

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 669 018**

51 Int. Cl.:

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 14/005 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

C12N 15/81 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.11.2009** **PCT/DE2009/001623**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.05.2010** **WO10054649**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.11.2009** **E 09808976 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.02.2018** **EP 2403947**

54 Título: **Procedimiento para la vacunación por vía oral/mucosa por medio de levaduras recombinantes**

30 Prioridad:

14.11.2008 DE 102008057451

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

23.05.2018

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 2 669 018 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

Procedimiento para la vacunación por vía oral/mucosa por medio de levaduras recombinantes

La contención de enfermedades infecciosas sigue siendo uno de los grandes desafíos tanto en la medicina humana como veterinaria. La situación se plantea especialmente compleja en el caso de infecciones víricas que, en contraposición a las infecciones bacterianas, por regla general, no pueden combatirse con principios activos de banda ancha y provocan grandes pérdidas económicas. El desarrollo de nuevas estrategias de vacunación efectivas frente a enfermedades víricas es por lo tanto de suma importancia.

Tradicionalmente, para la vacunación profiláctica y también para la vacunación terapéutica frente a enfermedades por virus se emplean virus "atenuados", es decir, modificados por mutagénesis con virulencia claramente reducida o ausente ("vacunas vivas"), o virus inactivados ("vacunas muertas"). En los últimos tiempos se establecieron cada vez más también las denominadas "vacunas de subunidades" o "vacunas marcadoras de subunidades", empleándose para la vacunación "antígenos principales" producidos por ingeniería genética definidos del patógeno. La expresión "vacuna marcadora" implica que pueden diferenciarse inequívocamente individuos vacunados mediante análisis diagnóstico posterior de individuos infectados naturalmente ("DIVA"-*differentiate infected and vaccinated animals* (diferenciación de animales infectados y vacunados)). Por antígenos principales se entienden por ejemplo proteínas de la envuelta de virus o de la cápsida de virus que, en ausencia de una partícula de virus completa, pueden inducir una respuesta humoral y/o celular en el huésped, como consecuencia de lo cual puede prevenirse o combatirse una infección por virus de forma preventiva o terapéutica. Una "vacunación de subunidades" requiere que los antígenos principales estén caracterizados. La producción (expresión) y formulación inmunogénica de tales proteínas ("formulación antigénica") para el proceso de vacunación desempeña un papel clave, en particular dado que las proteínas de la envuelta de virus generalmente no son solubles en agua y solo en ocasiones pueden producirse de manera recombinante en sistemas de expresión bacterianos. Correspondientemente costosos son procedimientos para obtener vacunas "de subunidades" en forma generada y garantizar su tiempo de conservación.

Las levaduras como sistemas de expresión para proteínas recombinantes reúnen las ventajas económicas de los sistemas bacterianos con la forma de organización típica para células superiores. Estas están compartimentadas por sistemas de membrana intracelulares, lo que las diferencia fundamentalmente de sistemas de huésped bacterianos y permite la expresión de proteínas de la envuelta víricas ancladas a membrana o incluso la cápsida de virus completa. Además, los beta-glucanos, polímeros de glucosa por los que está formada la pared celular de levadura, tienen un efecto inmunoestimulador conocido desde hace tiempo. Por lo tanto, el objetivo era desarrollar un procedimiento en el que puedan emplearse levaduras completas para la vacunación. El problema se resolvió introduciendo y expresando por medio de métodos de ingeniería genética genes para determinantes inmunogénicos en el genoma de levaduras no patógenas y empleando estas células de levadura recombinantes directamente para la vacunación por vía oral/mucosa.

***Kluyveromyces lactis*.**

Kluyveromyces lactis pertenece a las denominadas levaduras de **calidad alimentaria (food grade)** con el **estado GRAS (generally regarded as safe)** (generalmente considerado como seguro)). Tal como la levadura de panadería, que se ha probado y acreditado para la industria alimentaria como aditivo alimentario a lo largo de siglos, también ha resultado inocua la levadura *K. lactis* presente con frecuencia en los productos lácteos.

Vacunación por vía oral/mucosa

Vacunas/antígenos pueden administrarse **por vía parenteral u oral/mucosa**. Mientras que en el primer caso los antígenos llegan al sistema circulatorio, generalmente por inyección, evitando el tubo digestivo, en la vacunación por vía oral/mucosa la absorción transcurre a través del epitelio intestinal mucoso tras pasar por el estómago. Las mucosas intestinales están permanentemente expuestas a patógenos y representan en sí mismas una barrera de absorción importante para agentes infecciosos. Además existe un sistema inmunitario mucoso que se diferencia en los denominados **sitios inductivos y efectores**. La absorción de antígeno tiene lugar en los **sitios inductivos** a través de células M en los "parches de Peyer". Las células inmunitarias asociadas a los parches de Peyer del MALT (*mucosa-associated lymphoid tissue* (tejido linfóide asociado a la mucosa)) inducen la respuesta inmunitaria. Después de bajar la respuesta inmunitaria se generan en todo el organismo, como también en los **sitios efectores** de las mucosas, células inmunitarias *de memoria* específicas, que por regla general proporcionan una protección de larga duración frente al antígeno/patógeno original.

Ventajas de los procedimientos de vacunación por vía oral/mucosa. En comparación con una inmunización parenteral, la inmunización por vía oral/mucosa requiere el uso de cantidades de antígeno considerablemente mayores. Mediante la vacunación por vía oral/mucosa es sin embargo posible, en contraposición a la vacunación parenteral, inducir además de la respuesta inmunitaria sistémica también una respuesta inmunitaria local en los **sitios efectores** de las mucosas. En especial en el caso de los patógenos (tales como por ejemplo el virus de la diarrea viral bovina, BVDV y el virus de la peste porcina clásica, CSFV; véase también más adelante), que (también) se transmiten a través de las membranas mucosas, una vacunación por vía oral/mucosa tiene el potencial de

generar una inmunidad activa y de larga duración. Otras ventajas importantes de la vacunación oral son una buena aceptación y economía. En el caso más favorable, las vacunas pueden producirse con bajos costes y administrarse con la alimentación de forma nada complicada.

- 5 La administración oral de cepas de levadura que expresan antígenos de virus, por lo tanto, no solo es inocua, sino que podría tener efectos adyuvantes y beneficiosos para la salud adicionales.

Era ahora el objetivo desarrollar un sistema de expresión que permita la integración dirigida de genes exógenos en el genoma de *Kluyveromyces lactis* y permita correspondientemente la síntesis intracelular de antígenos. Otro
10 objetivo era emplear una cepa de *K.lactis* recombinante de este tipo, que contiene un antígeno de virus específico, para una vacunación por vía oral/mucosa.

De acuerdo con la invención se desarrolló un sistema de huésped/vector que permite integrar, a través de procedimientos de ingeniería genética, genes exógenos de manera dirigida en el locus de *LAC4* del genoma de *K. lactis*, sin que deban introducirse secuencias de ADN adicionales (marcadores de selección o similares). La
15 expresión de gen exógeno se encuentra bajo el control del promotor de *LAC4* y puede inducirse mediante lactosa o galactosa en el medio de crecimiento de forma dosificada o, activarse constitutivamente después de desactivar el gen regulador, *KIGAL80*. Las cepas de levadura recombinantes son estables sin presión de selección y pueden cultivarse en condiciones de fermentación en altas densidades. La expresión de proteína exógena puede
20 cuantificarse indirectamente a través de la expresión de un gen indicador endógeno.

Se generó una serie de cepas de vacuna de *K. lactis* recombinante. En general, estas cepas expresan de manera inducible cantidades significativas de una proteína, o dominios de esta proteína, o dominios de esta proteína fusionados con dominios de proteína de otras especies. Los dominios de proteína de otras especies relacionados a
25 este respecto sirven para fines adyuvantes o para 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. Una cepa de *K.lactis* recombinante (véase los ejemplos de realización) se empleó con éxito para la vacunación por vía oral/mucosa.

El objetivo de la invención se consiguió proporcionando una cepa recombinante de la levadura *Kluyveromyces lactis* de acuerdo con la reivindicación 20 y de un procedimiento para la vacunación por vía oral/mucosa de acuerdo con la reivindicación 1, comprendiendo este procedimiento la cepa recombinante de acuerdo con la invención de la levadura *Kluyveromyces lactis*. La invención se refiere además al uso de la cepa recombinante de la levadura
35 *Kluyveromyces lactis* para la expresión de proteínas exógenas así como en la vacunación, en particular frente al virus BVD o el virus CSF, de acuerdo con las reivindicaciones 21 a 23.

Ejemplos de realización:

40 1. Generación de la cepa de *K. lactis* VAK367-D4 (Met^r ura3 lac4::ScURA3).

La cepa de partida VAK367 para la expresión heteróloga de proteínas exógenas tiene las siguientes propiedades: permite el cultivo a altas 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.
45 La cepa VAK367 se derivó mediante dos rondas de mutagénesis de la cepa CBS 2359 (Centraalbureau voor Schimmelcultures <http://www.fungalbiodiversitycentre.com>) y es auxotrófica para el aminoácido metionina y la nucleobase uracilo. De la cepa VAK367 se derivó con métodos de ingeniería genética la cepa VAK367-D4 (depositada en la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares GmbH (DSMZ) en Braunschweig), en la que con ayuda del plásmido pD4-2 se sustituyó la secuencia de +358 a +1181 del gen *LAC4* por el gen *ScURA3*.
50 La cepa VAK367-D4 permite ahora la integración de genes exógenos en el locus de *LAC4* sin marcadores adicionales, seleccionándose en crecimiento sobre lactosa. A este respecto, el uso de un vector de integración adecuado, tal como por ejemplo Klp3 (véase a continuación) sustituye por recombinación homóloga el casete de disrupción de modo que con la pérdida del marcador de *ScURA3* se reconstituye un gen *LAC4* intacto. (Figura 1).

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

Vector: Klp3 (Figura 2)

En el caso del vector Klp3 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 contiene secuencias de *K.lactis* que
60 permite la integración en el locus de *LAC4* mediante recombinación homóloga (región en sentido de 5' de *LAC4* y extremo 5' del marco de lectura de *LAC4*). 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 el marco de lectura de *LAC4* se encuentra bajo el control del promotor de *KIGAL80*, que se regula conjuntamente a través del
65 factor de transcripción KIGal4 con el promotor de *LAC4* (Zenke et al. 1993, Molecular and Cellular Biology, 13:7566-7576). Esta construcción permite, a través de la medición de la β -galactosidasa codificada por *LAC4*, seguir la

inducción de la expresión de gen exógeno. Klp3 permite la integración del gen exógeno entre el promotor de *LAC4* y terminador de *TEF1* a través del sitio de corte *Sa/I* único. Para la integración del casete de expresión se digiere Klp3 con *HpaI* o *EcoRI* y se transforma en VAK367-D4 de *K. lactis*. A este respecto, el casete de expresión se separa de la parte de vector de *E.coli*, de modo que las cepas resultantes no contienen ninguna secuencia bacteriana.

Plásmido Klp3-E2-1 (9437 pb)

El segmento génico de BVDV, que contenía, entre otros, la región que codifica para E2 de BVDV (ORF de E2 de BVDV), se insertó como fragmento de *Sa/I-XhoI* en el sitio de corte *Sa/I* entre el promotor de *LAC4* y terminador de *TEF1*. En sentido 3' se encuentra el promotor de *KIGAL80*, que se fusionó con el extremo 5' del ORF de *LAC4*. Mediante restricción del plásmido con *HpaI* se obtienen dos fragmentos de los cuales el de mayor tamaño porta el casete de expresión con el ORF de E2 de BVDV.

3. Formulación del antígeno principal E2 de BVDV y CSFV. De BVDV (virus de la diarrea viral bovina), el agente patógeno de las diarreas virales bovinas y la enfermedad de la mucosa (BVD/MD) como también de CSFV (virus de la fiebre porcina clásica), el agente patógeno de la peste porcina clásica (CSF), está caracterizado un antígeno principal. A este respecto se trata de la proteína E2 de la "envuelta" (integrada en la envuelta del virus). E2 induce también en ausencia de una partícula de virus una respuesta inmunitaria humoral masiva, es decir, la formación de anticuerpos que neutralizan virus de forma efectiva. Mediante la formulación por ingeniería genética de E2 pudo reforzarse adicionalmente el potencial inmunogénico de la proteína y también generarse una respuesta inmunitaria celular (Bruschke et al., 1999; Nobiron et al., 2003). La respuesta inmunitaria específica y exclusiva frente a dominios de proteína de E2 individuales, en determinadas circunstancias, formulados por ingeniería genética, permite la discriminación de animales vacunados de animales infectados con virus de campo, por ejemplo por medio de procedimientos de ELISA.

4. Construcción de una cepa de *K. lactis* que expresa la proteína E2 de BVDV

Por medio de la tecnología de acuerdo con la invención se produjo la cepa de *K. lactis*, VAK367-E2-1. Para ello se cortó el plásmido Klp3-E2-1 con *HpaI* y el fragmento de mayor tamaño *HpaI*, que codifica el ORF de E2 de BVDV, se integró a través de recombinación homóloga cromosómicamente en la cepa de partida VAK367-D4 (DSM 23097). En VAK367-D4 (DSM 23097) el gen *LAC4* está destruido mediante inserción del gen *URA3 (lac4::URA3)*. Mediante la integración cromosómica del fragmento mencionado se sustituyó el sitio génico *lac4::URA3* y se reconstituyó el gen *LAC4* intacto (Figura 1). La selección de células de *K. lactis*, que contenían la secuencia génica de BVDV, tuvo lugar mediante crecimiento sobre medio de lactosa. La pérdida del gen *URA3* se confirmó mediante el fenotipo Ura-. La secuencia del sitio génico correspondiente se confirmó mediante secuenciación de ADN. (Protocolo de secuencias 1).

En la cepa VAK367-E2-1 resultante está integrado un segmento del genoma de BVDV de la cepa CP7 de BVDV en el genoma de levadura. El segmento génico de BVDV correspondiente contenía la región que codifica para la proteína E2 así como partes de las regiones E1 y p7 adyacentes. Las regiones E1 y p7 contienen las secuencias señal necesarias para el procesamiento correcto de la proteína E2 (protocolo de secuencias 2). El procesamiento correcto (maduración) de las proteínas E2 de BVDV tiene lugar a través de signalasas, que se codifican por la célula de levadura.

Por medio de un procedimiento de detección de inmunofluorescencia desarrollado específicamente puede establecerse la expresión de E2 de BVDV en células de la cepa de *K. lactis* VAK367-E2-1. Un procedimiento de ELISA desarrollado especialmente para la detección de E2 de BVDV permite la detección y cuantificación de antígeno expresado de manera heteróloga. El procedimiento de ELISA análogo pudo emplearse para la cuantificación exacta del título de anticuerpos de animales inmunizados. Procedimientos de neutralización de virus y procedimientos para la caracterización de anticuerpos y células T se emplearon como procedimientos de rutina.

Un procedimiento de qRT-PCR novedoso permite detectar y cuantificar el genoma de ARN de BVDV a partir de suero y sobrenadantes de cultivo celular.

5. Detección de la eficacia de la cepa de *K.lactis* VAK367-E2-1 en estudios de inmunización por vía oral/mucosa

Estudio 1.

En ensayos con animales se administró a un número significativo de ratones de ensayo una emulsión de *K. lactis* no tratada previamente en condiciones normalizadas. A este respecto se usaron diferentes esquemas de inmunización. Los criterios principales fueron a este respecto diferentes cantidades de levadura añadida (3 – como máximo un 8 % del porcentaje de la alimentación tomada diariamente) y diferentes "intervalos de refuerzo".

Resultados:

(i) Se demostró una compatibilidad general de *K.lactis*: la administración oral de la emulsión de levadura no provocó ningún cambio visible en el estado de los animales.

(ii) La administración oral de *K.lactis* llevó a una respuesta inmunitaria humoral detectable de manera inequívoca frente a proteínas de levadura determinadas. Mediante procedimientos de inmunotransferencia de tipo Western pudo establecerse en los animales alimentados con *K.lactis*, en comparación con los animales control, una respuesta de anticuerpo significativa y específica frente a proteínas de levadura. Las proteínas de levadura tienen por lo tanto, por sí mismas, un efecto inmunogénico. Además de la *prueba de principio*, de que con la administración oral de *K.lactis* puede generarse una respuesta inmunitaria, se indicó que mediante la administración oral de levadura en combinación con un antígeno recombinante puede conseguirse un efecto adyuvante adicional.

Estudio 2

En ensayos con animales con un número significativo de ratones se vacunó por vía oral con un esquema de inmunización optimizado (véase el estudio 1) y con *K. lactis* recombinante de la cepa 367-E2-1.

Resultados:

(i) A través del procedimiento de ELISA especial pudo detectarse la formación de anticuerpos anti-E2 de BVDV en los ratones vacunados con la cepa de *K.lactis* 367-E2-1 en comparación con los ratones control (inmunizados con *K.lactis* no tratada previamente)

ii) En una prueba de neutralización con BVDV en cultivos celulares bovinos pudo establecerse un efecto neutralizante de antiseros de ratones que se inmunizaron con *K. lactis* de la cepa 367-E2-1, a su vez en comparación con sueros de ratones control.

iii) Mediante el uso de adyuvantes tales como CpG-ODN y QuilA se consiguió un refuerzo de la respuesta inmunitaria.

iv) Mediante inmunización por vía mucosa/oral con la cepa de *K.lactis* recombinante VAK367-E2-1 pudo conseguirse una protección eficaz. Esto pudo mostrarse en experimentos de exposición con vaccinia virus recombinantes, que expresan la proteína E2 de BVDV.

Los resultados de los estudios prueban que de acuerdo con la invención, por medio de

la generación de una cepa de *K.lactis* y variantes de esta cepa, pueden integrarse de manera dirigida en las mismas genes exógenos sin marcadores de selección adicionales. Los derivados recombinantes resultantes de la cepa de *K lactis* en cuestión pueden usarse para fines de expresión para la posterior preparación bioquímica de una proteína heteróloga. Las células de las cepas de *K.lactis* recombinantes correspondientes pueden emplearse directamente para la inmunización por vía mucosa/oral o parenteral.

Datos de secuencias

Molécula: Klp3, 8117 pb ADN circular
Descripción: Ligación de lac4 en i-amp
Nombre del archivo: Klp3.cm5, fecha 12 de noviembre de 2009
Impresión: 1-8117 pb (completa), formato monocatenario

```

1      aggtggcact tttcggggaa atgtgcgcgg aacccctatt tgtttatttt tctaaataca
61     ttcaaatatg tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat aatattgaaa
121    aaggaagagt atgagtattc aacatttccg tgtcgccctt attccctttt ttgcggcatt
181    ttgccttcct gtttttgctc acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg ctgaagatca
241    gttgggtgca cgagtgggtt acatcgaaac ggatctcaac agcggtaaga tccttgagag
301    ttttcgcccc gaagaaacgtt ttccaatgat gagcactttt aaagttctgc tatgtggcgc
361    ggtattatcc cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcggc cgccgcatac actattctca
421    gaatgacttg gttgagtact caccagtcac agaaaagcat cttacggatg gcatgacagt
481    aagagaatta tgcagtgtcg ccataacatc gagtataaac actgcggcca acttacttct
541    gacaacgatc ggaggaccga aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg gggatcatgt
601    aactcgcctt gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg acgagcgtga
661    caccacgatg cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg gcgaactact
721    tactctagct tcccggcaac aattaataga ctggatggag gcggataaag ttgcaggacc
781    acttctgcgc tcggcccttc cggctggtcg gtttattgct gataaatctg gagccggtga
841    gcgtgggtct cgcggtatca ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct cccgtatcgt
901    agttatctac acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac agatcgtcga
961    gataggtgcc tcactgatta agcattggga actgtcagac caagtttact catataact
1021   ttagattgat ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga tcctttttga
1081   taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcgctt cactgagcgt cagaccccg
1141   agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc tttttttctg cgcgtaactc gctgcttga
1201   aacaaaaaaa ccaccgtac cagcgggtgt ttgtttgccc gatcaagagc gctgcttga
1261   ttttcggaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgtac ttctagtga
1321   gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc tcgctctgct
1381   aatcctgtta ccagtggctg ctgcagctgg cgataagtcg tgtcttaccg gttggactc
1441   aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acgggggggt cgtgcacaca
1501   gccagcttg gagcgaaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg agctatgaga
1561   aagcgccacg cttcccgaa ggaagaaaggc ggacaggtat ccggtaaagg gcagggtcgt
1621   aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaaaacgc ttggtacttt atagtcctg
1681   cgggtttcgc caccctctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag gggggcggag
1741   cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt ttacggttc ctggcctttt gctggccttt
1801   tgctcacatg ttcttctctg cgttatcccc gattctctgt gataaccgta ttaccgcctt
1861   tgagttagct gataccgctc gccgcagcgg aacgaccgag cgcagcaggt cagtgaagca
1921   ggaagcggaa gagcgcccaa tacgcaaacc gccctcccc gcgcgttggc cgattcatta
1981   atgcagctgg cacgacaggt ttcccagctg gaaagcgggc agtgagcgca acgcaattaa
2041   tgtgagttag ctactcatt aggcacccca ggctttacac tttatgctcc cggctcgtat
2101   gttgtgtgga attgtgagcg gataacaatt tcacacagga aacagctatg accatgatta
2161   cgccaagcgc gcaattaacc ctactaaag ggaacaaaag ctgggtaccg ggcccgcgac
2221   ctaaccattc aaatgattca taactatctc ctagccagaa ttcgtacctt actcttgga
2281   aatcaggagg ctgatattcg ccagtaagct tcatagaagt gttcaagctt atttgttag
2341   caaagatcgt gtacttctga acagtctcaa acccatagta aaatacaact ggggatatac
2401   gagagttaac cgtgactaca gctagagaac cattagaacc tttttcgaca ctactccat
2461   ggatgttttg cttcattaaa tcaatattgt acttcttcca gttctttaa gctcactcgt
2521   catcattatt cggttgaggt ctccagaaag tgattgaaga accctcaaac ttgctgtaaa
2581   tttccttacc cttgaccttt aggttttcaa ttttacccaa caatttgtcc aagataaaat
2641   gcaatccact ggattcaact gagacataac gtttaccgtc gttgatcttc gcagcttttt
2701   ctgctgtctc tgtaacaaaa tcgggtacct tcaatggaag ttcagcttgg cccagcgcaa
2761   tttcatgacc tgcctttaga acaccagcat catctttcaa cagggaaca acataagttg
2821   tatcagaagg aatagtaaca gattcttctg gctttaaaga tggaacgtcg attgtcttc
2881   ccgtgtcctt gtcgataaac aataagtggt ctgtcgtaat gaagtcgtgc ttatttgtga
2941   ttgttacaga tccgtgcgca attttaatat gaacgggttc aataaccttc ttatactcta
3001   caaggcccgg agtaggatta tgctcactgt tacacaaacc atccatgatg aacactccgt
3061   catgaacctc ttccctaaag tcaccaccat aagcataagc tttatgcaac ttaccatctg
3121   cagtactaac atcttcgaat tcaataccgt gatttgccca ttcccagata aagccacctt
3181   ggtaaaaactt ctcctttag aacaactctt gatattcttt caaagagcca ggaccgttac
3241   ccattgcatg gccgtactca cacaagatca aaggcttttc aaacttacca ttttcatcag
3301   tgtggttctt cctccacctt tccataattt caaatggttg gtacatgaaa ctaaagatat
3361   ctgcactcaa agcgttcaag tcaccctcat aatgcacaag tctggtgaaa tccaattgtt
3421   taattaactt gtacatggct ttgtggtttc tgccataaca agcttctgta cccaaggacc
3481   agataataat cgaaggatga ttgacatctc ttaggacaag agcttctgta ctgtctaagt
3541   acgcgacctc gtactctgga ttatctgata agtaatgggc attaacatcg tagagtttat
3601   ttttagtata tggatattca gcctccaagt tcgtatgacg attaaatggc tottgaacac
3661   catgagtttc aagatctgcc tcgtcaatga cccagaagcc cagcttatcg aagaggtcat
3721   acaccttagg atggtttgga taatgcgagt tacgaacagc attgatgtta aacttcttca
3781   ttagaatcaa gtccttaaca acaaaatcta atggcacagc tctaccgaac cttggatgg
3841   gatcatgtct gttgacacct ctaaagagaa tgtctttgcc attaacagta atgttaccgt
3901   ccttcaactc cacttgtctg aaaccaacat ggtgcttaat agattgaatc acactgccat
3961   cagatccaat taaatccaac tggtaactgt acaaaagtag attttctgcg gtccaatgtt
4021   ctggggcctt gacgttgatc ttgaaagctg tttcttcggt ctttttggtg gagaagggaa

```

```

4081   taaattcttt agttgaaaaa gtcgtgttcc cattctcctc gttcaacaaa gagcttgcat
4141   cgtaaaacttt agatccatct tcaggttcgt aaagtgtgaa attgtgtgga tcataagaag
4201   aaccctggac atcaactttc acagaaagct ctgcatectg atactgagag tccacaaaag
4261   ttgtagttag cctaactgtc tcaatatggg ccttcttagg caattttagt aaagaaacgt
4321   ctctgtaaat accagagagc caccattgat ctgggtcctc gatataagtg gaatcggacc
4381   acttgaaaaa cttgacggac actaagtttt cgccctcaga aacgtacttt tggatatcaa
4441   attcagcccc gttacgggac cccttattga aacccacata ttgaccatta acataaagct
4501   cgtaacaatt gtccacaccc tcaaatctca atctgtgtc gaacgactca atcgatttcg
4561   aatctaattc aaaaagtcta gcataaacac cagtaggatt tacagtggga ggatttggga
4621   tgtcgattgg gatagggtag tgtacgttcg tgtaaattgg tttaccgtac ttccagtctt
4681   cctgaagttc ccaatgggat ggcacagaaa tgggtgtcca tttctttgcc gtttcccagt
4741   ctaaaattctt agcatccgga gcgtcaagag gtgcatcaaa caacgcaaaa gcccaaggcc
4801   cattgagaga ttcgaaaata tcctgatcat agtagtaagc cctagtaggc aatctatttt
4861   cgtgaacctt tttggggttc cttaaattct caggaataag gcaagccatg gtgccgtcct
4921   gccgagatat tgtgtacact ggatcaaata ataacacttt caaagtgact aaatcacat
4981   tgtcccaaga tatactatag ctctctgttt aacctttata ttgtcaaaaa gggacaatga
5041   atgaaagtac aaacacaaac acaaacacaa tggaggggag tgtccagggt tggtagtcc
5101   gactgtactg attcgacgga gttttatttg atttcgttga agtgggttaa gtgaataatt
5161   cttgaattga gaggaacaaa gagtggataa aataacggaa tggagagggt cgagcgatga
5221   ataattgtacg attcggaaga ctatgagccg gctgaacctg aggttatgga ccactaacgt
5281   cctgggttagc aagagtagtc atgtaataca aacgtaaatg tgatatatta tagaatataa
5341   gtagatatag ttaaaaaaga gaagaagaat agaaagaata aggggtattag aaatttagag
5401   tcatttttaa caattgataa cttgggttaa agctcgaagt tttgttgata gtagtttttt
5461   tttttgtttt agttggtttg ttcaatagta taaggttaca ggggtcgaga caaacgttgt
5521   aacacttttc atctccccc gctaatacacc tagtcgagag ctcgtttttc acactggatg
5581   gcggcgtagt tatcgaaatc acagcagtat agcgaccagc attcacatag gattgacgca
5641   tgatattact ttctgcgcac ttaacttcgc atctgggcag atgatgtcga ggcgaaaaaa
5701   aatataaatc acgctaacat ttgattaaaa tagaacaact acaatataaa aaaactatac
5761   aatgacaag ttcttgaaaa caagaatctt tttattgtca gtagtgatc gacggtacag
5821   cttctcgatg agtatgtgtg tttatttttt ttttattttt tttgccaatt tctgtctttt
5881   cctaatttc aagtgttgag cttgttatcc gctcacaatt ccagcttttg tctcttacc
5941   ttttccaaact acaagcgcaa cataacaaaa gaataataat tctcctaaga aacacaagcc
6001   tcatatacct ttcgagttag ggaagaacat cttctctctg ttctcacatt gattcgagct
6061   attaaatacc tttttctcaa tcgaaatctc aagtataaca gcaatgaaaa cattacgtaa
6121   ctaaaagtg taccactag aaatcatacc cttcacactc gacttcaagt agtgaatgg
6181   gtagcaacaa agtccaaata ccaatgtcaa ccaagtaacc gaccgacta ctagaaaaag
6241   acgctgttgc tcggaccaca aatttccgct acacttttca caactatact gaagatacaa
6301   aaaacgtgtg tgggtatggc tggctaccag gtgcgctggg taaaccaagt caacgtgata
6361   catatgtacg ttccaacact aagcctaccc ctacacagg ctacacagg aggttatat
6421   taacatgcaa gacaaggag aagcaaagca aagaccaacc gaaacccacc agagcacctt
6481   gaactttgcy gtgaacagaa ttccgcaaca tatctgagga taccatgatc tctgttttct
6541   actcatatg ggaatcacc actgtgtccc gtaaatatga ccaaattcct accttgattc
6601   ctacgaata atcgagtcg gaaaagccgt tccaaaagcc agtccacagt ccatcaattg
6661   gtatgatgat tgtttttttg ttcaaactga cacactaacg gtgtggaatg cgaagagtga
6721   gcttaccctt ctctcttttg ctagcagtag ttgactacct acctactcta ctacgtgcc
6781   atattgtcta acattcggt ttctctattt ctacctggcc tggatggctc cgtctcgccc
6841   gctcacaca catacattcc tccccctctc gcctgcccc taataattaa acaagttaac
6901   aaaagcggtt acctcttcg catctctccc aatctcatac gattccccct tcatccgact
6961   taccacaaca gatacaggat ctcaagtcaa gatccttctt gccctccctt tctgttgtct
7021   actctacatg cgacttgga ggcacaaagg ctatcgcatg attattcgcc gggaaccgcy
7081   gagttccctg ctcttttctt tcaaacagg cagcaaacca ggtgaacaca ctctgatgta
7141   gtgcagtcct taagtcttt gaagattcgg ggagctagct acccacgca atgtacaaa
7201   agaacattta cttttgtgg ggggtgaaaa gtcgattagg atcttgacaa acagaaactg
7261   cgcagggtt tttttcatc tggagaagca actggctaaa ttcgacacaa acaaaaactg
7321   aaaaatggaa aataaaaaat gaaaaagcaa gctgaattcg aagaaggag aattccgcct
7381   tctgcaacaa cactaatgt tggtagtcaa tagatacgca ttagaaggtt actattttat
7441   gagtcgatcc cgcggtgga gctccaattc gccctatagt gactcgtatt acgcgcgtc
7501   actggccgtc gttttacaac gtcgtgactg ggaaaaacct ggcgttacct aacttaateg
7561   ccttgacgca catccccct tcgccagctg gcgtaatagc gaagaggccc gcaccgatcg
7621   cccttcccaa cagttgcgca gctgaatgg cgaatggcgc gacgcgcct gtageggcgc
7681   attaaagcgc gcgggtgtgg tggttacgcy cagcgtgacc gctacactg ctagcgcct
7741   agcgcgcgt cctttcgctt tcttcccttc ctttctcgcc acgttcgcgc gctttcccg
7801   tcaagctcta aatcgggggc tccctttagg gttccgattt agtgctttac ggcacctcga
7861   ccccaaaaaa cttgattagg gtgatggttc acgtagtggt ccatcgccct gatagcgtg
7921   ttttcgcct ttgacgttg agtccaggt ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg
7981   aacaacactc aaccctatct cggcttatcc ttttgattta taagggtatt tgcgatttc
8041   ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat
8101   attaacgctt acaattt

```

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la vacunación por vía oral/mucosa que comprende la administración de una cepa de levadura recombinante, generada por ingeniería genética, de la levadura *Kluyveromyces lactis*, **caracterizado por que** esta cepa recombinante contiene un casete de expresión integrado genómicamente que se compone del promotor de *LAC4* inducible por lactosa, un gen exógeno que codifica para una proteína inmunogénica, un terminador de la transcripción y el gen *LAC4* que codifica para la enzima β -galactosidasa bajo el control del promotor de *GAL80* de *K. lactis* (*KIGAL80-P*), teniendo lugar la integración dirigida de genes exógenos en el locus de *LAC4* del genoma de levadura, sin que se introduzcan secuencias de ADN adicionales, y la expresión de genes exógenos se induce mediante lactosa o galactosa de manera dosificada o se activa constitutivamente después de desactivar el gen regulador *KIGAL80*.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado por que** las cepas de *K. lactis* recombinantes son genéticamente estables durante el crecimiento en condiciones no selectivas.
3. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado por que** las cepas recombinantes de la levadura *Kluyveromyces lactis* se emplean como sistema de expresión y para la vacunación.
4. Procedimiento según las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado por que** las cepas recombinantes de *Kluyveromyces lactis* permiten la expresión inducible por lactosa de genes exógenos.
5. Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones anteriores 1 a 3, **caracterizado por que** el gen exógeno se integra en el locus de *LAC4* de la cepa de *Kluyveromyces lactis* recombinante.
6. Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** la cepa de *Kluyveromyces lactis* recombinante, aparte del gel exógeno, no contiene secuencias de vector adicionales ni marcadores de selección.
7. Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** la expresión de gen exógeno tiene lugar constitutivamente después de desactivarse el gen *KIGAL80*.
8. Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** la expresión de gen exógeno puede cuantificarse indirectamente a través de la expresión de un gen indicador endógeno.
9. Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** el gen exógeno permite la expresión de proteínas víricas con propiedades antigénicas.
10. Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** el gen exógeno permite la expresión de proteínas estructurales víricas.
11. Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** el gen exógeno permite la expresión de proteínas estructurales víricas de las familias *Flaviviridae*, *Birnaviridae* y *Orthomyxoviridae*.
12. Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** el gen exógeno permite la expresión de proteínas estructurales del virus de la diarrea viral bovina (BVDV).
13. Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** las cepas recombinantes de la levadura *Kluyveromyces lactis* expresan de manera inducible o constitutiva cantidades significativas de una proteína o de dominios de esta proteína o de dominios de esta proteína fusionados con dominios de proteína de otras especies.
14. Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** se permite la preparación bioquímica de proteínas exógenas.
15. Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** en el caso de una vacunación por medio de la administración de células de levadura completas de una cepa recombinante de la levadura *Kluyveromyces lactis* se genera una inmunización específica frente a proteína exógena expresada.
16. Procedimiento según la reivindicación 15, **caracterizado por que** en el caso de una vacunación por medio de administración por inhalación, bronquial, oral, nasal de células de levadura completas de una cepa recombinante de la levadura *Kluyveromyces lactis*, se genera una inmunización específica frente a proteína exógena expresada.
17. Procedimiento según la reivindicación 16, **caracterizado por que** proteínas exógenas preparadas bioquímicamente permiten una inmunización específica.
18. Cepa recombinante de la levadura *Kluyveromyces lactis*, **caracterizada por que** esta cepa recombinante

contiene un casete de expresión integrado genómicamente que se compone del promotor de *LAC4* inducible por lactosa, un gen exógeno que codifica para una proteína inmunogénica, un terminador de la transcripción y el gen *LAC4* que codifica para la enzima β -galactosidasa bajo el control del promotor de *GAL80* de *K. lactis* (*KIGAL80-P*),
 5 introduzcan secuencias de ADN adicionales, y la expresión de genes exógenos se induce mediante lactosa o galactosa de manera dosificada o se activa constitutivamente después de desactivar el gen regulador *KIGAL80*.

19. Uso de la cepa recombinante de la levadura *Kluyveromyces lactis* según la reivindicación 18 para la expresión de proteínas exógenas.

10 20. Cepa recombinante de la levadura *Kluyveromyces lactis* según la reivindicación 18 para su uso en la vacunación.

21. Cepa recombinante de la levadura *Kluyveromyces lactis* según la reivindicación 18 para su uso en la vacunación por vía oral/mucosa frente al virus BVD o el virus CSF.

Fig. 1

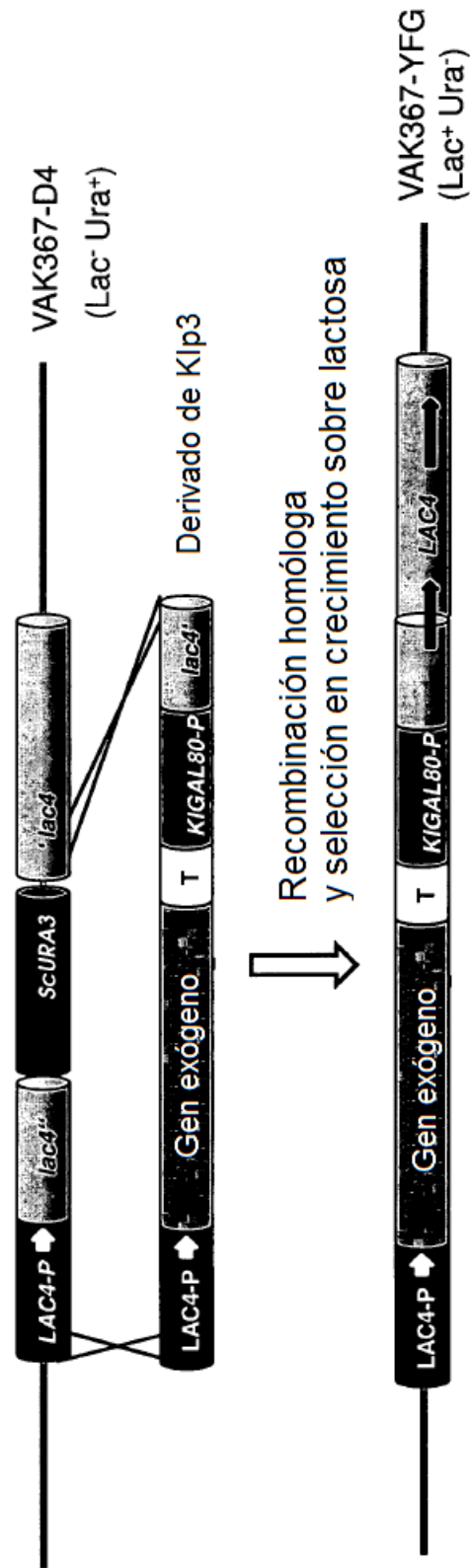


Fig. 2

