pelo calor a 90 °C durante 2 horas) é particularmente adequada para a aplicação no processo de acordo com a invenção.

[0046] Para a vacinação oral/da mucosa pode ser aplicado, por exemplo, um esquema de imunização curto 1/1/1/1 (alimentar por 1 semana, 1 semana de pausa, alimentar por 1 semana e assim por diante) ou um esquema mais longo 2/2/2 (alimentar por 2 semanas, 2 semanas

de pausa, alimentar por 2 semanas e assim por diante). Para a vacinação subcutânea, pode ser usada, por exemplo, uma aplicação dupla ou tripla no intervalo de duas semanas cada (**Figura 4 e 5**).

[0047] Todos os métodos convencionais estão à disposição para provar a imunização realizada. Em uma forma de concretização da invenção, para provar a imunização, o título é testado em anticorpos neutralizantes de vírus. Para isso, por exemplo, podem ser realizados testes ELISA específicos ou ensaios de neutralização. No ensaio de neutralização, um número definido de vírus IBD é adicionado a uma quantidade definida de soro de um animal imunizado ou de um animal de controle. A seguir, é testado em uma inibição da infecção (neutralização) através dos vírus tratados dessa maneira em cultura celular. Se uma imunização foi bem sucedida, pode ser testado também em um experimento "*challenge*", por exemplo, em um experimento "vírus challenge". Para isso, administra-se aos animais tratados uma dose de um microrganismo patogênico ou vírus, que normalmente levaria à doença de animais não imunizados. Se depois de um tal *challenge* os animais não adoecem, é apresentada a prova da imunização bem sucedida. (**Figura 5**). Finalmente, a prova da imunização pode ser apresentada, também, através da imuno-histoquímica. Neste caso, depois do *challenge*, os órgãos alvo do patógeno são examinados para infecção ou lesão (**Figura 5**).

[0048] De acordo com a invenção, foi demonstrado, que as variantes de *K. lactis* recombinantes, que em cada caso foram derivadas de VAK367-D4, puderam ser usadas com êxito para a vacinação através de aplicação subcutânea. A variante da cepa VAK890 exposta nos exemplos de execução exprime o antígeno VP2 do vírus da bursite infecciosa (IBDV; cepa D78). No caso do VP2 do IBDV trata-se de uma proteína viral formadora de cápside. Para o VP2 é bem conhecido, que a ativação de uma resposta imunológica humoral contra esse antígeno é suficiente, para proteger um organismo infectado preventivamente

contra uma infecção subsequente pelo respectivo vírus (IBDV). A ativação de uma resposta imunológica humoral eficaz pode ser indiciada, por um lado, através da quantificação de anticorpos neutralizantes de vírus. Por outro lado, a prova de uma resposta imunológica protetora foi conduzida através de um "experimento vírus-*challenge*" e uma imuno-histoquímica de acordo com o vírus-*challenge*. De acordo com a invenção, dessa maneira, foi possível estabelecer a *K. lactis* recombinante ou a *K. lactis* recombinante, partindo da cepa VAK367-D4, em aplicações subcutâneas, como sendo uma vacina efetivamente eficaz, isto é, com proteção de 90 a 100% (90 a 100% corresponde ao "Gold-Standard" em uma vacinação (**Figura 4 e 5**). A *K. lactis* recombinante ou a *K. lactis* recombinante, partindo da cepa VAK367-D4, foi estabelecida, dessa maneira, como vacina marcadora "*subunidade*" contra patógenos de infecções, tais como, por exemplo, vírus. Isto é, como antígeno foi usada uma única subunidade de proteína imunogênica de um vírus. O uso como vacina marcadora "*subunidade*" implica, que seu uso permite distinguir organismos vacinados de infectados, não vacinados. Isto é possível, por exemplo, através do uso de um método diagnóstico diferencial, que detecta tanto anticorpos contra o antígeno usado para a vacinação, como também anticorpos contra um outro antígeno do patógeno da infecção. Através da imunização com a cepa *K. lactis* recombinante cepa VAK890 (DSM 25405), partindo da cepa VAK367-D4, puderam ser produzidos altos títulos de anticorpos contra o respectivo antígeno viral. Para esses anticorpos foi possível demonstrar, que de esses são neutralizadores virais. Já através dessa propriedade e dos altos títulos medidos pode resultar empiricamente, que essa resposta imunológica humoral basta, para proteger um organismo contra uma infecção subsequente com o respectivo vírus. A prova final pôde ser apresentada para o IBDV. O alto título de anticorpos neutralizantes de vírus produzidos se correlaciona no modelo de frango com uma proteção total dos animais

vacinados contra uma infecção viral subsequente (Figura 5). O uso de *K. lactis*, especialmente de uma variante geneticamente modificada, VAK367-D4 e descendentes dessa, tal como, por exemplo, *K. lactis* VP2-T2SGAL4 (VAK890), tem as seguintes vantagens essenciais em comparação com os processos convencionais:

[0049] Para usar a expressão de gene exógeno, a *K. lactis* tem vantagens fundamentais essenciais em comparação com a *S. cerevisiae*, que são baseadas na fisiologia de *K. lactis* há milhões de anos divergente de *S. cerevisiae*.

[0050] A expressão do gene exógeno *não é realizada* através de vetores de plasmídeos, mas sim, de acordo com a integração específica e estável do gene exógeno em um locus definido do genoma de *K. lactis*. Isso permite uma alta capacidade de reprodução da expressão da proteína em condições não seletivas. Esse aspecto é essencial para a produção reproduzível da vacina através do cultivo da cepa de levedura no fermentador. O princípio da cepa VAK367-D4 e descendentes dessa já foi descrito para uma vacinação *oral* (WO 20101054649 A2). Na presente invenção, foi demonstrado, então, que a cepa VAK367-D4 e seus descendentes, em particular, *K. lactis* VP2-T2S_GAL4 (VAK890) e oVP2-T2S_GAL4 (VAK911) na vacinação subcutânea com o uso de quantidades essencialmente menores, leva à proteção eficaz em infecções virais.

[0051] A expressão gênica pode ser induzida e ser ulteriormente aumentada através do aumento da concentração do ativador de transcrição Gal4 e/ou através da otimização com códon da sequência de nucleotídeos do gene exógeno com ajuste ao hospedeiro levedura. O estabelecimento de um protocolo de fermentação com alimentação em batelada permite a produção eficiente também de antígenos citotóxicos.

[0052] A integração do gene exógeno em VAK367-D4 e descendentes dessa, é um "procedimento de etapa única", isto é, em cerca de 3

semanas podem ser produzidas e caracterizadas novas cepas recombinantes; isso é particularmente importante para o rápido desenvolvimento de vacinas eficientes contra variantes de vírus modificados.

[0053] Através de administração subcutânea de leveduras recombinantes do tipo *K. lactis*, de leveduras especialmente recombinantes da cepa *VAK367-D4* e descendentes dessa, pôde ser produzida uma resposta imunológica protetora tanto no camundongo, como também no frango. O procedimento é concebível de forma simples: uma quantidade definida de células de levedura inativadas (mortas por calor) são injetadas sob a pele do indivíduo vacinado em um processo de 2 a 3 vezes. Duas semanas depois da última aplicação, o soro do indivíduo vacinado é examinado para a presença e funcionalidade de anticorpos específicos do antígeno. Através de testes de neutralização de vírus pôde ser provado, que essa resposta imunológica se baseou principalmente, quando não exclusivamente, na produção de anticorpos neutralizantes (resposta imunológica humoral protetora). Com isso, a resposta imunológica que pode ser induzida através de *K. lactis* na aplicação subcutânea distingue-se fundamentalmente da resposta imunológica que pode ser induzida através de *S. cerevisiae*, que induz principalmente resposta da célula T. As possibilidades de uma aplicação subcutânea de *K. lactis* são, por conseguinte, fundamentalmente diferentes das possibilidades de uma aplicação subcutânea de *S. cerevisiae*; enquanto *K. lactis* pode ser aplicada como vacina *subunidade* em antígenos, que podem produzir uma resposta imunológica humoral protetora (por exemplo, antígenos virais, tal como o antígeno VP2 do vírus da bursite infecciosa, IBV ou antígeno da hemaglutinina HA do vírus da influenza), assim, a *S. cerevisiae* pode ser aplicada como vacina *subunidade* em antígenos, que podem produzir uma resposta imunológica humoral protetora (tal como, por exemplo, na proteína NS3 do vírus da hepatite C ou antíge-

nos tumorais, tais como do Her-2). Essas distinções na forma da resposta imunológica induzida são provavelmente atribuídas às propriedades muito diferentes das células de *S. cerevisiae* e *K. lactis*, que foram expostas acima.

[0054] Resumindo, a presente invenção presta uma contribuição significativa ao estado da técnica e disponibiliza inúmeras formas de concretização vantajosas em relação ao estado da técnica?

[0055] Os inventores conseguiram produzir vacinas marcadoras *subunidade*, com as quais é possível distinguir indivíduos vacinados em relação aos naturalmente infectados.

[0056] Além disso, podem ser produzidas vacinas marcadoras *subunidade*, que apresentam ao mesmo tempo propriedades fortemente adjuvantes e, com isso, são fortemente imunogênicas.

[0057] As vacinas marcadoras *subunidade* de acordo com a invenção produzem uma resposta imunológica protetora sistêmica e uma *memória* imunológica no indivíduo vacinado.

[0058] Com a presente invenção, também é possível produzir vacinas contra antígenos citotóxicos.

[0059] O processo de acordo com a invenção permite a produção mais rápida possível de novas variantes de vacina.

[0060] Os processos de vacinação são, em particular, muito econômicos.

[0061] Para a produção das vacinas de acordo com a invenção, não são necessários quaisquer cobaias ou o uso de células animais ou humanas em cultura.

[0062] As vacinas de acordo com a invenção não são sensíveis à temperatura ambiente, elas podem ser transportadas e armazenadas sem refrigeração.

[0063] No processo de acordo com a invenção, não são usadas células ou organismos recombinantes vivos.

[0064] Com o processo de acordo com a invenção, é possível restringir a um nível mínimo tanto as quantidades de vacina usada, como também o número de aplicações, que são necessárias para a obtenção de uma imunização protetora.

Exemplos de execução

[0065] *Produção da cepa de K. lactis VAK367-D4 (metA ura3-5 lac4::ScURA3).*

[0066] A cepa de partida VAK367 para a expressão heteróloga de proteínas exógenas tem as seguintes propriedades: essa permite o cultivo de alta densidade celular, sem que, com isso, as proteínas intracelulares sejam liberadas de forma detectável. Em relação a isso, essa cepa distingue-se de muitas cepas de *K. lactis* estreitamente relacionadas. A cepa VAK367 foi derivada da cepa CBS 2359 por duas rodadas de mutagênese (Centraalbureau voor Schimmelcultures <http://www.fungalbiodiversitycentre.com>) e é auxotrófica para o aminoácido metionina e a nucleobase uracila. Da cepa VAK367 derivou-se a cepa VAK367-D4 com métodos genéticos (depositada em 18.11.2009 na Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) em Braunschweig sob o número de depósito DSM 23097), na qual, com auxílio do plasmídeo pD4-2 a sequência de +358 até +1181 do gene *LAC4* foi substituída pelo gene *ScURA3*. A cepa VAK367-D4 permite, então, a integração de genes exógenos no locus *LAC4* sem marcadores adicionais, selecionando o crescimento de lactose. Neste caso, ao utilizar um vetor de integração apropriado, tal como, por exemplo, Klp3-MCS (**Figura 6**) através de recombinação homóloga, o cassete de interrupção é substituído de modo tal, que um gene *LAC4* intacto é reconstruído com perda do marcador *ScURA3* (**Figura 1**).

[0067] *Produção de um vetor de integração, que permite a expressão induzível de genes exógenos.*

Vetor: Klp3-MCS

Vetor: Klp3-MCS (**SEQ ID NO.: 10**)

[0068] No caso do vetor Klp3-MCS (**SEQ ID NO.: 10**) (**Figura 6**), trata-se de um vetor de *E. coli*, à base de URp7, que não pode replicar de forma autônoma em leveduras, visto que a sequência ARS1 foi deletada. O Klp3-MCS (**SEQ ID NO.: 10**) contém o promotor de *K. lactis* *LAC4* e sequências, que permitem a integração no locus *LAC4* através de recombinação homóloga.

[0069] Entre o promotor *LAC4* e o início da transcrição foi inserida uma secção de DNA, que contém o terminador *TEF1* e o promotor *KIGAL80*. Com isso, a fase de leitura pode ser expressa depois da reconstrução através de recombinação homóloga sob o controle do promotor *KIGAL80*. O promotor *KIGAL80* é corregulado através do fator de transcrição *KIGal4* com o promotor *LAC4* (Zenke e colaboradores, 1993). Essa construção permite, através da medição da β -galactosidase codificada com *LAC4*, acompanhar a indução da expressão do gene exógeno. O Klp3-MCS (**SEQ ID NO.: 10**) permite a inserção do gene exógeno entre o promotor *LAC4* e o terminador *TEF1* através de uma das interfaces únicas no *sítio de clonagem múltipla* (multiple cloning site - MCS) (**Figura 6**). Para a integração, o plasmídeo resultante é digerido com enzimas de restrição apropriadas, de modo que o cassete de expressão é separado das sequências do vetor de *E. coli*. Depois da transformação em *K. lactis* *VAK367-D4*, o cassete de expressão é integrado cromossalmente; as cepas resultantes não contêm quaisquer sequências bacterianas.

[0070] 3: *Variante de K. lactis, que exprime o antígeno VP2 do vírus da bursite infecciosa (variante de IBDV D78).*

Produção da cepa de levedura recombinante

[0071] O cDNA, que codifica o IBDV D78 VP2, foi amplificado do plasmídeo pD78A (Icard e colaboradores, 2008) com auxílio dos seguintes nucleotídeos:

IBDV_AscI_fwd (5'-GGCGCGCCGATGACAAACCTGCAA
GATC-3') (**SEQ ID NO.: 7**) contendo uma secção de restrição *AscI* e

VP2_NotI_rev (5'-ATAAGAATGCGGCCGCTCACACAGCT
ATCCTCCTTATG-3') (**SEQ ID NO.: 8**) contendo uma secção de restrição *NotI*.

[0072] Para a geração de VP2-T2S, foi usado o seguinte par de oligonucleotídeos:

IBDV_S:T_AscI_fwd (5'-GGCGCGCCGATGTCTAACCTG
CAAGATCAAACCCA-3') (**SEQ ID NO.: 9**) e VP2_NotI_rev (vide acima).

[0073] Os fragmentos de DNA assim amplificados, depois da revisão e confirmação das sequências de nucleotídeos, foram clonados através das secções *AscI* e *NotI* no vetor Klp3-MCS (**SEQ ID NO.: 10**) (**Figura 6**). Em seguida, realizou-se a integração no genoma (**Figura 1**). Individualmente, o plasmídeo de integração foi digerido com a enzima de restrição *EcoRI* e os fragmentos digeridos foram transformados em células *VAK367-D4* competentes. As células transformadas foram semeadas em meio YEPD e incubadas a 30°C durante a noite. Para encontrar colônias positivas, a placa de transformação foi duplicada em meio SM, que continua a lactose como fonte de carbono e incubada a 30°C durante 2 dias. Os clones positivos identificados nesse processo, foram ulteriormente examinados.

[0074] A integração genômica de cópias genéticas *KIGAL4* adicionais foi realizada por um método convencional (Kuger e colaboradores (1990). A otimização com códon seguiu-se a um algoritmo de *Saccharomyces cerevisiae* (mr.gene.com, Raab e colaboradores, 2010). Os fragmentos de DNA otimizados com códon foram diretamente sintetizados. Na síntese, as secções de restrição 5' *AscI* e 3' *NotI* já foram incorporados (mr.gene.com, Regensburg, Alemanha). Em seguida, realizou-se a clonagem no vetor Klp-MCS (**SEQ ID NO.: 10**).

Análise de Western Blot.

[0075] Pellets de células foram ressuspensos em tampão B60 (50 mM de HEPS-KOH pH 7,3; 60 mM de acetato de potássio; 5 mM de acetato de magnésio; 0,1% de Triton X100; 10% de glicerol; 1 mM de fluoreto de sódio; 20 mM de fosfato de glicerol; 10 mM de $MgCl_2$; 1 mM de DTT; inibidor completo de protease (Roche)) e desintegrados através de mistura vigorosa com pérolas de vidro. O extrato foi centrifugado (14000 rotações/minuto, 20 minutos a 4°C) e determinada a concentração de proteína. 40 µg do extrato de proteína foram separados por meio de SDS-PAGE em 12% de um gel. Em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana. As análises de Western Blot foram realizadas com um soro imunológico α -IBDV de coelho (1:15,000; Granzow e colaboradores, 1997) e com um anticorpo acoplado a um HRP de cabra- α -coelho (1:3000, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) usando métodos convencionais.

Análise de Northern Blot.

[0076] 5 mL de uma cultura de levedura foi resfriada em gelo para a completa extração do RNA. A lise celular foi realizada em tampão Prot K (100 mM de tris/HCl pH 7,9, 150 mM de NaCl, 25 mM de EDTA, 1% de SDS) e 50 mg de proteinase K (Fermentas) com forte agitação com pérolas de vidro. As amostras foram incubadas a 35°C durante 1 hora e o RNA foi extraído, precipitado com etanol e ressuspensos em água DEPC. A análise de Northern, tal como descrita em Engler-Blum e colaboradores, 1993, foi realizada, contudo, com algumas divergências. 5 µg do RNA total foram separados em 1% de um gel de formaldeído-agarose e transferidos para uma membrana de nylon (Amersham HybondTM-N+, GE Healthcare). A membrana foi incubada a 68°C com uma sonda de RNA marcada com DIG, que foi produzida por uma transcrição *in vitro* de fragmentos de PCR na presença de DIG-NTPs (Roche). O Blot foi tratado com uma solução de bloqueio e incubado com

um anticorpo conjugado com fosfatase alcalina anti-DIG (Roche). A determinação da atividade da fosfatase alcalina foi realizada com métodos convencionais.

Quantificação de VP2 exprimido de forma homóloga.

[0077] Foi usado um protocolo modificado segundo Saugar e colaboradores, 2005. 2000 ODE de uma cultura de levedura, que foi transformada com um plasmídeo episomal VP2 (pADH1-P_VP2-T2S), foram cultivados durante a noite em meio seletivo (0,67% de YNB, 2% de glicose e os seguintes aditivos: 11 mg/L de Ade; 14 mg/L de Tyr; 38 mg/L cada de His, Trp, Arg, Met; 48 mg/L de Phe; 58 mg/L cada de Leu, Ile, Lys, Val, Thr). Depois de colher e lavar com água destilada, as células foram desintegradas com pérolas de vidro em tampão de lise (10 mM de tris (pH 8,0), 150 mM de NaCl, 20 mM de CaCl₂, 1 mM de EDTA, inibidor do complexo de protease (Roche), pH 8,0). O extrato de proteína resultante foi centrifugado (10.000 g durante 1 hora a 4°C) e a fração solúvel foi acamada em uma almofada de sucrose de 20% (w/v) em tampão de sucrose (10 mM de tris pH 8,0, 150 mM de NaCl, 20 mM de CaCl₂; continha inibidor do complexo de protease (Roche)). Depois da centrifugação com 170.000 g durante 3 horas a 4°C, o pellet foi dissolvido em 200 µL de tampão de sucrose e centrifugado por mais 17 horas com 114.000 g em um gradiente de sucrose de 20 a 53% em tampão de sucrose. O gradiente foi colhido em frações de 700 µL e analisado por meio de SDS-PAGE e Western Blot. Complexos de proteína oligoméricos do VP2 exprimido de forma heteróloga puderam ser concentrados e purificados dessa maneira. A proteína pôde ser detectada e a quantidade de proteína foi determinada por meio de SDS PAGE e tingimento de Coomassie em comparação com uma proteína padrão (não mostrada). O VP2 assim purificado foi usado, então, como padrão em um Western Blot comparativo com anticorpo anti-VP2. A quantidade de VP2 de um número definido de células de levedura de várias fermentações

foi comparada (**Figura 3**).

Fermentação de levedura e ativação de calor.

[0078] Todas as fermentações experimentais foram realizadas em um sistema de biorreator paralelo DasGip (DasGip AG, Jülich, Alemanha) com fermentadores de 2 litros completamente equipados. As fermentações em escala de produção foram realizadas pela empresa Organobalance GmbH (Berlin, Alemanha) ou em um laboratório próprio em um biorreator Biostat ED (B. Braun Biotech, Melsungen, Alemanha) com 10 litros de volume de trabalho. Todos os processos de produção foram realizados no processo com alimentação em bateladas. Foi utilizado um meio de cultura complexo com 2% de extrato de levedura e 1% de peptona e uma solução de alimentação de lactose a 20%. A temperatura da cultura de levedura foi mantida em 30°C e o pO₂ foi controlado para 30% de saturação. O valor de pH durante a fermentação foi mantido em 5,0 através da adição de NaOH 2M ou H₃PO₄ 2M.

[0079] Para os experimentos *in vivo* em camundongos e frangos, as leveduras foram liofilizadas e, depois, ativadas por calor a 90°C durante 2 horas. Depois de utilizar esse processo, menos de 10 células por grama de peso seco de célula eram viáveis.

4. Aplicação subcutânea em camundongos

[0080] Para a aplicação subcutânea de uma variante de *K. lactis*, que exprime o antígeno VP2 do vírus da bursite infecciosa (variante IBDV D78) (VAK890), em camundongos, a levedura seca e pulverizada para a primeira aplicação foi misturada com adjuvante de Freund completo (CFA); nas outras aplicações, a levedura foi misturada com o adjuvante de Freund incompleto (IFA) (100 µg de material de levedura para 200 µL de CFA ou IFA). 200 µL das emulsões (que contêm 100 µg de levedura) foram injetadas por imunização/reforço por indivíduo. Com isso, a quantidade de VP2 administrada para cada imunização subcutâ-

nea a um indivíduo de camundongo correspondeu a cerca de 18 ng (**Figura 3**). Depois da injeção inicial (dia 0), foi "reforçado" duas vezes em intervalos de duas semanas (no dia 14 e 28; **Figura 4**). Depois de mais duas semanas, os animais foram sacrificados mediante anestesia para obter o soro sanguíneo.

5. Aplicação subcutânea em frangos

[0081] Para a aplicação subcutânea em frangos, 5 mg da variante de *K. lactis* secada e pulverizada, que exprime o antígeno VP2 do vírus da bursite infecciosa (variante IBDV D78) (VAK890) foram dissolvidos em 750 µL de tampão de fosfato/salina (PBS), bem como 500 µL de água destilada estéril e preparada uma emulsão com 1,25 mL de IFA. 500 µL dessa emulsão (contendo 1 mg de levedura) foram injetados no dia 0, 14, bem como no dia 28 (**Figura 5**). Com isso, a quantidade de VP2 administrada por imunização subcutânea a um indivíduo de frango corresponderam a cerca de 180 ng (**Figura 3, 4**).

6. Vírus "challenge"

[0082] Depois da vacinação (**Figura 5**), os frangos vacinados foram infestados no dia 42 através da via oral com 100 EID₅₀ da cepa IBDV "Edgar" e depois de seis dias, foi determinada a taxa de mortalidade. Depois do subsequente sacrifício dos animais sob anestesia, obtiveram-se os soros a bursa dos animais foi removida. Essas foram inicialmente fixadas em 10% de formalina tamponada neutra durante 24 horas e, em seguida, incorporadas em parafina.

7. Ensaio imunossorvente ligado a enzima (ELISA).

[0083] Os títulos de anticorpos específicos IBDV nos soros dos indivíduos vacinados foram determinados através de um teste ELISA comercial IDEXX FlockChek® kit IBD ELISA (IDEXX Laboratories, Inc.). No caso dos soros de camundongos vacinados, foi usado um anticorpo secundário diferente do fabricante (Sigma Aldrich).

8. Ensaio de neutralização.

[0084] O ensaio de neutralização para a determinação da concentração dos anticorpos neutralizantes de vírus foi realizado de acordo com o protocolo de Schröder e colaboradores, 2000.

9. Imuno-histoquímica.

[0085] Das bursas incorporadas em parafina foram preparadas duas secções de órgãos com 4 micrômetros de espessura. Depois de remover a parafina, essas foram tingidas com hematoxilina e eosina de acordo com procedimentos padrão. As amostras foram examinadas microscopicamente e determinada a chamada "contagem de lesões" em uma escala de 1 a 4 (1 = normal até 10% de atrofia folicular; 2 = 10-30% de atrofia folicular; 3 = 30-70% de atrofia folicular; 4 = > 70% de atrofia).

Resultados

Preparação e otimização da cepa de *K. lactis* que exprime o IBDV VP2

[0086] Diversas variantes de *K. lactis* foram produzidas com o gene IBDV VP2. Para os experimentos de vacinação, utilizou-se uma variante otimizada, na qual a proteína VP2 estava mutada na posição 2 do aminoácido (substituição de treonina por serina; Jagadish e colaboradores (1991)) e que continham uma integração tandem adicional de pelo menos dois genes *KIGAL4* (variante VP2-T2S_GAL4; cepa VAK890). A proteína exógena foi adicionalmente estabilizada através da mutação; através da superexpressão do ativador trans, foi possível obter um nítido aumento da expressão VP2 (**Figura 2**). A integração de genes *KIGAL4* adicionais se correlaciona também uma taxa de crescimento mais elevada dessa variante *K. lactis*. As condições de crescimento para a respectiva cepa *K. lactis* VAL890 que exprime VP2 foram otimizadas, de modo que a levedura pôde ser fermentada em altas densidades e com quantidade reproduzível de VP2 exprimido. Depois da produção, a levedura foi liofilizada e inativada a 90°C durante 2 horas. A detecção da inativação foi conduzida: para cada grama de material de levedura inativado, remanesceram menos de 10 células de levedura vivas. A

quantidade VP2 para cada célula de levedura foi determinada: essa importou, com a cepa VAK890, em cerca de 0,7 fg de proteína VP2 heteróloga para cada célula de levedura (**Figura 3**).

Aplicação subcutânea em camundongos e frangos.

[0087] As imunizações foram realizadas tal como descrito acima; duas semanas depois da última aplicação, os soros dos indivíduos vacinados tratados foram examinados para a presença de anticorpos neutralizantes. Para isso, foi usado um ELISA específico para IBDV e realizado um ensaio de neutralização de IBDV (**Figura 4 e 5**). Além disso, foi realizado um experimento "vírus-challenge" com os frangos vacinados. Para isso, administrou-se aos animais uma dose viral de 100 EID50 por animal da cepa IBDV "Edgar" fortemente virulenta, uma concentração, que em aves não vacinadas leva a uma bursite significativa com uma taxa de mortalidade de cerca de 10-35% (**Figura 5D**). Depois do experimento "vírus-challenge" as bursas dos indivíduos vacinados foram examinados através de imino-histoquímica para indícios de infecção e lesões nas bursas e essas foram caracterizadas pela chamada "contagem de lesões" (**Figura 5**).

[0088] Tanto os experimentos com camundongos, como também os experimentos com frangos mostraram, que através da aplicação subcutânea da cepa *K. lactis* VAK890, puderam ser produzidos altos títulos de anticorpos neutralizantes de vírus em praticamente todos os animais tratados (**Figura 4B, 4C; Figura 5B, 5C**). Também pôde ser demonstrado, que praticamente todos os probandos vacinados estavam protegidos contra o vírus challenge e praticamente não apresentaram quaisquer indícios de uma infecção viral em suas bursas (**Figura 5**). Todos os animais inoculados por via subcutânea com a cepa *K. lactis* VAK890, mostraram, dessa maneira, uma resposta imunológica humoral significativa contra VP2. Essa resposta imunológica já foi observada depois de um único reforço, do que se conclui, que duas injeções, que podem

ser realizadas, além disso, com adjuvante de Freund incompleto (imunização e um reforço), já são suficientes, para produzir uma proteção. Além disso, todos os probandos, que foram inoculados com a cepa *K. lactis* VAK890, estavam protegidos contra uma infecção viral subsequente (**Figura 5**).

Abreviações

ARS1 sequência de replicação autônoma; sequência de nucleotídeos no DNA, no qual a replicação é introduzida

Asc I endonuclease de restrição Asc I

CFA adjuvante de Freund completo

DNA ácido desoxirribonucleico

DEPC dietilpirocarbonato

DIG-NTP digoxigenin-nucleotidotrifosfato

DSMZ Coleção Alemã de Microrganismos e Culturas Celulares GmbH

DTT ditioneitol

E. coli *Escherichia coli*

EcoRI endonuclease de restrição *EcoRI*

EDTA ácido etilenodiaminotetra-acético

EID50 Egg ou Embryo Infectious dose – número de vírus infecciosos, que são necessários, para provocar uma infecção em 50% dos ovos infectados

ELISA ensaio imunossorvente ligado a enzima

GAL4 ativador de transcrição específico para levedura

GRAS generally regarded as safe (geralmente considerado como seguro)

HEPES ácido 2-(4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil)-etanossulfônico

Hpa I endonuclease de restrição Hpa I

HRP horseradish peroxidase (peroxidase de rábano)

IBDV vírus da bursite infecciosa

IFA adjuvante de Freund incompleto

K. lactis Kluyveromyces lactis

KIGAL4 gene de *K. lactis* que codifica a proteína KIGal4/Lac9

KIGAL80 gene de *K. lactis* que codifica a proteína KIGal80

LAC4 gene de *K. lactis* que codifica uma enzima β -galactosidase

Not I endonuclease de restrição Not I

ODE unidade de densidade ótica

PBS tampão de fosfato/salina

PCR polymerase chain reaction (reação da cadeia de polimerase)

RNA ácido ribonucleico

S. cerevisiae Saccharomyces cerevisiae

Sal I endonuclease de restrição Sal I

SDS dodecilsulfato de sódio

SDS-PAGE eletroforese de gel de poliacrilamida com o uso de SDS

TEF1 gene *Arxula adenivorans* codifica o fator de translação EF-1alfa

VP2 proteína de vírus formadora de cápside do IBDV

VP2-T2S VP2 com uma substituição de aminoácido treonina por serina na posição 2

VAK cepa de vacina

YEPD Yeast Extract Peptone Dextrose

YRp7 vetor *shuttle* de *S. cerevisiae*-*E.coli*, acesso ao banco genético U03501 (Botstein e colaboradores, 1979).

Listagem de referências

Backhaus, K. e colaboradores 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).

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 e colaboradores Regulation of primary carbon metabolism in *Kluyveromyces lactis*. *Enzyme Microbial Technology* **26**, 771-780 (2000).

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 Journal* **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).

Donnini, C. e colaboradores. Improved Production of Heterologous Proteins by a Glucose Repression-Defective Mutant of *Kluyveromyces lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 2632-2638 (2004).

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 ³²P-based hybridizations. *Analytical Biochemistry* **210**, 235-244 (1993).

Gellissen G. & Hollenberg C.P. Application of yeast in gene expression. studies; a comparison of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* and *Kluyveromyces lactis* – a review. *Gene* **190**, 87-97 (1997).

Granzow, H. e colaboradores. A second form of infectious bursal disease virus-associated tubule contains VP4. *Journal of Virology* **71**, 8879-8885 (1997).

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 Disease* **52**, 590-598. (2008).

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 Research* **18**, 745-751 (1990).

Lu, Y. e colaboradores. 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. *Systems and Synthetic Biology* **4**, 215-225 (2010).

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 e colaboradores. Structural polymorphism of the major capsid protein of a double-stranded RNA virus: An amphipathic [alpha] Helix as a Molecular Switch. *Structure* **13**, 2007-1017 (2005).

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).

Stubbs, A.C. e colaboradores, Whole recombinant yeast vaccine activates dendritic cells and elicits protective cell-mediated immunity. *Nature Medicine* **7**, 625-639 (2001).

Stubbs, A.C. & Wilson, C.C. Recombinant yeast as a vaccine vector formula the induction of cytotoxic T-lymphocyte responses. *Current Opinion of Molecular Therapy* **4**, 35-40 (2002).

Uccelletti, D., Farina, F., Mancini, P. & Palleschi, C. *KIPMR1*

inactivations and calcium addition enhance secretion of non-hyperglycosylated heterologous proteins in *Kluyveromyces lactis*. *Journal of Biotechnology* **109**, 93-101 (2004).

Van Ooyen, A.J., Dekker, P., Huang, M., Olsthoorn, M.M., Jacobs, D.I., Colussi, P.A. & Taron, C.H.. Heterologous protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Research* **6**, 381-392 (2006).

Wansley E.K. e colaboradores. Vaccination with a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing a tumor antigen breaks immune tolerance and elicits therapeutic antitumor responses. *Clinical Cancer Research* **14**, 4316-4325 (2008).

Zenke, F.T., Zachariae, W., Lunkes, A., & Breunig, K.D. 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).

REIVINDICAÇÕES

1. Levedura recombinante de uma cepa de *Kluyveromyces lactis*, que porta o antígeno VP2 do vírus da bursite infecciosa (IBDV) como gene exógeno e que permite a expressão do antígeno VP2 do vírus da bursite infecciosa (IBDV) como proteína exógena, caracterizada pelo fato de que a cepa de *Kluyveromyces lactis* é selecionada a partir de:

Kluyveromyces lactis DSM 25405,
Kluyveromyces lactis DSM 25406, e
Kluyveromyces lactis DSM 25407.

2. Levedura recombinante, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a expressão do gene exógeno é realizada constitutivamente ou que a expressão do gene exógeno pode ser induzida.

3. Levedura recombinante, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a expressão do gene exógeno pode ser quantificada indiretamente através da expressão de um gene repórter endógeno.

4. Uso de uma levedura recombinante como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que é para a preparação de um medicamento para vacinação subcutânea contra infecções por um parasita, bactéria ou vírus selecionados a partir de *Necator americanus*; *Ancylostoma duodenale*, *Leishmania*, *Plasmodium*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori*, *Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella*, *Vibrio cholera*, *Escherichia coli*, *Yersinia pestis*, *Caliciviridae*, *Reoviridae*, *Retroviridae*, *Flaviviridae*, *Hepadnaviridae*, *Paramyxoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Herpesviridae*, *Coronaviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Papillomaviridae* e *Birnaviridae*.

5. Uso de uma levedura recombinante como definida em

qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que é para a preparação de um medicamento para vacinação subcutânea, sendo que o referido medicamento é uma vacina com marcadores de subunidades, para distinguir entre indivíduos vacinados e infectados naturalmente.

6. Uso, de acordo com a reivindicação 4 ou 5, caracterizado pelo fato de que o referido medicamento para vacinação subcutânea compreende células de levedura completas de uma levedura recombinante.

7. Método para produção de uma composição de vacina subcutânea, caracterizado pelo fato de que compreende as seguintes etapas:

(a) cultivo e propagação das leveduras recombinantes como definidas em qualquer uma das reivindicações 1 a 3,
(b) colheita e inativação das leveduras, e
(c) preparo de uma composição de vacina com a levedura colhida e inativada de (b).

8. Par de oligonucleotídeos, caracterizado pelo fato de que apresenta uma sequência de ácidos nucleicos de acordo com SEQ ID NO.: 8 e SEQ ID NO.: 9.

9. Vetor de expressão de acordo com SEQ ID NO.: 10, que possui um gene exógeno, caracterizado pelo fato de que o gene exógeno apresenta a sequência de ácidos nucleicos de acordo com a SEQ ID NO.: 3 ou SEQ ID NO.: 5, para integração na cepa inicial de *Kluyveromyces lactis* VAK367-D4, depositada sob DSM 23097.

10. Vetor de expressão, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o gene exógeno codifica a proteína IBDV VP2-T2S com a sequência de aminoácidos de acordo com a SEQ ID NO.: 4 ou a proteína IBDV oVP2-T2S com a sequência de aminoácidos de acordo com a SEQ ID NO.: 6.

FIG. 1

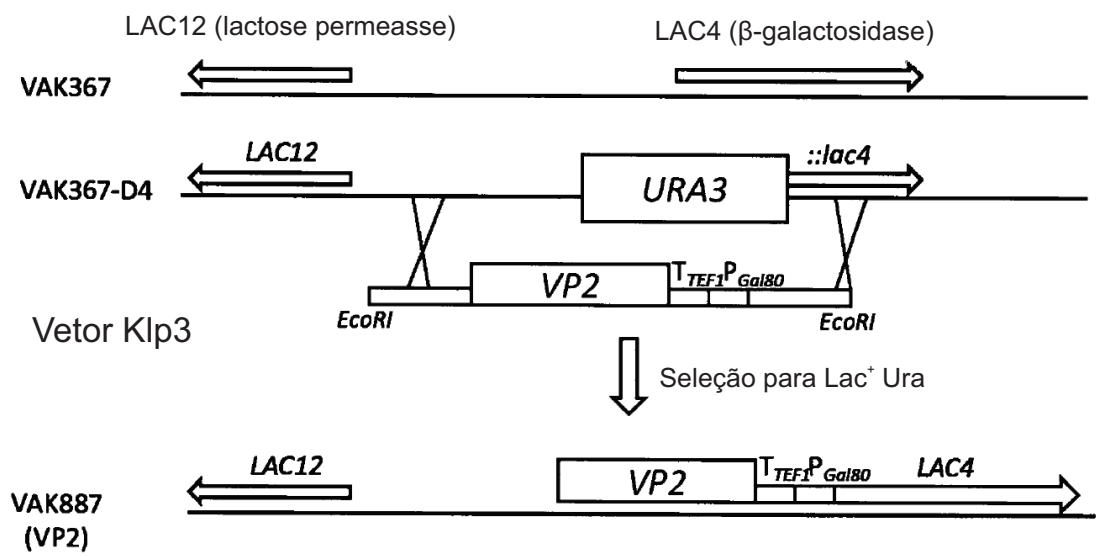


FIG. 2A

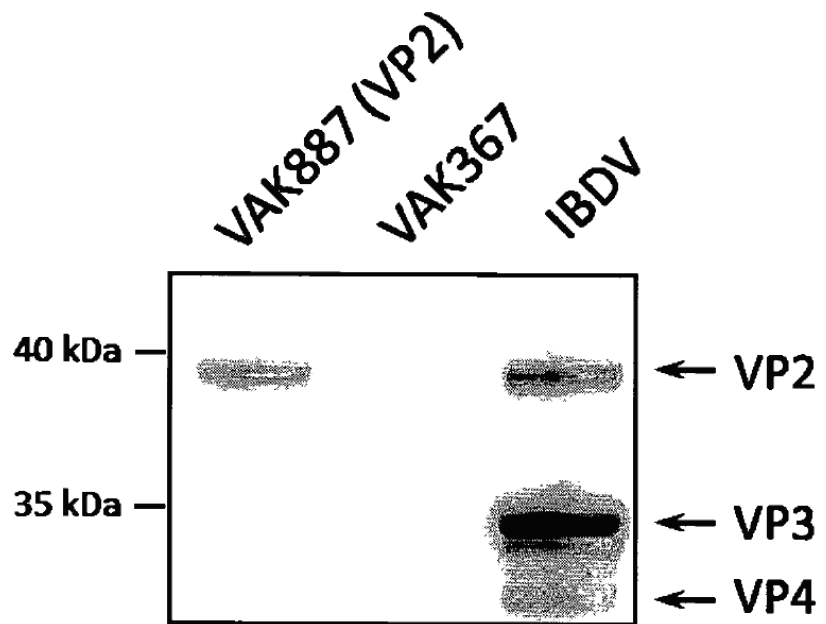


FIG. 2B

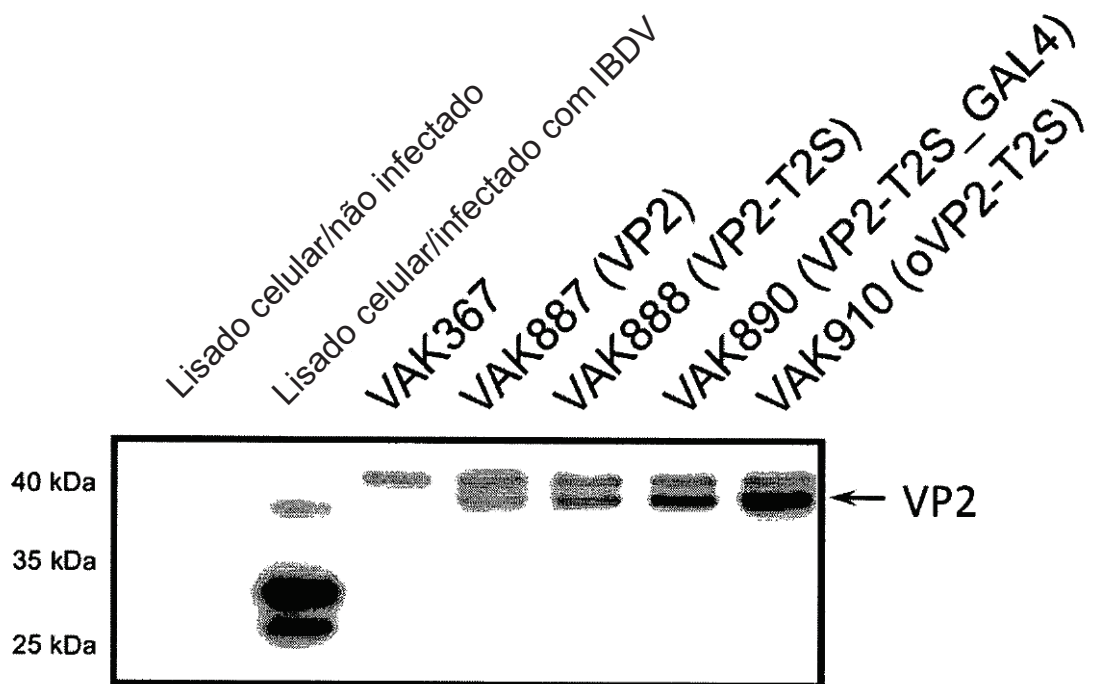


FIG. 3A

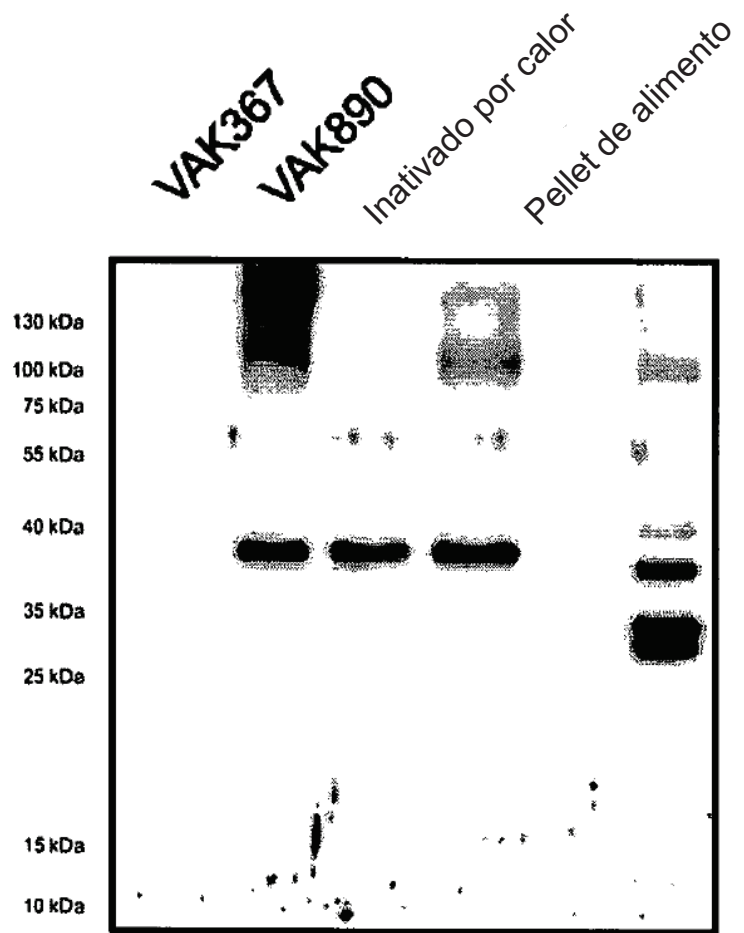


FIG. 3B

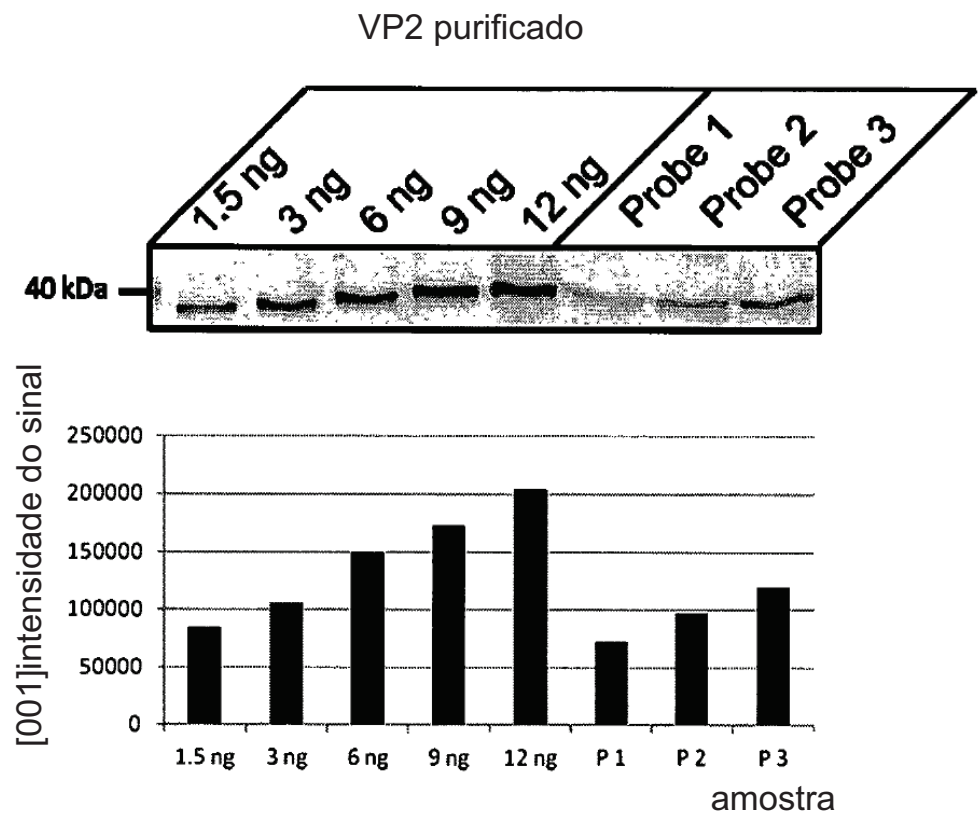


FIG. 4A

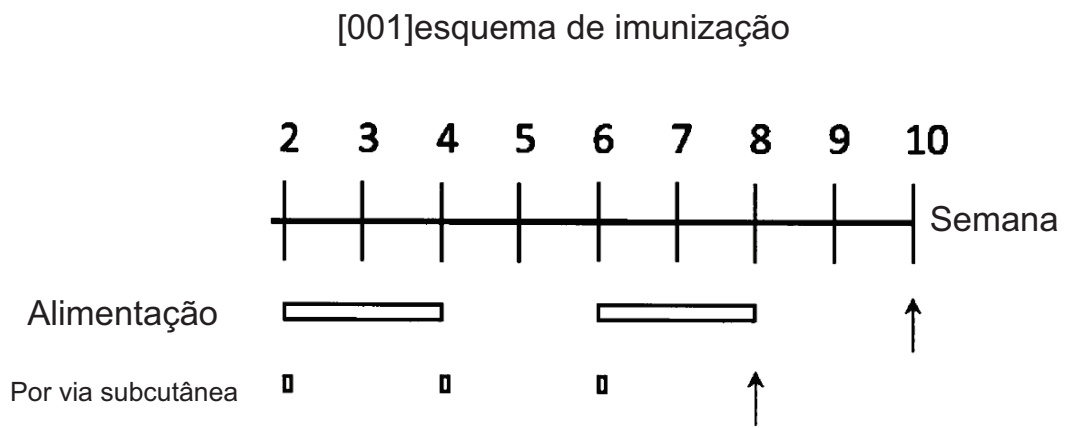


FIG. 4B

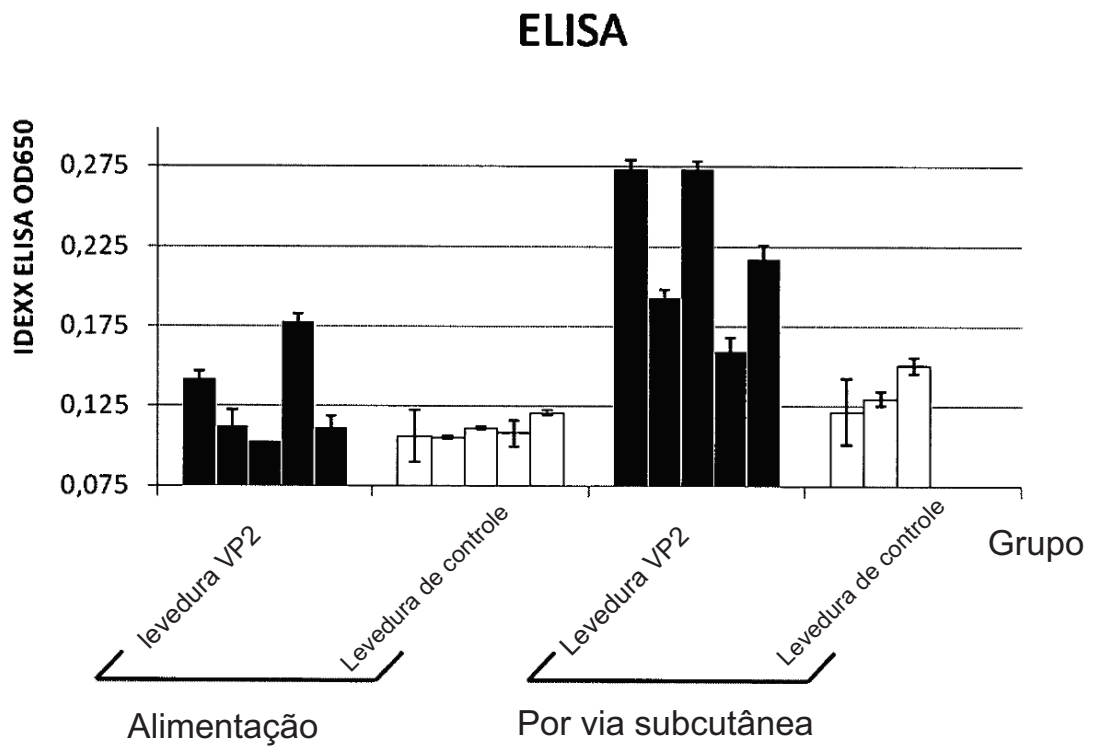


FIG. 4C

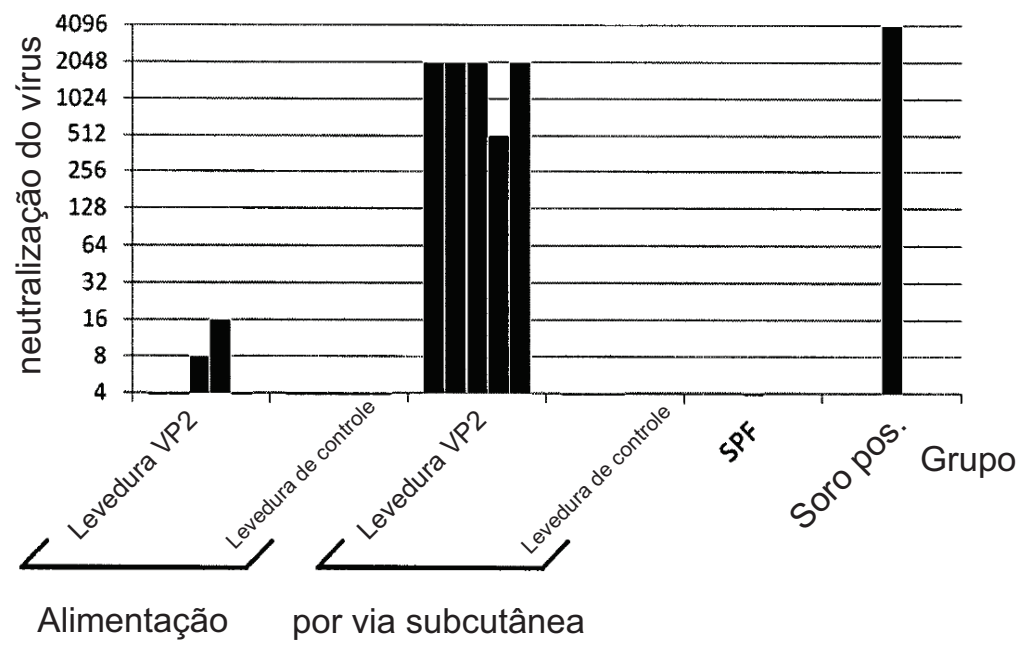


FIG. 4D

	Grupo	ELISA	Número VN positivo
Por via alimentária	Levedura VP2	0.13 ± 0.031	40 %
	levedura de controle	0.11 ± 0.006	0 %
Por via subcutânea	Levedura VP2	0.22 ± 0.05	100 %
	levedura de controle	0.13 ± 0.015	0 %

FIG. 5A

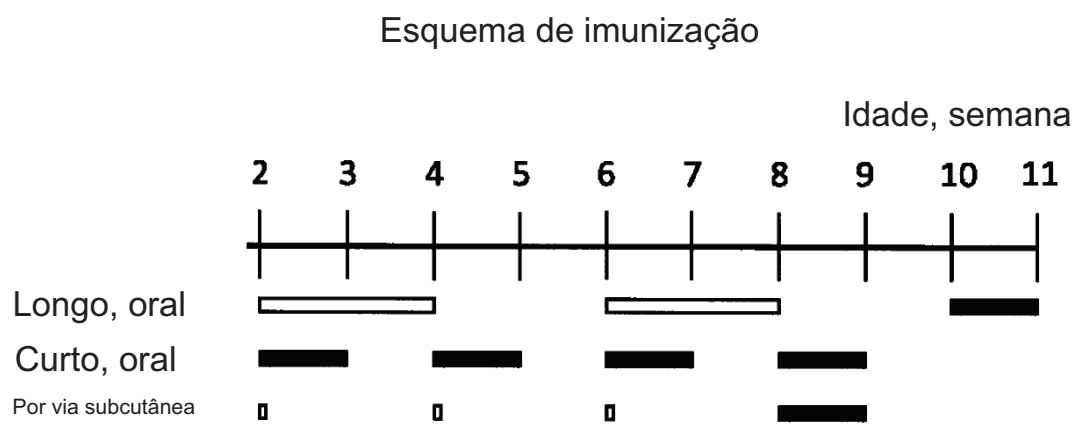


FIG. 5B

ensaio de neutralização de soro

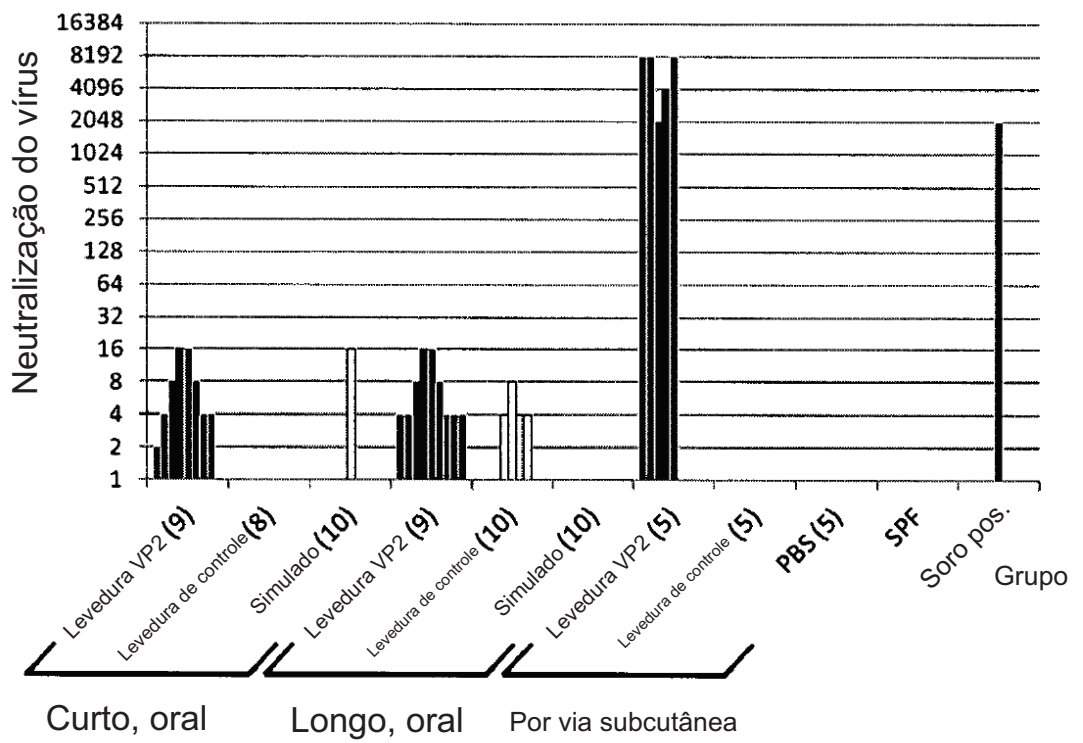


FIG. 5C

	Grupo	ELISA (título)	VN	Mortalidade	Contagem de lesões
alimentação	Levedura VP2, curto (9)	1	6.89 ± 5.75	0/9	4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4
	Levedura de controle, curto (8)	1	0	3/8	4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4
	Simulado, curto (10)	1	1.6 ± 5.06	1/10	4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4
	Levedura VP2, longo (9)	35.56 ± 36.12	7.56 ± 5.08	0/9	1, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4
	Levedura de controle, longo (10)	9.4 ± 19.6	2 ± 2.91	1/10	4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4
	Simulado, longo (10)	4 ± 2.58	0	0/10	4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4
	Levedura VP2, longo, saponina (10)	68.8 ± 70.87	6.8 ± 5.46	0/10	2, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4
	Levedura de controle, longo, saponina (9)	33.7 ± 38	0.89 ± 1.76	1/9	4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4
	Simulado, longo, saponina (9)	1	0	0/9	4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4
	Por via subcutânea	Levedura VP2 (5)	2707 ± 823.4	3072 ± 1448.2	0/5
Levedura de controle (5)		1	> 8	1/5	4, 4, 4, 4, 4, 4
PBS (5)		1	> 8	1/5	4, 4, 4, 4, 4, 4

FIG. 6

