

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 990 197**

(51) Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01)
C12N 15/81 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- (86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.12.2018 PCT/DE2018/000379**
(87) Fecha y número de publicación internacional: **04.07.2019 WO19129321**
(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2018 E 18857443 (8)**
(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2024 EP 3732293**

(54) Título: **Sistema de hospedador/vector optimizado para la generación de vacunas de subunidades mono- y multivalentes protectoras a base de la levadura Kluyveromyces lactis**

(30) Prioridad:

27.12.2017 DE 102017012109

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.11.2024

(73) Titular/es:

VEROVACCINES GMBH (100.0%)
Blücherstrasse 26
06120 Halle/Saale, DE

(72) Inventor/es:

HÜHRLIMANN, HANS CASPAR;
BEHRENS, MARTINA;
GEBAUER, MANDY;
BREUNIG, KARIN y
BEHRENS, SVEN-ERIK

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 990 197 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

Sistema de hospedador/vector optimizado para la generación de vacunas de subunidades mono- y multivalentes protectoras a base de la levadura *Kluyveromyces lactis*

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a levaduras *Kluyveromyces lactis* (*K. lactis*) recombinantes que son capaces de expresar con gran eficacia una o varias proteínas extrañas y son adecuadas para su uso como vacuna para la generación de una respuesta inmunitaria protectora frente a patógenos. La invención proporciona en particular cepas de *K. lactis* para la clonación dirigida de ácidos nucleicos que codifican antígenos extraños en el genoma de levadura de la cepa de *K. lactis*, que se caracteriza por que la cepa de *K. lactis*, además del locus *KILAC4*, presenta casetes de expresión para antígenos extraños integrados en el locus *KIURA3-20* (*KLLA0E22771g*) y/o en el locus *KIMET5-1* (*KLLA0B03938g*). La invención se refiere además a vectores de expresión integradores y a procedimientos para la generación de las 10 cepas de *K. lactis* de la invención así como a su uso como vacunas.

15

Antecedentes de la invención

20 Las vacunas se utilizan para prevenir enfermedades (vacunas preventivas) o para tratar enfermedades establecidas (vacunas inmunoterapéuticas). Los programas de vacunación preventiva han contribuido significativamente a la reducción de las enfermedades infecciosas en los últimos 100 años aproximadamente. Las vacunas inmunoterapéuticas solo se desarrollan y utilizan desde hace unos 20 años, por ejemplo contra infecciones persistentes por virus, bacterias o parásitos o contra enfermedades cancerígenas. El objetivo de la vacunación es inducir una respuesta inmunitaria celular (es decir, mediada esencialmente por células T y NK) y/o humoral (es decir, mediada esencialmente por células B/anticuerpos), así como una memoria ("memory") inmunológica contra componentes antigenicos de patógenos o células malignas (tumorigénicas). Las vacunas clásicas contienen todo el agente patógeno en forma atenuada (inactivada) o muerta, incluido su material genético, es decir, los ácidos nucleicos en forma de ADN o ARN. Estas vacunas clásicas suelen requerir precauciones especiales de seguridad y/o el uso de organismos infecciosos y/o cultivos celulares para su producción; además, estas vacunas a menudo tienen que 25 almacenarse y transportarse con grandes gastos y con el uso de cadenas de frío. Además, el uso de vacunas clásicas alberga el riesgo de que sustancias procedentes del proceso de producción (por ejemplo, del animal de experimentación o del cultivo celular) provoquen efectos secundarios en el individuo vacunado o de que se produzca una reactivación no deseada del agente patógeno. Existen también problemas en el diagnóstico: Por ejemplo, en el caso de la vacunación del ganado con patógenos completos, los animales vacunados no pueden distinguirse de los 30 infectados de forma natural, lo que significa que no pueden utilizarse sistemas de alerta precoz basados en la detección de nuevas infecciones. Por esta razón, se han desarrollado las denominadas "vacunas de subunidades" que solo vacunan con componentes definidos del patógeno. El requisito previo para su uso es que se conozcan los "antígenos principales" del agente patógeno respectivo. Los antígenos principales suelen ser componentes superficiales del patógeno que pueden ser reconocidos por el sistema inmunitario, por ejemplo, proteínas de una cubierta vírica o de 35 una cápside vírica. Estos antígenos principales pueden inducir una respuesta inmunitaria humoral y/o celular y una memoria inmunológica en el hospedador contra el virus, incluso en ausencia de una partícula vírica completa. Dado en la "vacunación de subunidades" faltan otros componentes del agente patógeno, pueden diferenciarse los individuos vacunados de los infectados de forma natural mediante un diagnóstico diferencial (*Differentiating Infected from Vaccinated Animals* (DIVA)); en consecuencia se habla también de una "vacuna de marcador de subunidades". Las 40 desventajas de muchas vacunas de subunidades son una producción a menudo costosa y una inmunogenicidad a menudo insuficiente: Mientras que los propios agentes patógenos pueden cultivarse de forma eficiente (con las limitaciones expuestas anteriormente), sus antígenos principales tienen que producirse mediante ingeniería genética mediante procedimientos costosos y, generalmente, ineficientes, y purificarse con grandes gastos. Por consiguiente, las vacunas de subunidades obtenidas de este modo son material biológico que tiene una vida útil corta y que a 45 menudo debe almacenarse y transportarse refrigerado. Por estos motivos, la mayoría de las vacunas masivas para el ganado siguen basándose en el principio clásico de usar agentes patógenos completos.

50

55 La bursitis infecciosa (IBD), enfermedad muy extendida entre las aves de corral, se desencadena por el virus de la bursitis infecciosa (IBDV), un virus no envuelto con un genoma de ARN segmentado de doble cadena de la familia *Birnaviridae*. La mayoría de las vacunas contra la IBD se basan en virus atenuados (debilitados) o inactivados. Sin embargo, el problema en este caso es que los "virus vivos" no inactivados fuertemente atenuados y también los virus inactivados ofrecen protección contra los virus de IBD patógenos promedio, pero no es el caso de las cepas de virus de IBD altamente virulentas (*very virulent*) (vvIBDV). Hasta hace poco, los virus atenuados muy virulentos (*intermediate hot strains*) protegían contra vvIBDV - sin embargo, estas cepas de vacuna tienen efectos secundarios en forma de 60 que pueden provocar inmunosupresión debido a daños transitorios en las células B en la *Bursa fabricii*, un órgano linfático (Rautenschlein *et al.* (2005)). Sin embargo, incluso estas vacunas *intermediate hot* no ofrecen una protección completa contra las cepas de vvIBDV descubiertas recientemente (Negash *et al.* (2012); Kasanga *et al.* (2007)). Un problema de la vacunación con virus vivos altamente atenuados es además que los anticuerpos maternos impiden la replicación del virus y, con ello, la inducción de una respuesta inmunitaria. Una vacunación eficaz con estas vacunas 65 es posible por lo tanto tres semanas tras la eclosión (Kumar *et al.* (2000); Rautenschlein *et al.* (2005)).

- Los virus de la gripe A, por ejemplo, pertenecen por ejemplo a los patógenos virales más importantes del mundo (Short *et al.* (2015); Silva *et al.* (2012)). Los virus de la gripe pertenecen a la familia de los *Orthomyxoviridae*; son virus envueltos con ARN monocatenario segmentado como genoma. Como la mayoría de los virus de ARN, los virus de la gripe también están sujetos a una elevada tasa de mutación. La reagrupación de segmentos de ARN vírico en particular produce progenie vírica con nuevas propiedades genéticas y biológicas (Short *et al.* (2015)). Debido a su rápida evolución, las vacunas contra los virus de la gripe plantean en particular el problema de que las vacunas existentes no "funcionan" con las nuevas variantes de virus generadas. Por ello, desde hace tiempo se intenta desarrollar vacunas que ofrezcan protección cruzada y, por tanto, protección a largo plazo contra diversas variantes de la gripe (Steel *et al.* (2010); Krammer y Palese (2013); Kirchenbaum y Ross (2014); Berthoud *et al.* (2011)).
- El virus de la diarrea viral bovina (VDVB) es un patógeno muy extendido entre los animales bisuínulos. El VDVB es un miembro del género *Pestivirus* de la familia *Flaviviridae*. El genoma de ARN monocatenario de estos virus también está sujeto a una elevada tasa de mutación. Además, el feto puede infectarse en animales preñados y nacer entonces animales persistentemente infectados (PI) debido a la tolerancia inmunitaria. Estos animales PI propagan el virus y, en el caso de la mutación del virus, pueden morir al 100 % por la denominada *enfermedad de la mucosa*. También en este caso se trabaja desde hace tiempo en el desarrollo de vacunas que ofrezcan protección cruzada y protección a largo plazo contra diversas variantes del VDB (Ridpath (2015)).
- Vacunas de subunidades* eficaces pueden tratar o resolver este problema. Las *subunidades* son en la mayoría de los casos componentes de proteína de agentes patógenos; estos pueden producirse por ingeniería genética en distintas células hospedadoras. Además de la bacteria intestinal *Escherichia coli*, células de mamífero o células de insecto, que pueden propagarse en cultivos celulares, células vegetales y diversos hongos se han establecido como sistemas hospedadores para la expresión heteróloga de proteínas. Los sistemas microbianos, tal como bacterias y hongos, pueden cultivarse a gran escala de manera especialmente rentable.
- Células de levadura de los géneros de levadura *Saccharomyces*, *Pichia* y *Kluyveromyces* se utilizan ya desde hace décadas de forma rutinaria para la expresión de proteínas extrañas. Las células de levadura tienen la ventaja sobre las bacterias de que son eucariotas, es decir, se parecen a las células animales en muchos aspectos, y las proteínas eucariotas, es decir, las proteínas que se forman y/o deben ser funcionales en las células animales, pueden producirse en la levadura en forma nativa o casi nativa de manera rentable (Bathurst (1994); Gellissen y Hollenberg (1997)). Las levaduras se usaron primeramente solo para producir las proteínas extrañas; después de la expresión, se purificaron las proteínas de las células de levadura y se utilizaron como *vacunas de subunidades*. Solo recientemente se ha intentado administrar levaduras propiamente dichas o fracciones celulares de levaduras como vacunas. Por consiguiente, las "vacunas basadas en levadura" son partículas de levadura que contienen componentes inmunológicamente activos de agentes patógenos (antígenos) y que, tras su aplicación (por ejemplo, por vía subcutánea, intramuscular u oral/mucosa), pueden desencadenar una respuesta inmunitaria específica en el organismo hospedador contra estos antígenos y, con ello, también contra el patógeno del que proceden estos antígenos. En el caso deseado, se induce una "memoria" (*memory*) inmunológica en los organismos vacunados que, en caso de una infección posterior ("exposición" ("challenge")), impide la multiplicación y/o propagación de los patógenos correspondientes y/o alivia los efectos patológicos de la infección. Como se ha mencionado anteriormente, los antígenos son generalmente proteínas estructurales del agente patógeno cuyas secuencias de ácido nucleico codificantes (genes codificantes de antígenos) se introducen en células de levadura mediante métodos de ingeniería genética y permiten la expresión de una o varias de tales proteínas estructurales. Las levaduras recombinantes así generadas en forma viva (células de levadura), después de matarlas y secarlas en forma de polvo (partículas de levadura) o después de disgrigar y homogeneizar las células (lisado de levadura) son vacunas a base de levadura. Tras la aplicación de la vacuna, los antígenos son reconocidos por el sistema inmunitario y provocan una respuesta inmunitaria humoral y/o celular.
- La vacunación basada en levadura es conocida por el experto en la materia por el estado de la técnica. Una serie de solicitudes de patente y patentes de los EE. UU., como, por ejemplo, US 20090304741 A1, US 5830463 A, US 7465454 B2 y US 20070166323 A1 describen el uso de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), que contienen al menos un antígeno recombinante, en la immunoterapia. Se mostró que estas levaduras son eficaces para estimular una reacción inmunitaria, en particular una reacción inmunitaria mediada por células.
- El documento WO 2006044923 divulga levaduras (*S. cerevisiae*), que expresan de manera recombinante distintas proteínas del virus de la hepatitis C (VHC) y que puede desencadenar una reacción inmunitaria, en particular una respuesta de las células T, contra estas proteínas del VHC y está destinada a utilizarse como vacuna contra la hepatitis C crónica.
- El documento WO 2007092792 describe la utilización posible de levaduras de *S. cerevisiae* recombinantes contra infecciones por virus de la gripe, en donde se usa una combinación de distintas cepas de levadura, cuya aplicación lleva a una inducción de células T, es decir a una respuesta inmunitaria celular.
- El documento WO 20101054649 y el documento WO 2013107436 describen la utilización de cepas de la especie *Kluyveromyces lactis*, que contienen antígenos definidos, para la generación de una respuesta inmunitaria humoral protectora tras aplicación oral/mucosa o subcutánea de células de levadura muertas completas. Las patentes

mentionadas en último lugar contienen ejemplos de aplicación en los que se utilizaron con éxito para la vacunación cepas de *K. lactis* recombinantes que se derivaron de la cepa de partida VAK367-D4.

5 La posibilidad de la aplicación de levaduras de *Kluyveromyces lactis* recombinantes para la vacunación es conocida por el experto en la materia a partir del estado de la técnica: (Arnold *et al.* (2012)); documentos WO 20101054649 y WO 2013107436). En ejemplos de aplicación pudo mostrarse que mediante la administración subcutánea de la levadura *K. lactis*, que expresa intracelularmente la proteína de la cápside VP2 del virus de la bursitis infecciosa (IBDV) a través de un casete de expresión controlado por el promotor de *LAC4*, se desencadena una respuesta inmunitaria humoral que confiere una protección eficaz contra la infección viral. Esto se ha demostrado para un virus IBD de 10 patogenicidad intermedia, pero hasta la fecha no contra el IBDV *muy virulento* (vvIBDV). Los datos anteriores mostraron que la eficacia de una vacuna de levadura puede mejorarse aumentando la concentración intracelular del antígeno viral (Arnold *et al.* (2012)). Una variante técnica para conseguir un aumento de la concentración de antígenos, consiste en introducir una copia adicional del gen activador de la transcripción *KIGAL4-1* (alias *LAC9-1*) por medio de 15 integración del plásmido pLI-1 (Kriger *et al.* (2012) y el documento WO 2013107436) en la cepa que expresa VP2 de IBDV (cepas depositadas DSM 25406 y DSM 25407). La generación de tales cepas de vacuna de *K. lactis* se basaba por lo tanto hasta ahora en dos intervenciones genéticas: en primer lugar en la integración del gen extraño que codifica 20 antígenos, en segundo lugar en la integración del gen *KIGAL4-1*. En la forma que se ha puesto en práctica hasta ahora, esto último llevaba sin embargo regularmente también a la integración de repeticiones en tandem del plásmido, lo que no solo tiene como consecuencia efectos citotóxicos debido a la gran sobreexpresión del activador (Breunig 1989), sino que también lleva a diferentes números de copias para los genes *KIGAL4-1* y *ScURA3* en cepas de vacuna generadas de esta manera.

25 La estrategia descrita en los ejemplos de aplicación mencionados anteriormente (Arnold *et al.* (2012); documentos WO 20101054649 y WO 2013107436) de efectuar la expresión del gen extraño a través de un promotor de *LAC4* no modificado tiene el efecto secundario de que, incluso en condiciones no inductoras, tiene lugar una expresión mínima del gen extraño, es decir, el promotor es permeable hasta cierto punto. En el caso de aumentar la dosis génica de *KIGAL4-1*, este efecto es de nuevo claramente más marcado. En consecuencia, en el caso de proteínas que tienen un efecto dañino para la célula (efecto citopático, ECP) sobre la célula de levadura cuando se expresan de forma heteróloga, la formación de biomasa durante el cultivo, por ejemplo durante un proceso de fermentación por lotes alimentados, puede limitarse masivamente. En especial para estos casos, tienen que encontrarse modos alternativos 30 de mantener lo más baja posible la expresión génica en condiciones no inductoras.

35 Distintas vacunas de subunidades son solo eficazmente efectivas cuando no solo se utiliza una, sino varias subunidades de un patógeno para la vacunación. Mediante la utilización de varias subunidades de antígeno en la vacunación puede aumentarse masivamente además la capacidad de protección cruzada contra distintas variantes de un patógeno. La coexpresión de antígenos iguales o distintos puede usarse también para aumentar de nuevo la concentración de antígenos en la célula de levadura o generar una vacuna que protege contra distintos patógenos.

40 Las cepas comentadas anteriormente son por regla general cepas auxótrofas, que a menudo crecen peor en medio completo que las cepas protótrofas. En consecuencia, una conversión que puede llevarse a cabo rápidamente de cepas de levadura auxótrofas en una forma protótrofa puede llevar a propiedades de crecimiento mejoradas.

Descripción de la invención

45 El objetivo de la invención consistía ahora en proporcionar nuevas cepas de vacuna de *K. lactis* con las que puedan vencerse las desventajas del estado de la técnica. En particular se proporcionarán cepas de *K. lactis* recombinantes que contienen un número de copias limitado del gen *KIGAL4-1*, integrado en un sitio definido en el genoma. Además, se proporcionarán cepas que no permite una expresión de proteínas extrañas o que solo permiten una expresión baja en condiciones no inducidas, que permiten la expresión de varias copias de un antígeno o la expresión de varios 50 antígenos en una célula de levadura, que son más adecuadas para el cultivo y que pueden utilizarse eficazmente para la vacunación protectora contra patógenos. A este respecto se integrarán genes heterólogos que codifican proteínas de eficacias inmunomoduladora (antígenos), en sitios definidos del genoma de *K. lactis*. En la selección de los clones buscados con integración de genes extraños no se utilizarán genes de resistencia como marcadores de selección. Además se generarán cepas protótrofas a través de un procedimiento lo más sencillo posible de cepas auxótrofas. 55 Esto permitirá también la fermentación simplificada de las cepas de vacuna de levadura generadas en medio sintético no complementado.

60 Estos objetivos se consiguieron mediante la provisión de un sistema modular que contiene nuevos vectores y nuevas variantes modificadas genéticamente de la levadura *K. lactis* y que permite la generación de cepas de levadura que están optimizadas en cuanto a las propiedades específicas de los antígenos de proteína. Se logró una clonación eficiente y rutinaria de regiones codificantes de antígenos extraños en el genoma de la levadura mediante un intercambio modular de elementos de ADN entre los vectores, independientemente del gen extraño que se va a expresar. Mediante la integración genómica dirigida de los genes extraños relevantes, las cepas de levadura son estables a lo largo de muchas generaciones y están definidas con exactitud genéticamente. Debido a estas 65 propiedades, los procesos de fermentación son reproducibles en condiciones no selectivas y pueden normalizarse. La optimización de las levaduras *K. lactis* de acuerdo con la invención consistió en controlar la tasa de producción de

proteína de modo que sea lo más alta posible, pero de tal manera que se encuentre por debajo de un umbral en el que los efectos citopáticos de los antígenos perturben masivamente el proceso de fermentación eficiente. Esto se consiguió mediante una intervención genética o una combinación de varias intervenciones genéticas:

- 5 i. el aumento de la concentración del activador de la transcripción inducible por lactosa,
 - ii. el cambio dirigido del promotor de *LAC4*, y/o
 - iii. el aumento escalonado de la dosis génica para el gen extraño que codifica antígenos.
- La optimización de las levaduras de *K. lactis* de acuerdo con la invención consistía además en:
- 10 iv. establecer varios sitios de integración nuevos de cassetes que codifican genes extraños en el genoma de levadura para poder expresar varios antígenos simultáneamente.

En una forma de realización preferida el objetivo de la invención se consigue mediante la provisión de una cepa de *K. lactis* para la clonación dirigida ácidos nucleicos que codifican antígenos extraños en el genoma de levadura de la cepa de *K. lactis*, caracterizada por que la cepa de *K. lactis*, además del locus *KILAC4*, presenta cassetes de expresión integrados en el locus *KIURA3-20* (*KLLAOE22771g*) y/o en el locus *KIMETS-1* (*KLLAOB03938g*) para antígenos extraños. Se prefieren especialmente cuando la cepa de *K. lactis*, además del locus *KILAC4*, presenta cassetes de expresión integrados en el locus *KIURA3-20* (*KLLAOE22771g*) y en el locus *KIMETS-1* (*KLLAOB03938g*) para antígenos extraños. Las cepas de *K. lactis* modificadas de este tipo tienen la ventaja de que se integran genes para la expresión de genes extraños en locus definidos establecidos en el genoma de *K. lactis* y se puede controlar el número de copias de genes extraños. Además, estas cepas de *K. lactis* permiten la integración de distintos genes para la expresión de distintos antígenos extraños en locus definidos en el genoma de *K. lactis*.

Por "antígenos extraños" o "proteínas extrañas" en el sentido de esta invención se entienden todos los péptidos, polipéptidos y proteínas que son adecuados para generar una respuesta inmunitaria, preferiblemente una respuesta inmunitaria protectora, en seres humanos o en un animal contra un patógeno o células carcinogénicamente degeneradas. Las proteínas extrañas pueden proceder de agentes patógenos o tumores de cualquier tipo para los que se hayan caracterizado antígenos que por sí solos sean capaces de inducir una respuesta inmunitaria protectora, preferiblemente una respuesta inmunitaria protectora.

30 En una forma de realización preferida, las proteínas extrañas proceden de agentes patógenos (virus, bacterias, parásitos) para los que se han caracterizado antígenos que por sí solos son capaces de inducir una respuesta inmunitaria protectora, preferiblemente una respuesta inmunitaria humoral protectora.

35 Estos son, por ejemplo:

Proteínas extrañas que proceden de parásitos

40 *Necator americanus; Ancylostoma duodenale*: proteína ASP, proteasas de degradación de hemoglobina
Leishmania: antígeno gp63, de 46 kD *Promastigot LACK*
Plasmodium: proteína CSP, CSA-1, CSA-3, EXP1, SSP2, STARP, SALSA, MSP1, MSP2, MSP3, AMA-1, GLURP, Pfs25, Pfs 28, Pvs25, Pvs 28, Pfs 48/45, Pfs 230
Schistosoma: TP1, Sm23, ShGSTs 26 y 28, paramiosina, *miosina de parásitos, proteínas extrañas Sm14, que proceden de bacterias*
Mycobakterium tuberculosis: Ag85A, Hsp65, R8307, 19 kD, 45 kD, 10,4
Helicobacter pylori: VacA, LagA, NAP, hsp, ureasa, catalasa
Grupo A Streptococcus: M, SCPA Peptidase, exotoxinas SPEA y SPEC, *proteína de unión a fibronectina*
Streptococcus pneumoniae: PspA, PsaA, BHV 3, BHV 4.
Salmonella typhimurium: antígeno Vi
Shigella: LPS
Vibrio cholera: CTB
Escherichia coli ETEC: LT, LT-ST, CTB
Yersinia pestis: F1, V

55 Proteínas extrañas que proceden de células tumorales/tumores (antígenos asociados a tumores, TAA)

CEA
5T4
MUC1
60 MART1
HER-2

Se prefieren especialmente proteínas extrañas que proceden de virus.

65 *Caliciviridae* (Norwalk, HEV): NV 60 kD, ORF2 de HEV
Reoviridae (Rota): VP7, VP4

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

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

Flaviviridae (género Pestivirus BVDV, CSFV, BDV. Género Hepacivirus VHC): E1, E2, E^{RNS} (Pesti), C, NS3, NS4, NS5

5 *Hepadnaviridae* (VHB): antígeno de HBS

Paramyxoviridae (*Paramyxovirinae*: PIV-1, PIV-2, paperas, Sendai, PIV-2, PIV-4, morbillivirus): M, HN, N, F

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

Rhabdoviridae (rabia): G

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

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

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

Papillomaviridae: L2, E6, E7

15 En otra forma de realización de la invención, las cepas de *K. lactis* modificadas se caracterizan por que los casetes de expresión contienen el promotor de *K. lactis LAC4-12* (*PLAC4-12*) o variantes de este promotor, el ORF del antígeno que se va a expresar y el terminador de *AgTEF1*. Esta forma de realización tiene la ventaja de que la expresión de genes extraños bajo el control del promotor *PLAC4-12* tras la integración en el locus *LAC4* y/o *KIURA3* y/o *KIMET5*, se induce de manera aproximadamente igual mediante lactosa.

20 Como se ha descrito anteriormente, existe una correlación positiva entre la concentración de antígenos en cepas de vacuna y la acción inmunogénica de la vacuna de levadura en el organismo diana. Alternativamente, para evitar un ECP en caso de sobreexpresión excesiva, por ejemplo mediante integración de un gen *KIGAL4* adicional, el sistema de vector descrito anteriormente puede modificarse para conmutar rápida y eficientemente varias copias génicas una tras otra e introducir este casete de expresión en una etapa en uno de los tres locus génicos (véanse el Ejemplo 5 y la Figura 7A).

25 En un perfeccionamiento ventajoso de la invención, las cepas de *K. lactis* modificadas contienen por lo tanto, además del locus *KILAC4*, varias copias de una secuencia de ácido nucleico codificante de antígenos extraños en el locus *KIURA3-20* y/o en el locus *KIMET5-1*, que están insertadas a través de casetes de expresión en tandem o múltiples.

30 Estos casetes de expresión comprenden varias copias de las regiones codificantes de antígenos flankeadas por el promotor de *LAC4-12* (*PLAC4-12*) o variantes de este promotor y el terminador de *AgTEF1* (genes). Multiplicando de este modo las copias génicas del antígeno, se puede aumentar significativamente su expresión a través de uno de los locus génicos respectivos.

35 En una forma de realización preferida, que no forma parte de la invención, en el locus *KiLAC4* de la cepa de *K. lactis* está presente el gen del antígeno extraño VP2 de IBDV en forma de un casete de expresión en tandem.

40 Esta cepa de *K. lactis* tiene la ventaja sobre las cepas con una sola copia del gen que codifica para el antígeno extraño VP2 de IBDV de que el antígeno extraño VP2 de IBDV se expresa en mayores cantidades. De manera especialmente preferente, de acuerdo con esta forma de realización de la invención, es la cepa VAK1118 (DSM 32701), que presenta el gen de antígeno extraño VP2 de IBDV en forma de casete de expresión en tandem en el locus *KiLAC4*.

45 Se prefiere además cuando en el locus *KILAC4* y/o en el locus *KIURA3-20* y/o en el locus *KIMET5-1* de las cepas de *K. lactis* de acuerdo con la invención están insertadas una o varias copias de distintos ácidos nucleicos que codifican antígenos extraños a través de casetes de expresión sencillos, en tandem o múltiples. De este modo, pueden expresarse diferentes antígenos extraños en la célula de levadura y estos diferentes antígenos extraños pueden expresarse en diferentes concentraciones. De acuerdo con esta forma de realización se prefiere especialmente una cepa de *K. lactis* en la que en los loci *KILAC4* y *KIURA3-20* de la cepa de *K. lactis* están insertadas y se expresan las secuencias de ácido nucleico codificantes de los antígenos extraños gripe A HA (A/Puerto Rico/8/1934(H1 N1)) y gripe A M1 (A/Puerto Rico/8/1934(H1 N1)). De acuerdo con esta forma de realización de la invención se prefiere especialmente la cepa dVAK1283 (DSM 32697) en la que en los loci *KILAC4* y *KIURA3-20* de la cepa de *K. lactis* están insertadas las secuencias de ácido nucleico codificantes de los antígenos extraños gripe A HA (A/Puerto Rico/8/1934(H1 N1)) y gripe A M1 (A/Puerto Rico/8/1934(H1 N1)).

55 Como se menciona, es conocido que el aumento de la dosis génica de *KIGAL4* puede llevar al aumento de la producción de antígenos (Krieger *et al.* 2012 y documento WO 2013107436). Las desventajas de conseguirlo integrando el plásmido pLI-1 que expresa *KIGAL4* en un proceso de dos etapas se enumeran más arriba. De acuerdo con la invención, estas desventajas se superaron proporcionando una cepa de partida estable para la integración de genes extraños, que contiene una segunda copia del gen *KIGAL4*. Con ello se garantiza que todas las cepas

60 derivadas tengan el mismo fondo genético y que exactamente una copia adicional del gen *KIGAL4* esté presente en estas cepas. Esto reduce la citotoxicidad observada con la expresión de múltiples copias y reduce los pasos de la producción de cepas de vacuna únicamente a una etapa. Además, se incrementa la estabilidad genética al dejar de ser necesaria la integración/escisión reversible del plásmido. La producción de una cepa de este tipo puede llevarse a cabo como se describe en el ejemplo 1.

65 En otra forma de realización ventajosa de la invención se proporciona por lo tanto una cepa de *K. lactis* que además

- 5 del gen *KIGAL4* genómico, contiene también una segunda copia ectópica del gen *KIGAL4*. En esta cepa se puede aumentar la expresión del activador de transcripción de *KIGAL4* como máximo al doble y puede aumentarse de manera definida la expresión de los genes extraños insertados en el locus *KILAC4* y/o el locus *KIURA3-20* y/o el locus *KIMET5-1* a través del promotor de *LAC4-12* o a través de variantes descritas anteriormente de este promotor. En la práctica convencional, se introdujeron plásmidos que codifican *KIGAL4* en la célula de forma transitoria y en un número de copias múltiple e incontrolado. Como resultado, el antígeno extraño se expresaba a menudo en concentraciones tan elevadas que esto provocaba efectos citotóxicos. Los efectos citotóxicos pueden reducirse o evitarse con las cepas de *K. lactis* de esta forma de realización de la invención con alta efectividad. Otros locus génicos a los que se accederá en el futuro con el mismo fin (inserción de un casete de expresión controlado por *LAC4-12*) también pueden ser seleccionados de esta manera. Ha resultado ser ventajoso cuando la copia ectópica del gen *KIGAL4*, que se flanquea por el promotor de *KIGAL4* y el terminador de *KIGAL4*, está integrado en la cepa de *K. lactis* en el sitio génico *KLLA0E13795g* (*Klavt3::KIGAL4-1*, SEQ ID NO: 1). De manera especialmente preferida, pero no forma parte de la invención, de acuerdo con esta forma de realización de la invención, la cepa es VAK1111 (DSM 32696), que presenta estas propiedades.
- 10 15 En otra forma de realización preferida, que no forma parte de la invención, se proporciona una cepa de *K. lactis* en la que en el locus *KILAC4* está presente la secuencia de ácido nucleico codificante del antígeno extraño VP2 de IBDV. De manera especialmente preferida, de acuerdo con esta forma de realización de la invención, la cepa es VAK1171 (DSM 32699). Esta cepa contiene adicionalmente una segunda copia ectópica del gen *KIGAL4*, en el que está presente igualmente la secuencia de ácido nucleico codificante del antígeno extraño VP2 de IBDV. Esta cepa muestra una expresión elevada con respecto a cepas sin copia ectópica adicional del gen *KIGAL4* del antígeno extraño VP2 de IBDV.
- 20 25 30 La producción de proteínas heterólogas en microorganismos es entonces problemática cuando esto lleva a un efecto citopático (ECP). La invención proporciona por tanto un modo de desacoplar la fase de producción de antígenos de la fase de acumulación de biomasa. Mediante el promotor de *LAC4* inducible, esto es parcialmente posible, por ejemplo, mediante un proceso de fermentación de lote *alimentado*, pero es difícil, dado que el promotor *P_{LAC4-12}* no está completamente silenciado (es decir, es permeable en cierta medida) en condiciones no inductoras. En el caso de antígenos con un ECP muy fuerte, esto provoca una reducción de la tasa de crecimiento y una inducción de la respuesta de estrés celular, con efectos perjudiciales sobre la producción de antígenos. La duplicación de la dosis génica de *KIGAL4* y/o el aumento del número de secuencias codificantes de antígenos (véase más adelante) agrava este problema.
- 35 40 45 Un perfeccionamiento ventajoso de las cepas de *K. lactis* de acuerdo con la invención consiste, por tanto, en que las cepas de *K. lactis* presentan una estructura de promotor modificada del promotor de *LAC4-12*, que permite una expresión nula o baja de la proteína extraña en condiciones no inductoras. La estructura modificada del promotor de *LAC4-12*- se caracteriza en particular por que la región de control basal (*basal control region*) (BCR) del promotor de *PLAC4-12* está delecionada entre las posiciones -1065 y -1540 (delección LR2; *PLAC4-12-LR2*; SEQ ID NO: 2) (véase también el Ejemplo 2). Como ya se ha descrito anteriormente, esta forma de realización de la invención presenta la ventaja sobre la práctica convencional de que los efectos citotóxicos, que convencionalmente podrían ser provocados por la expresión excesiva de genes extraños, se reducen o evitan con una alta efectividad. Se prefieren de acuerdo con esta realización las cepas de *K. lactis* en las que en el locus *KILAC4*, está presente la secuencia de ácido nucleico codificante del antígeno extraño gripe A HA (A/Puerto Rico/8/1934(H1 N1)). De manera especialmente preferida, de acuerdo con esta forma de realización de la invención, que no forma parte de la invención, la cepa es VAK1243 (DSM 32702). Esta cepa contiene una delección LR2 en el promotor de *LAC4-12*.
- 50 55 La cepa de *K. lactis* puede presentar también una estructura modificada del promotor de *LAC4-12*, que permite una modulación de la expresión de proteínas extrañas, en donde varía el número de sitios de unión para el activador *KIGal4* del promotor ("secuencias de activación en sentido de 5'" ("upstream activating sequences") 1, 2 y 4, 5) y están presentes o bien 1, 2, 3 o bien 4 sitios de unión de *KIGal4*. De esta manera pueden expresarse distintas proteínas extrañas en concentración diferente (*quality by design*) en una célula de levadura. Las variantes de promotor truncadas son importantes, entre otras cosas, para la modularidad del sistema, por ejemplo para expresar proteínas en la misma cepa en proporciones estequiométricas óptimas, por ejemplo para la formación de *partículas similares a virus* (VLPs) altamente inmunogénicas. Se prefiere de acuerdo con esta forma de realización de la invención cuando en el locus *KILAC4* de la cepa de *K. lactis* está insertada la secuencia de ácido nucleico codificante del antígeno extraño VP2 de IBDV. De manera especialmente preferente, de acuerdo con esta forma de realización, que no forma parte de la invención, la cepa es VAK1131 (DSM 32700). Esta cepa contiene una delección LR2 y una delección de las secuencias de activación en sentido 5' 4 y 5 en el promotor de *LAC4-12*.
- 60 Una parte del objetivo de la invención consistía en proporcionar cepas de *K. lactis* que son más adecuadas para el cultivo. Este problema se resuelve por que en las cepas de *K. lactis* de acuerdo con la invención, la función génica de los alelos *Kllac4*, *Klura3-20* y *Klmet5-1* está restablecida. Las cepas de *K. lactis* resultantes son protótrofas (ejemplo 6, figura 8). La fermentación de las cepas de vacuna se simplifica de este modo, se facilita el establecimiento de los procesos de producción y se hacen más rentables. De acuerdo con esta forma de realización de la invención se prefieren cepas de *K. lactis* en las que en los locus *KILAC4*, *KIURA3-20* y *KIMet5-1* de la cepa de *K. lactis* están insertadas las secuencias de ácido nucleico codificante de los antígenos extraños *ectodomínio E2* de BVDV (tipo 1,

CP7), ectodominio E2 de BVDV (tipo 2, New York 93) y Npro-NS3 BVDV (tipo 1, CP7). De manera especialmente preferida, de acuerdo con esta forma de realización de la invención, la cepa es VAK1400 (DSM 32698). Esta cepa es protótrofa.

- 5 En una forma de realización especialmente preferida la invención se refiere a una cepa de *K. lactis* que se selecciona de las cepas

VAK1283	DSM 32697;
VAK1395	DSM 32706;
VAK1400	DSM 32698.

- 10 Estas cepas se depositaron el 24 de noviembre de 2017 y el 1 de diciembre de 2017 (DSM 32705, DSM 32706) en la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares, GmbH, DSMZ, Inhoffenstrasse 7B, 38124 Braunschweig, Alemania, de conformidad con el Tratado de Budapest con los números indicados anteriormente.

- 15 En otro aspecto, la invención proporciona vectores de expresión integradores, con cuya ayuda se pueden producir las cepas de *K. lactis* de la invención.

- 15 En una forma de realización preferida, que no forma parte de la invención, se proporcionan los vectores de expresión integradores *K/pURA3* (SEQ ID NO: 3) y *K/pMET5* (SEQ ID NO: 4).

- 20 Estos vectores contienen el promotor de *LAC4-12* (*PLAC4-12*) o variantes de este promotor (tal como para las cepas de *K. lactis* descritas anteriormente) inclusive el ORF del antígeno que se va a expresar, además la secuencia de terminador de *AgTEF1* así como secuencias *diana*, que permiten un restablecimiento dirigido de la funcionalidad de los alelos *Klura3-20* o *Kimet5-1* tras la integración. La secuencia codificante de antígenos se clona a través de sitios de corte de restricción definidos entre la secuencia de promotor y de terminador del casete de expresión. Por medio de estos vectores tiene lugar la integración de casetes que expresan genes extraños en el genoma de *K. lactis* de

- 25 manera estable, libre de marcadores y sin aplicación de resistencias a antibióticos. Por consiguiente, los puntos fuertes de este sistema de vectores residen en el hecho de que los genes extraños pueden intercambiarse fácilmente entre los distintos vectores y que los promotores y terminadores de los casetes de expresión pueden sustituirse por otros. El casete de expresión se compone del el promotor *PLAC4-12* y el terminador de *AgTEF1*, así como por el gen extraño intercalado. El gen extraño puede intercambiarse mediante los sitios de corte de restricción *Ascl* y *Notl*. El promotor

- 30 de *PLAC4-12* puede sustituirse en ambos vectores a través de los sitios de corte de restricción *Smal* y *Ascl*, el terminador en *K/pURA3* a través de *Notl* y *Boxl* (o *MluI*) y en *K/pMET5* a través de *Notl* y *Ecl136II* (o *Sacl*). Casetes de expresión alternativos se clonian en *K/pURA3* entre los sitios de corte de restricción *Smal* y *Boxl* (o *MluI*), en *KlpMET5* entre *Smal* y *Ecl136II* (o *Sacl*). Con las enzimas de restricción mencionadas se intercambian los casetes de expresión también entre los vectores *KlpMET5* y *KlpURA3* o se introducen casetes de expresión adicionales. Una

- 35 mejora en comparación con los vectores *Klp3* y *Klp3-MCS* (documento WO 20101054649) consiste en que se selecciona en condiciones no inducidas (sin lactosa), lo que en proteínas con ECP lleva a altas tasas de transformación y suprime un posible enriquecimiento de transformantes con expresión de genes extraños reducidos. Véanse para ello también los ejemplos 3.1 y 3.2.

- 40 En una forma de realización especialmente preferida se proporciona un vector de expresión integrador que se selecciona de *KlpMET5-PLAC4-12-Et*, *KlpMET5-PLAC4-12-LR2-Et*, *KlpMET5-PLAC4-Et*, *KlpMET5-PLAC4-LR2*, así como de *KlpURA3-PLAC4-12-Et*, *KlpURA3-PLAC4-12-LR2-Et*, *KlpURA3-PLAC4-Et* y *KlpURA3-PLAC4-LR2* (SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO 4 en combinación con SEQ ID NO: 5, 6, 7 u 8).

- 45 Los vectores *KlpURA3-PLAC4-12-Et*, *KlpURA3-PLAC4-12-LR2-Et*, *KlpURA3-PLAC4-Et* y *KlpURA3-PLAC4-LR2* son variantes del vector *KlpURA3-Et*, en las que en cada caso está insertada la secuencia de ácido nucleico codificante para la proteína Etx.B-HA. Los vectores *KlpURA3-PLAC4-12-Et*, *KlpURA3-PLAC4-12-LR2-Et*, *KlpURA3-PLAC4-Et* y *KlpURA3-PLAC4-LR2* presentan diferencias en el promotor en comparación con el vector *KlpURA3-Et*. Los vectores *KlpMET5-PLAC4-12-Et*, *KlpMET5-PLAC4-12-LR2-Et*, *KlpMET5-PLAC4-Et*, *KlpMET5-PLAC4-LR2* son variantes del vector *KlpMET5*, en las que en cada caso está insertada la secuencia de ácido nucleico codificante para la proteína Etx.B-HA. Los vectores *KlpMET5-PLAC4-12-Et*, *KlpMET5-PLAC4-12-LR2-Et*, *KlpMET5-PLAC4-Et*, *KlpMET5-PLAC4-LR2* presentan diferencias en el promotor en comparación con el vector *KlpMET5*.

- 55 Otro aspecto se refiere a un procedimiento para la producción de una cepa de *K. lactis* de acuerdo con la invención, que comprende las etapas:

- (i) inserción de la secuencia de ácido nucleico codificante del antígeno deseado en el vector *KlpURA3* o *KlpMET5*,
(ii) transformación de un cultivo de *K. lactis* con la construcción de vector modificado y previamente digerido enzimáticamente,
60 (iii) selección de células de *K. lactis* transformadas con ayuda de un medio sólido, que no contiene uracilo o/y metionina, y
(iv) opcionalmente: restablecimiento de la prototrofia.

- De acuerdo con una forma de realización del procedimiento, las secuencias génicas de varios antígenos pueden insertarse de manera ectópica y expresarse de manera regulada al mismo tiempo. Se prefiere cuando diferentes secuencias génicas se insertan de manera ectópica y se expresan de manera regulada, que codifican para antígenos de distintas variantes de un patógeno. Además se prefiere cuando diferentes secuencias génicas se insertan de manera ectópica y se expresan de manera regulada, que codifican para antígenos de distintos patógenos.
- En otro aspecto, la invención proporciona composiciones farmacéuticas o de medicina veterinaria para la administración parenteral, enteral, intramuscular, mucosa u oral, que contiene una cepa de *K. lactis* de acuerdo con la invención, opcionalmente en combinación con sustancias de soporte y/o auxiliares habituales. En particular la invención se refiere a composiciones farmacéuticas o de medicina veterinaria, que son adecuadas para la vacunación.
- Preferiblemente la composición farmacéutica o de medicina veterinaria comprende al menos un soporte, diluyente, adyuvante y/o sustancia auxiliar fisiológicamente aceptable. Las cepas de *K. lactis* de acuerdo con la presente invención pueden estar contenidas en un soporte farmacéuticamente aceptable, por ejemplo en un medio convencional, tal como un medio salino acuoso o una solución tampón como composición farmacéutica para la inyección. Un medio de este tipo también puede contener sustancias farmacéuticas convencionales, tal como, por ejemplo, sales farmacéuticamente aceptables para ajustar la presión osmótica, tampones, conservantes y similares. Entre los medios preferidos figuran solución salina fisiológica y suero humano. Un medio especialmente preferido es solución salina tamponada con PBS.
- Otros soportes farmacéuticamente compatibles adecuados son conocidos por el experto en la materia por ejemplo en Remington's Practice of Pharmacy, 13^a edición y J. of Pharmaceutical Science y Technology, Vol. 52, n.^o 5, sept.-oct., pág. 238-311.
- Otro aspecto de la invención se refiere al uso de las levaduras de *K. lactis* recombinantes de acuerdo con la invención para la vacunación, tal como por ejemplo para la generación de una inmunización protectora, en particular una inmunización protectora, que está dirigida contra un patógeno.
- Un procedimiento correspondiente para la generación de una inmunización protectora comprende por ejemplo las siguientes etapas:
- cultivo y proliferación de las levaduras recombinantes de acuerdo con la invención,
 - recogida e inactivación de las levaduras,
 - aplicación de las levaduras recombinantes de acuerdo con un esquema de inmunización que se va a establecer,
 - determinación del título de los anticuerpos formados y/o
 - detección de la inmunización.
- El cultivo y proliferación de las levaduras recombinantes de acuerdo con la invención puede tener lugar con cualquier procedimiento disponible convencionalmente. A este respecto se prefieren especialmente procedimientos que llevan de manera rentable a altos rendimientos celulares. Entre estos figuran procedimientos de fermentación, en particular procedimientos de fermentación de alta densidad celular. Se ha demostrado que es especialmente ventajoso llevar a cabo la fermentación según un protocolo de fermentación discontinua.
- En una forma de realización preferida la inmunización protectora se consigue por que las levaduras recombinantes se aplican por vía oral/mucosa, intramuscular o subcutánea.
- Las células de levadura recombinantes se utilizarán inactivadas/muertas en el procedimiento de acuerdo con la invención. Para ello se secan y a continuación se inactivan las levaduras tras el cultivo y la expresión de los genes extraños. La inactivación puede llevarse a cabo con cualquier procedimiento convencionalmente disponible. Para la aplicación en el procedimiento de acuerdo con la invención son especialmente adecuadas la inactivación por calor (por ejemplo inactivación por calor durante 2 horas a 90 °C) o la irradiación y (por ejemplo con 25 o 50 kGy).
- La invención se refiere también a un procedimiento para la vacunación, que comprende la administración de una cepa de *K. lactis* de acuerdo con la invención en un sujeto, por ejemplo un animal o un ser humano, preferiblemente un animal, en una cantidad que es suficiente para desencadenar en el sujeto una respuesta inmunitaria, preferiblemente una respuesta inmunitaria protectora contra uno o varios antígenos extraños.
- Una ventaja es especial que con las cepas de *K. lactis* de acuerdo con la invención, ya tras una aplicación/inmunización única ("one shot") o tras una aplicación/inmunización doble ("prime-boost") se desencadena una respuesta inmunitaria protectora contra un patógeno. Ha resultado una ventaja adicional que con las cepas de *K. lactis* de acuerdo con la invención tras una aplicación/inmunización única ("one shot") o tras una aplicación/inmunización doble ("prime-boost") se puede desencadenar una respuesta inmunitaria de protección cruzada contra distintas variantes de un patógeno. Cuando las cepas de *K. lactis* de acuerdo con la invención portan y expresan distintos genes extraños contra antígenos de distintos patógenos, es incluso posible, tras una aplicación/inmunización única ("one shot") o en una aplicación/inmunización doble ("prime-boost") desencadenar una respuesta inmunitaria protectora contra distintos patógenos.

Resumen de las ventajas de la invención

Las mejoras descritas de la plataforma de *K. lactis* dan como resultado numerosas ventajas:

- 5 a. Se permite una gran simplificación (kit de herramientas listo para usar (*ready to use toolbox/kit*) y una alta reproducibilidad en la construcción de cepas de "vacunas de subunidades" a base de levadura. Estas pueden generarse ahora en un periodo de tiempo corto definido.
- 10 b. Las vacunas de levadura pueden contener uno o varios antígenos; estos pueden producirse, adaptados de manera flexible, en diferentes cantidades.
- c. Además, se permite una fermentación eficiente de las levaduras protótrofas.
- d. Se permite una capacidad de inducción estricta de la producción de proteínas recombinantes. Esto último es especialmente importante para proteínas que pueden desencadenar un ECP. e. La integración genómica estable dirigida de los genes extraños y la estabilidad genética asociada de las cepas ofrece la ventaja de que los procesos de producción son reproducibles.
- 15 Esto es especialmente importante para la producción bajo BPF.
- f. El aumento de la producción de antígeno recombinante conseguido al aumentar las copias del gen extraño y/o la concentración de KIGAL4 mejora la capacidad de protección de la vacuna de levadura.
- 20 g. Con el aumento de la producción de antígeno recombinante que se consigue al aumentar las copias del gen extraño y/o la concentración de KIGAL4 también se puede reducir la dosis de vacuna que hay que administrar. Esto hace que la producción de levadura sea más rentable y mejora la compatibilidad de la vacuna para el vacunado.
- 25 h. Las vacunas de levadura multivalentes pueden utilizarse de manera protectora cruzada o multivalente para la profilaxis contra diferentes variantes del mismo patógeno o contra diferentes patógenos. Aparte de la inactivación y la adición de un adyuvante adecuado o de un volumen de líquido adecuado, no es necesario ningún procesamiento aguas abajo adicional de las levaduras para su uso como vacuna.

La invención se explica en detalle a continuación por medio de los dibujos y ejemplos de realización.

- 30 30 La figura 1 muestra la caracterización de una cepa de base de *K. lactis* recién generada con dos copias de KIGAL4. Se examinó la presencia de la segunda copia de KIGAL4 ectópica en el sitio de integración identificado y se analizó el efecto de la integración sobre el crecimiento de levadura. A: Esquema del sitio de integración de la copia de KIGAL4 ectópica. El sitio de integración está marcado y se indican los nombres de los genes. B: Gel de agarosa de fragmentos amplificados por PCR con los cebadores VK183 (5'-GAGCCACCACCTGCTCCTG-3') (SEQ ID NO: 9) y VK184 (5'-CTGATGTATTGCGCTCCTTACTAAC-3') (SEQ ID NO: 10) del locus KIAVT3 de una cepa de levadura con (VAK1110) y sin (VAK367) adicionalmente gen KIGAL4 ectópico integrado. Los tamaños de fragmento esperados para el caso respectivo están indicados a la derecha en el esquema. C: Prueba de goteo con diluciones de diez veces en serie (inicio-OD 1) sobre glucosa (YPD) o lactosa (YPLac). La incubación tuvo lugar en cada caso a 30 °C y 37 °C. El crecimiento de cepas de levadura se comparó con una copia de KIGAL4 en el locus de gen nativo (VAK1139), en el locus de gen ectópico y KIGAL4 delecionado en el locus de gen nativo (VAK1110), con ninguna copia de KIGAL4 (Δ Kigal4; VAK964) o con dos copias de KIGAL4 (VAK1168). Se muestra que la integración definida de un gen KIGAL4 adicional lleva únicamente a defectos de crecimiento marginales: estos son visibles únicamente a 37 °C y en condiciones inducibles. El defecto de crecimiento es más claro en el caso de la deleción completa de KIGAL4.
- 45 45 La figura 2 muestra el análisis de inmunotransferencia de tipo Western con proteínas de una cepa de *K. lactis* productora de VP2 de IBDV con una copia de KIGAL4 ectópica adicional. El efecto de una copia de KIGAL4 adicional sobre la producción de proteínas recombinantes dependiente del promotor de LAC4-12, se analizó por inmunotransferencia de tipo Western. Como cepa de prueba sirvió una cepa de levadura con un casete de expresión de VP2 de IBDV que se comparó con otras cepas de levadura de VP2 de IBDV. La presencia (+) o ausencia (-) de una copia de KIGAL4 ectópica y de un casete de expresión de VP2 de IBDV en tandem (véase a continuación) se indican anteriormente. En la cepa VAK911 se introdujo la copia ectópica mediante linealización del plásmido pLI-1 por medio de BstEII (Krijger et al. 2012 y documento WO 2013107436), en la cepa VAK1130 fue la copia de KIGAL4 ectópica en el locus KIAVT3 (véase la figura 1). La cepa de levadura VAK367 se incluyó como control de tipo salvaje sin genes extraños. El cultivo de las cepas de levadura tuvo lugar tras cultivo previo en YPD, durante 15 h en YPLac. En cada caso 20 µg del extracto de proteína se analizaron por cepa de levadura por medio de SDS-PAGE. La inmunotransferencia tuvo lugar con suero de conejo anti-IBDV (1:8000) y anticuerpos de cabra anti-conejo conjugados con HRP (1:10.000). VP2 de IBDV multímero (agr.) y monómero (mon.) están marcados a la derecha con flechas, bandas no específicas con asteriscos. Se muestra que la expresión ectópica de un gen KIGAL4 adicional, al igual que la presencia de un casete de expresión en tandem (véase también a continuación) lleva a un aumento masivo de la concentración de antígenos extraños.
- 50 50 La figura 3 ilustra el efecto de la deleción LR2 en el promotor de LAC4-12 sobre producción de proteínas recombinante no inducida y el crecimiento de levadura sobre glucosa. El promotor de LAC4-12 no modificado muestra también en condiciones de no inducción una expresión basal del GOI (gen de interés (*gene of interest*)). Esto es especialmente problemático en antígenos extraños de acción citotóxica. Con estos experimentos se probó si mediante una deleción en la región BC (deleción LR2) del promotor de LAC4-12, se puede reducir o incluso suprimir por completo la protección
- 55 55
- 60 60

65

de proteínas recombinante en condiciones de no inducción. A: Esquema de un promotor de *LAC4-12* (PLAC4-12). La región de control basal (*basal control region*) (BCR), la delección LR2 y los cuatro sitios de unión de KIGal4 (*secuencia de activación en sentido 5'*: U1, U2, U4, U5) así como la secuencia de ácido nucleico codificante del gen extraño (GOI) están marcados. B: Inmunotransferencia de tipo Western de cepas de levadura de VP2 de IBDV, con (VAK1 131) y sin delección LR2 (VAK1130), tras cultivo en condiciones de no inducción (YP 3 % de EtOH). VAK1111 sirvió como control de tipo salvaje sin gen extraño. Por cepa de levadura se cargaron 50 µg de extracto de proteína en un gel de SDS al 12 %. La inmunotransferencia tuvo lugar con suero de conejo anti-IBDV (1:5000) y anticuerpos de cabra anti-conejo conjugados con HRP (1 :10.000). El control de carga K/Nop1 de detectó con anticuerpo de ratón anti-Nop1 (1:5000) y anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con HRP (1 :10.000). C: Prueba de goteo con diluciones de diez veces en serie (inicio-OD 1) sobre YPD, YPD con 0,5 % de glucosa y YPLac. La incubación tuvo lugar en cada caso a 30 °C y 37 °C. Se comparó el crecimiento de las cepas de levadura que portan genes extraños de HA de gripe A en el locus *LAC4*, con (VAK1243) y sin delección LR2 (VAK952). Como control de tipo salvaje sin gen extraño sirvió la cepa de levadura VAK367. Se muestra que la delección LR2 suprimió la expresión de proteínas extrañas basal indeseada. Además, se muestra que la delección de LR2 mejora el crecimiento de una cepa de levadura que expresa una proteína citotóxica (hemaglutinina de la gripe, HA) tanto en condiciones no inductoras como inductoras. Esto es especialmente claro a 37 °C.

La figura 4 muestra los vectores *Klp*, que pueden usarse para la integración de casetes de expresión de proteínas en distintos locus del genoma de *K. lactis*. Mientras que el uso del locus *LAC4* (sistema de vector *Klp3*) ya se ha descrito (documentos WO 20101054649 y WO 2013107436), el uso de los locus *KIURA3* y *KIMETS* es nuevo. A: Esquema de los diferentes vectores *Klp* con su sitio de integración respectivo en el genoma. B y C: Casetes de expresión y extremos flanqueantes en los vectores *KlpURA3* (B) y *KlpMET5* (C) recién descritos en este caso. Las diferentes secciones de secuencia de ADN y sitios de corte de restricción relevantes están marcados. GOI: gen extraño (gen de interés (*gene of interest*)). D: Análisis de inmunotransferencia de tipo Western de la expresión de proteínas extrañas en cepas de levadura construidas con ayuda de vectores *Klp* (A, B y C). El gen extraño es en este sentido Etx.B-HA. La proteína KINop1 constitutiva ("house keeping") de levadura (KLLA0C04389g) se detectó como control de carga. Las cepas de levadura se cultivaron tras cultivo previo en YPD (+U), 4 h en YPLac (+U). Por cepa de levadura se cargaron 30 µg de extracto de proteína en un 12 % de SDS-PAGE. La inmunotransferencia tuvo lugar con anticuerpos de ratón anti-HA (1:5000) y anti-KINop1 (1:5000; Santa Cruz, TX, EE. UU.) monoclonales, así como anticuerpos de cabra anti-ratón conjugados con HRP (1 :10.000; Jackson ImmunoResearch, PA, EE. UU.). Se muestra que ambos locus *KIURA3* y *KIMETS* se pueden usar de manera similar al locus *LAC4* (documentos WO 20101054649 y WO 2013107436), para la expresión génica heteróloga.

La figura 5 muestra la producción de diferentes proteínas recombinantes en la misma cepa de levadura. Esta cepa de levadura (VAK1234) se construyó con los vectores *KlpURA3* y *Klp3-MCS*. Análisis de inmunotransferencia de tipo Western con proteínas de una cepa de levadura que expresa VP2 de IBDV en tandem (véase anteriormente), en las que con ayuda del vector *KlpURA3* se introdujo un casete de expresión adicional, con Etx.B-HA como gen extraño (VAK1234). Como control sirvieron cepas de levadura que portan en el genoma solo el casete de expresión con Etx.B-HA en el locus *LAC4* (VAK899) o *KIURA3* (VAK1235) o solo el casete de expresión de VP2 de IBDV en tandem en el locus *LAC4* (VAK1 171). Tras cultivo previo en YPD se cultivaron las cepas de levadura durante 6 h en YPLac. Por cepa de levadura se cargaron 30 µg de extracto de proteína en un 12 % de SDS-PAGE. La detección de las proteínas en la inmunotransferencia tuvo lugar para Etx.B-HA con anticuerpo de ratón anti-HA (1 :5000; Santa Cruz, TX, EE. UU.) y anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con HRP (1 :10.000) y para VP2 de IBDV con antisuero de conejo anti-IBDV (1 :5000; Granzow *et al.* (1997)) y anticuerpo de cabra anti-conejo conjugado con HRP (1 :10.000; Jackson ImmunoResearch, PA, EE. UU.). Se muestra que ambas proteínas extrañas se expresan en la misma célula de levadura. Sorprendentemente no se limita el nivel de expresión de un antígeno, en la coexpresión de otro antígeno. Esto se ilustra en la comparación del nivel de expresión en cepas monovalentes y bivalentes (véase también la figura 12).

La figura 6 muestra las variantes de promotor de *LAC4-12* inducidas de manera muy diferente para casetes de expresión en vectores *Klp*. Los casetes de expresión de los vectores *Klp* se dotaron con diferentes variantes del promotor de *LAC4-12*. El efecto de las variantes de promotor sobre la intensidad de la inducción de la síntesis de proteína se comprobó analizando cepas de levadura que contenían los casetes de expresión correspondientes con Etx.B-HA como gen extraño. A: Representación esquemática de la variante de promotor, los correspondientes vectores *KlpURA3* con Etx.B-HA como gen extraño y las cepas de levadura creadas a partir de los mismos. BCR: Región de unión de los activadores de la transcripción KICat8 y KISip4, activadores de la transcripción en condiciones no inductoras; U1, U2, U4, U5: regiones de unión para el activador de la transcripción KIGal4 (*secuencia de activación en sentido 5'*). B: Análisis de inmunotransferencia de tipo Western para la caracterización de las variantes de promotor de *LAC4-12* en las cepas de levadura (A) creadas con el vector *KlpURA3*. Las cepas de levadura se cultivaron tras cultivo previo en YPD, 4 h en YPLac. Por cepa de levadura se cargaron 30 µg de extracto de proteína en un 12 % de SDS-PAGE. La inmunotransferencia tuvo lugar con anticuerpo monoclonal de ratón anti-HA (1:5000) y anti-Nop1 (1:5000), así como anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con HRP (1:10.000). Se demuestra que la tasa de expresión del gen extraño varía en función del tipo de promotor usado.

La figura 7 muestra el efecto de duplicar el número de copias de genes extraños utilizando un casete de expresión en tandem sobre la producción de proteínas recombinantes. Se comprobó el efecto en la producción de proteínas

recombinantes (IBDV-VP2) al aumentar el número de copias de genes extraños utilizando un casete de expresión en tandem. A: Representación esquemática del casete de expresión en tandem. Las secciones de ADN y sitios de corte de restricción están marcados. GO: gen extraño (gen de interés (*gene of interest*)). B: Se representa la construcción en tandem derivada de (A) para la integración aleatoria con ayuda de un marcador de selección *ScURA3*. C: Análisis de inmunotransferencia de tipo Western para comparar la producción de proteínas VP2 de IBDV en una cepa de levadura (VAK1118) con un casete de expresión en tandem (A) y una cepa de levadura (VAK910) con un casete de expresión con solo una copia de gen extraño. Las cepas de levadura se cultivaron tras cultivo previo en YPD, 3 h, o 6 h en YPLac. Por cepa de levadura se cargaron 60 µg de extracto de proteína en un 12 % de SDS-PAGE. La inmunotransferencia tuvo lugar con suero de conejo anti-IBDV (1:10.000) y anticuerpos de cabra anti-conejo conjugados con HRP (1:10.000). VP2 de IBDV agregado (agr.) y monómero (mon.) están marcados a la derecha con flechas, bandas no específicas con asteriscos. D: Análisis de tipo Western de cepas de levadura con casete de expresión de VP2 de IBDV en tandem integrado accidentalmente (B) en comparación con una cepa de levadura generada con Klp3-MCS con un casete de expresión (VAK910) así como el derivado de esto con copias de *KIGAL4-1* adicionales (pLI-1). Las cepas de levadura se cultivaron tras cultivo previo en YPD, 8 h en YPLac. La inmunotransferencia tuvo lugar tal como se describe en (b). Se muestra que el uso de un casete de expresión en tandem aumenta significativamente la tasa de expresión de proteínas extrañas.

La figura 8 muestra los fragmentos génicos para restablecer la función génica de los alelos *Klura3-20* y *Kimet5-1* (A). Se representan esquemáticamente los locus de gen y los fragmentos de gen amplificados con los cebadores indicados para *KIURA3* (A) y *KIMET5* (B). Las mutaciones de los alelos *Klura3-20* (A) y *Kimet5-1* (B) reconstruidos con estos fragmentos génicos se muestran como asteriscos debajo de los genes. Los sitios de corte de restricción, con los que se cortaron los fragmentos subclonados, están señalados. Este esquema ilustra la estrategia de generación de cepas de levadura protótrofas que expresan genes extraños en el locus *URA3* o *MET5*.

La figura 9 ilustra en combinación con la tabla 1 y la tabla 2 la inmunización protectora de pollos frente a vvIBDV en un esquema de vacunación de doble clásica. En dos experimentos (A y B) se vacunaron grupos de al menos 16 pollos SPF por vía subcutánea tras un procedimiento *prime-boost* con células de levadura liofilizadas e inactivadas por calor de la cepa de levadura de *K. lactis* de VP2 de IBDV en tandem optimizada genéticamente VAK1127. La primera vacunación tuvo lugar dos semanas tras la eclosión (*prime*), la segunda (*boost*) dos semanas después. Dos semanas tras el *boost* tuvo lugar una exposición (*challenge*) a virus con una cepa de (vv) IBDV muy virulenta (*very virulent* 89163/7.3). Un grupo de sujetos de prueba, que sirvió como control de infección, se sometió a un tratamiento simulado en el que solo se aplicó PBS o adyuvante. En el experimento 1 (A) se aplicó como control también la levadura de tipo salvaje (VAK367). Al menos siete pollos por grupo sirvieron como control sin exposición (*challenge*) a virus; al menos cinco en el experimento 2 (B). Los sueros se recogieron poco antes de la primera aplicación, antes y después de la exposición y, en caso contrario, a intervalos de diez días. La intensidad de la seroconversión se determinó mediante ELISA (ProFLOK IBD Plus, Synbiotics). Se muestran los títulos convertidos según las especificaciones del kit. A: El experimento 2 tuvo lugar tal como el experimento 1 (A). El valor medio de los títulos de ELISA de 12 animales se muestra con desviación estándar. Ambos experimentos muestran un desarrollo masivo de títulos de anticuerpos anti-VP2 de IBDV en los animales vacunados con VAK1127. Las tablas asociadas resumen los resultados de la protección de los animales vacunados contra exposición (*challenge*) con el vvIBDV: en ambos experimentos de vacunación pudo conseguirse una protección completa contra la infección viral.

La Figura 10 muestra el efecto de las modificaciones genéticas para restablecer la prototrofia sobre los niveles de producción de proteínas recombinantes y la inmunogenicidad de una cepa de levadura de VP2 de IBDV en tandem. La cepa de levadura en tandem auxótropa de VP2 de IBDV VAK1127 y la cepa de levadura protótrofa VAK1171 derivada de la misma se compararon en términos de eficacia de la producción de proteínas recombinantes e inmunogenicidad. A: Análisis de inmunotransferencia de tipo Western para determinar el contenido de VP2 de IBDV en material de levadura recién recogido. Las cepas de levadura se cultivaron tras cultivo previo en YPD durante 8 h en YPLac. 40 µg de extracto de proteína por cepa de levadura se cargaron en un 12 % de SDS-PAGE. La inmunotransferencia tuvo lugar con antisuero de conejo anti-IBDV (1:10.000) y anticuerpos de cabra anti-conejo conjugados con HRP (1:10.000). VP2 de IBDV agregado (agr.) y monómero (mon.) están marcados a la derecha con flechas, bandas no específicas con asteriscos. B: Análisis de inmunotransferencia de tipo Western para determinar el contenido de VP2 de IBDV en material de levadura liofilizado, inactivado por calor, que después se utilizó en un estudio de inmunización en ratones BALB/c (C). Tras cultivo previo en YPD se cultivaron las cepas de levadura durante 15 h en YPLac. 10 µg de extracto de proteína se cargaron por cepa de levadura en un 12 % de SDS-PAGE, por lo demás la inmunotransferencia tuvo lugar tal como anteriormente (A) y las bandas están designadas correspondientemente. C: Prueba de inmunogenicidad de las dos cepas de levadura VAK1127 y VAK1171 en el experimento de inmunización en ratones BALB/c. Los grupos de en cada caso cinco ratones se vacunaron tres veces por vía subcutánea con 0,1 mg (peso seco) del material de levadura analizado (B). Como control sirvió una cepa de tipo salvaje (VAK367) sin antígeno. La primera aplicación tuvo lugar con CFA (*adyuvante de Freund completo*) como adyuvante, los otros dos, en intervalos de dos semanas, con IFA (*adyuvante de Freund incompleto*) como adyuvante. Una semana después de la tercera aplicación se sacrificaron los ratones y se extrajo su sangre. Los sueros se analizaron por ELISA de VP2 de IBDV (IDEXX). La absorción a 650 nm, correlacionada con el título de anticuerpos anti-VP2 de IBDV, se muestra con error estándar. Como control positivo para el ELISA sirvió un anticuerpo monoclonal anti-VP2 de IBDV (mab64 pos.), como control negativo se utilizó o bien tampón de muestra (neg. 1), o un anticuerpo no específico (neg. 2). Se muestra que ambas cepas presentan una expresión de proteínas extrañas similar y potencial inmunogénico.

- La figura 11 muestra en combinación con la tabla 3 la inmunización protectora de pollos SPF contra vvIBDV mediante aplicación única subcutánea con levaduras de vacuna de VP2 de IBDV optimizadas genéticamente. Grupos de al menos 18 pollos SPF se vacunaron dos semanas tras la eclosión una vez por vía subcutánea con 10 mg de células inactivadas por calor de la cepa de levadura de *K. lactis* de VP2 de IBDV en tandem optimizada genéticamente VAK1171. Como controles sirvieron animales vacunados con PBS o 10 mg de VAK367. Estos se vacunaron dos veces, dos o cuatro semanas tras la eclosión. La exposición con vvIBDV tuvo lugar en todos los animales seis semanas tras la eclosión. Los sueros se analizaron tal como se describe anteriormente por ELISA (ProFLOK IBD Plus, Synbiotics). Se muestran los títulos de anticuerpos determinados. Los puntos individuales representan títulos de anticuerpo individuales de los doce pollos analizados por grupo, la barra el valor medio con desviación estándar. En los controles se determinó tras la exposición solo el título de anticuerpos de los pollos supervivientes. Se muestra que ya mediante una vacunación de "one shot" con la vacuna de subunidades de levadura VAK 1171, se consigue una protección completa contra una carga posterior con vvIBDV.
- La figura 12 muestra la caracterización de las cepas VAK952 y VAK1283. (A) Las cepas de levadura VAK952 (HA monovalente) y VAK1283 (HA bivalente, M1) se incubaron previamente en el matraz con agitación en YPD y a continuación se indujeron en YPL durante 6 h. Se midió la densidad óptica a 600 nm y se recogieron 30 unidades de OD del cultivo, se digirió el sedimento con microesferas de vidrio y se analizaron las fracciones de proteínas solubles (LF) e insolubles (P, sedimento) mediante inmunotransferencia. Como anticuerpos primarios se usaron α -HA1 o α -M1 y como anticuerpos secundarios α -ratón-IR-Dye800CW. La señal se generó a través de un sistema de obtención de imágenes de infrarrojo (LI-COR Biosciences). (B, C) Las cepas de levadura se incubaron previamente en el matraz con agitación en YPD y a continuación se indujeron durante un periodo de tiempo de 24 h en YPL. En los tiempos indicados, se determinó la densidad óptica del cultivo de levadura y se recogieron 30 unidades de DO. (B) Los sedimentos de VAK1283 se digirieron con perlas de vidrio y se analizaron mediante inmunotransferencia. (C) Los valores medidos para la densidad óptica de VAK952 y VAK1283 se resumieron como una curva de crecimiento en función del tiempo y se promediaron a partir de al menos dos experimentos independientes. (D) Para la prueba puntual, las cepas de levadura se cultivaron en placas de agar nutritivo que contenían YPD durante 48 h a 30 °C. Comenzando con 1 unidad de DO, las levaduras se diluyeron en serie y luego se añadieron gota a gota en placas de agar nutritivo que contenían YPD o YPL. Las placas se cultivaron durante 48 h a 30 °C y luego se fotografiaron. Ponceau S: Coloración de proteína total de levadura de la fracción respectiva, control de carga. Se muestra que VAK952 (HA monovalente) y VAK1283 (bivalente (HA, M1) expresan la proteína HA en cantidades comparables. Además, se muestra que VAK1283 y VAK952 tienen propiedades de crecimiento comparables. con ligeras ventajas en VAK1283.
- La Figura 13 ilustra el título de anticuerpos en el suero de ratones BALB/c después de la inmunización con VAK952 (HA monovalente) y VAK1283 (HA bivalente, M1) antes y después de la infección de carga. Ambas cepas de levadura se preincubaron con YPD en un matraz con agitación y luego se indujeron en YPL durante 12 h (VAK952) o 6 h (VAK1283). A continuación se recogieron los cultivos, se liofilizaron y se inactivó el material de levadura durante 2 h a 90 °C. Para la inmunización se inmunizaron por vía subcutánea ratones BALB/c hembra de 9 semanas de edad con una separación de tres semanas dos veces (*prime-boost*) o una vez (*oneshot*) con 2 mg de levadura (VAK952, VAK1283) o con 1 mg de VAK1283 o dos veces con PBS (sin adyuvante). Como adyuvante se usó AddaVax. Tres o seis semanas después de la última aplicación, los animales fueron tratados con 5x MLD₅₀ infectado por vía intranasal con el virus de la gripe A/PR/8/34 (H1N1). Como control de infección sirvieron animales con infección simulada (imitación (mock)), a los que se aplicó solo PBS sin virus por vía intranasal. Tres o seis semanas después de la última aplicación, así como durante la infección con carga, se extrajo el suero de los animales y se examinó en VNT con respecto a anticuerpos neutralizantes (nAK). Título de nAK₅₀: Dilución de suero, que redujo el número de placas en comparación con el control libre de virus aún en un 50 %. Está indicado el log₂ de la dilución de suero correspondiente. Debido a la gráfica logarítmica, se asociaron muestras de suero sin anticuerpos detectables al valor: log₂(2)=1. mAK: control de sistema de prueba (α -H1 (H37-66)). Se muestra que ambos esquemas de inmunización llevan a una inducción significativa de anticuerpos neutralizantes. Además queda claro que los títulos de anticuerpos anti-HA neutralizantes obtenidos en los experimentos de vacunación de *prime-boost* llevados a cabo, como en los de *one shot* llevados a cabo no se diferencian significativamente en VAK952 y VAK1283.
- La figura 14 muestra la infección de carga con gripe A/PR/8/34 (H1N1) tras inmunización con VAK952 (HA monovalente) así como VAK1283 (bivalente HA, M1). Tres o seis semanas después de la última aplicación (esquema de inmunización, véase la figura 13), los ratones BALB/c fueron tratados con 5x MLD₅₀ infectado por vía intranasal con el virus de la gripe A/PR/8/34 (H1 H1). Como control de infección sirvieron animales con infección simulada (imitación (mock)), a los que se aplicó solo PBS sin virus por vía intranasal. A continuación se examinaron la supervivencia (A), el peso (B) así como síntomas clínicos (C) de los animales a lo largo de un periodo de tiempo de 14 días varias veces al día. Para los síntomas clínicos se estableció una puntuación de 0-4, que se determinó para cada grupo (0: sin irregularidades; 1: pelaje ligeramente desgreñado; 2: pelaje desgreñado, actividad reducida 3: pelaje desgreñado, pérdida de peso corporal del 15 %; 4: pelaje desgreñado, pérdida de peso corporal de >20 %). Se muestra que el procedimiento de inmunización de refuerzo con VAK952 no proporciona una protección óptima contra la carga viral, mientras que este es el caso en VAK1283. El esquema de *one shot* genera con ambas vacunas una protección óptima con 2 mg de vacuna administrada. Con 1 mg administrado, se consigue una tasa de protección similar con VAK1283 que con 2 mg de VAK952 en el procedimiento de cebado-refuerzo.

Ejemplos de realización

Ejemplo 1: Generación de una cepa hospedadora con dos copias de gen *KIGAL4*, integradas de manera estable, en sitios génicos no acoplados

Una segunda copia de gen *KIGAL4* sin marcadores de selección se insertó en otro sitio génico (de manera ectópica). La inserción pudo localizarse mediante secuenciación en el gen *KAVT3* (*KLLA0E13795g*) (*Klavyt3::KIGAL4-1*, SEQ ID NO: 1) (figura 1). La cepa resultante se llama VAK1111. Mediante un experimento de cruce se confirmó la segregación meiótica independiente de las dos copias de *KIGAL4*, que se encuentran en el cromosoma E (copia ectópica) y D (copia genómica). En el mismo experimento se estableció además el número de exactamente dos copias de gen *KIGAL4-1* en el genoma.

Para el uso de VAK1111 para la integración dirigida de un casete de expresión en el locus *LAC4* de manera análoga a VAK367-D4 se introdujo la disruptión *lac4::ScURA3*, que permite en una etapa, con selección del crecimiento en lactosa, integrar el gen extraño deseado por medio de tecnología de vector Klp sin marcadores entre el promotor *LAC4* y el marco de lectura de *LAC4* (Krijger et al. (2012)). La cepa resultante VAK1123 se diferencia de VAK367-D4 únicamente en la segunda copia de gen *KIGAL4* ectópica.

Ejemplo 1.1: Productividad mejorada de una cepa de vacuna de levadura con gen *KIGAL4* integrado adicionalmente.

En un ejemplo de aplicación se insertó el gen IBDV-oVP2_{T2S} (Arnold et al. (2012)) en el locus *LAC4* de la cepa VAK1123 (cepa resultante VAK1130). Pudo establecerse una producción elevada de VP2 de IBDV con respecto a la cepa por lo demás isogénica con solo una copia de *KIGAL4* (VAK910). Como comparación se muestra además la cepa VAK1118, que solo porta un gen *KIGAL4* pero dos copias de CDS *VP2_{IBDV}* (véase a continuación) (figura 2).

Ejemplo 2: Promotor *P_{LAC4-12LR2'}* con actividad basal reducida para la optimización de la expresión de antígenos con efecto citopático.

La producción de proteínas heterólogas en microorganismos es entonces problemática cuando esto lleva a un efecto citopático (ECP). Se planteó por tanto el objetivo de encontrar un modo de desacoplar la fase de producción de antígenos de la fase de acumulación de biomasa. Mediante el promotor de *LAC4* inducible, esto es parcialmente posible mediante un proceso de fermentación de lote *alimentado*, pero es difícil, dado que el promotor *P_{LAC4-12}* no está completamente silenciado en condiciones no inductoras. En el caso de antígenos con un ECP muy fuerte, se provoca una reducción de la tasa de crecimiento y una inducción de la respuesta de estrés celular, con efectos perjudiciales sobre la producción de antígenos. La duplicación de la dosis génica de *KIGAL4* y/o el aumento del número de genes codificantes de antígenos (véase más adelante) agrava este problema. Para resolver esto se delecionó la región de control basal (*basal control region*) (BCR) del promotor *PLAC4-12* (figura 3A) (Mehlgarten et al. (2015)) entre -1065 y -1540 (delección LR2; *PLAC4-12-LR2*; SEQ ID NO: 2). Esta delección se introdujo en las cepas de partida VAK367 (una copia de *KIGAL4*) y VAK1111 (dos copias de *KIGAL4*) en el locus *LAC4* genómico junto con la disruptión *lac4::ScURA3*. Las cepas resultantes VAK1109 y VAK1124 son adecuadas para la expresión de antígenos con ECP. El promotor *PLAC4-12LR2'* se utilizó también en los vectores integradores KlpURA3-Et y KlpMET5-Et (véase a continuación).

Ejemplo 2.1: Inhibición de la expresión de antígenos basal (no inducida) mediante promotores modificados.

Tras la integración de un casete de expresión de VP2 de IBDV en tandem en VAK1124 (cepa de levadura resultante: VAK1131; para explicar el término casete de expresión en tandem véase a continuación y la figura 7) pudo mostrarse que como consecuencia de la delección LR2 en el promotor de *LAC4-12* la producción de proteína VP2 en condiciones de no inducción está inducida de manera masiva (figura 3B). Con cepas que expresan la hemaglutinina de antígeno de la gripe A (VAK952 sin delección LR2, VAK1243 con delección LR2 en el promotor) se puede mostrar que se suprime el efecto citopático del antígeno HA de gripe A y se mejora el crecimiento en condiciones de no inducción mediante la delección de LR2 (figura 3C).

Ejemplo 3: Sistema de vector versátil para la integración dirigida de casetes de expresión múltiple en el genoma de *K. lactis*

La cepa de levadura VAK367 forma, tal como se indicó anteriormente para VAK367-D4 (Krijger et al. (2012), documento WO 20101054649), la base genética de todas las cepas de *K. lactis* descritas en este caso. Esta base de cepa presenta mutaciones en dos genes, *KIURA3* (*KLLA0E22771g*) y *KIMET5* (*KLLA0803938g*), que se denominan alelos *Klura3-20* (par de bases ausente en la posición +345) y *Kimet5-1* (G2555A; y A3682T), un requerimiento de uracilo y metionina (auxotrofia); es decir, los alelos son variantes génicas no funcionales.

Estos alelos mutados se usaron para, además del sitio de integración *LAC4* ya desarrollado con Klp3/Klp3-MCS (Krijger et al. (2012)), usar otros loci para la integración dirigida y generar de este modo cepas de vacuna multivalentes (figura 4A). La selección tiene lugar restableciendo la función genética de estos genes mutados sin la inserción adicional de un marcador de selección. Para ello se crearon nuevos vectores de integración. En estos

vectores los casetes de expresión (en cada caso bajo el control del promotor de *LAC4-12* o sus variantes) se flanquean por secciones génicas que permiten la integración en el sentido de 5' del gen *KIURA3* o en el sentido de 3' del gen *KIMET5* mediante recombinación homóloga y a este respecto restablecen las secuencias de tipo salvaje de estos genes.

5 Mediante mutagénesis y selección de auxotrofia de sustancias de crecimiento alternativas, se pueden desarrollar locus adicionales como sitios de integración.

10 Ejemplo 3.1: Vectores KlpURA3 y KlpMET5 para la integración dirigida de casetes de expresión (con promotor de *LAC4-12* inducible) en los locus *KIURA3* (*KLLAOE22771g*) y/o *KIMET5* (*KLLAOB03938g*) de cepas de *K. lactis* con el alelo *Klura3-20* o *Klmet5-1*.

15 Por medio de fragmentos génicos adecuados (secuencias de selección como diana *KIMET5/KIURA3*), que permiten un restablecimiento dirigido de la funcionalidad de los alelos *Klura3-20* o *Klmet5-1*, se construyeron los vectores de expresión integradores KlpURA3 (SEQ ID NO: 3) y KlpMET5 (SEQ ID NO: 4).

20 El vector de expresión KlpMET5 contiene el casete de expresión que se compone del promotor de *LAC4-12* ($P_{LAC4-12}$ o sus variantes), la secuencia de ácido nucleico codificante del antígeno que se va a expresar así como el terminador de *AgTEF1*; esta se flanquea en el sentido de 5' por el fragmento *KIMET5* genómico con terminador de *ScCYC1* incorporado y en el sentido de 3' por el promotor de *KIAIM18* con gen *KIAIM18* posterior.

25 El vector de expresión KlpURA3 contiene el casete de expresión que se compone del promotor de *LAC4-12* ($P_{LAC4-12}$ o sus variantes), la secuencia de ácido nucleico codificante del antígeno que se va a expresar así como el terminador de *AgTEF1*; esta se flanquea en el sentido de 5' por *KLLAOE22749g* con promotor asociado y en el sentido de 3' por el promotor de *KIURA3* con fragmento *KIURA3* posterior (figura 4B, C).

30 La secuencia codificante de antígenos se clona en cada caso a través de los sitios de corte *Ascl* y *NotI* entre promotor y terminador. Mediante restricción con *Eco91I* o *KpnI* del plásmido resultante se separa todo el casete de expresión de la estructura principal de vector KlpURA3, con *HindIII* o *BoxI* de la estructura principal de KlpMET5 y el inicio de restricción en cepas hospedadoras de *K. lactis* se transforma con el alelo *Klura3-30* y/o *Klmet5-1*. Es decir, el casete de expresión integrado en *KIURA3-20* o *KIMET5-1* con gen extraño corresponde exactamente aquel que también puede integrarse en VAK367-D4 con el vector Klp3-MCS en *LAC4* (documento WO 20101054649). La comprobación de transformantes protótrofos de uracilo o metionina tiene lugar convencionalmente a través de PCR de la colonia con los cebadores MAB6 y VK211 para *KlpMET5*, o los cebadores MAB6 y VK71 para transformantes de KlpURA3. En la integración del casete de expresión en el sitio diana correcto entre *KIURA3* o *KIMET5* y el gen adyacente respectivo, resultan productos con el tamaño de 1652 pb para transformantes de KlpMET5 o 1307 pb para transformantes de KlpURA3. No se obtuvo evidencia de que la inserción afectara la funcionalidad de los genes vecinos.

Cebador:

40 MAB6: 5'-CCCAGATGCGAAGTTAAGTG-3' (SEQ ID NO: 11)
VK71: 5'-TACAACAGATCACGTGATCTTTTGTAAG-3' (SEQ ID NO: 12)
VK211: 5'-GATTCGTAACCCTATTGTTCATGAATG-3' (SEQ ID NO: 13)

45 Ejemplo 3.2: Expresión de un gen extraño tras la integración del casete de integración codificante en el locus *KIURA3* o *KIMET5*.

50 Un gen extraño bajo el control del promotor $P_{LAC4-12}$ se induce aproximadamente en la medida por lactosa tras la integración en el locus *LAC4*, *KIURA3* y *KIMET5*. La subunidad B termolábil, no tóxica, de la enterotoxina (Etx.B) de *E. coli* y un epítopo de (HA)₃ en el extremo C terminal (Etx.B-HA), sirvió como proteína de prueba para la evaluación del sistema de vector. La secuencia codificante se clonó en los vectores KlpMET5, KlpURA3 y Klp3-MCS y se integró en los locus génicos *KIMET5* (VAK1251), *KIURA3* (VAK1235) y *LAC4* (VAK899) (figura 4D). Como se muestra mediante inmunotransferencia de tipo Western, la concentración de la proteína Etx.B-HA es muy similar en las tres cepas (figura 4D). Por consiguiente, no pudo observarse ningún efecto de posición, en función del sitio de integración del casete de expresión en el genoma, sobre la cantidad de producción de proteínas recombinantes.

Ejemplo 3.3: Coexpresión de dos antígenos extraños en la misma célula de levadura.

60 La posibilidad de producir a través del nuevo sistema de vector distintas proteínas heterólogas bajo el control del promotor $P_{LAC4-12}$ en la misma cepa de levadura, pudo mostrarse mediante la construcción de una cepa de levadura con un casete de expresión de Etx.B-HA en el locus *KIURA3* y un casete de expresión en el locus *LAC4* con dos copias de VP2_{IBDV}, que se encontraban como tándem (VAK1234; figura 5; para explicación del casete en tandem, véase a continuación y la figura 7). Con respecto a las cepas de levadura en la que estaba presente en cada caso solo uno de los casetes de expresión en el genoma (VAK1235 o VAK1171) pudo establecerse en VAK1234 ninguna reducción de la concentración de proteína de Etx.B-HA o VP2_{IBDV}.

Ejemplo 4: Variantes de promotor de *LAC4* para la modulación de la síntesis de proteína recombinante en condiciones de inducción similares.

5 La acción inmunogénica de los antígenos se basa a menudo en el ensamblaje de varias proteínas en relación no estequiométrica. Para permitir esto en vacunas basadas en levadura, se generaron variantes del promotor $P_{LAC4-12LR2'}$ (figura 6A), que se pueden inducir fuertemente mediante lactosa o galactosa. Se caracterizan por el número de sitios de unión para el activador KIGal4 (U1, U2, U4, U5; Gödecke et al. (1991)) y la presencia o ausencia de la región de control basal BCR. Además de las construcciones mostradas en la figura 3A, que se utilizaron en el vector KlpURA3, mediante inserción de otros sitios de unión pueden generarse otras variantes de promotor con intensidad de promotor elevada. De este modo se generan promotores sintéticos inducibles por lactosa para ampliar el sistema de vector y pueden realizarse diferentes tasas de producción de proteína o de expresión génica en las mismas condiciones de inducción.

10 Ejemplo 4.1: Expresión de un antígeno extraño bajo el control de distintas variantes de promotor de LAC4

15 Expresión de Etx.B-HA bajo el control de cuatro variantes de promotor de *LAC4-12*. Se sometieron a prueba cuatro variantes de promotor *LAC4* que se diferencia en el número de sitios de unión para el activador de transcripción KIGal4 así como la presencia/ausencia de una región de control para la expresión basal en condiciones de no inducción (*basal control region*, (región de control basal) BCR; figura 6A; SEQ ID NO: 14). Con estos se generaron las variantes del vector KlpURA3-Et KlpURA3-PL412-Et, KlpURA3-PL412LR2-Et, KlpURA3-PL4-Et y KlpURA3-PL4LR2 y se insertó en cada caso la proteína Etx.B-HA como GOI de prueba. La inserción de GOI alternativos es posible, como se ha descrito anteriormente, a través de los sitios de corte *Ascl* y *NotI*. Los casetes de expresión se integraron en el locus *KIURA3* y la concentración de proteína de Etx.B-HA se cuantificó a través de inmunotransferencia de tipo Western (figura 6B). Se muestra que en condiciones de inducción idénticas (4 h en medio completo con lactosa) la variante de promotor más larga $P_{LAC4-12}$, que comprende la región intergénica completa entre los genes *LAC4* y *LAC12* y contiene cuatro sitios de unión de KIGal4 (U1, U2, U4, U5) (Gödecke et al. (1991)), lleva a la concentración de proteína más alta. Cuando solo están presentes los dos sitios de unión de *LAC4* U1 y U2 proximales (-1064 a -10), la delección adicional de la BCR (-1540 a -1065) actúa también como reductora de proteínas en condiciones inducibles.

20 Ejemplo 5: Aumento de la producción de antígeno mediante aumento del número de copias del gen que codifica antígenos.

25 Se modificó por tanto el sistema de vector descrito anteriormente para conectar rápidamente y de manera eficiente varias copias génicas una tras otra e introducir este casete de expresión en una etapa en uno de los tres loci génicos (figura 7A). Para la producción de un casete de expresión en tandem que puede introducirse en el locus *LAC4* se fusionan en una etapa por una matriz cualquiera Klp3-(MCS)-GOI tres fragmentos amplificados por PCR (clonación en fusión (*en-Fusion Cloning*)): (1 y 2) casete de expresión con $P_{LAC4-LR2}$ y T_{TEF} (cebador: VK30 y VK31, o VK32 y VK33) y (3) secuencia de selección como diana (*targeting sequence*) de *LAC4* (VK34 y VK35)). Tras restricción, por ejemplo con *Hpal*, se puede integrar el casete de expresión en tandem, como se ha descrito, en el locus *lac4::URA3* (figura 7). Tras efectuarse la integración del casete de expresión se regula la primera copia de gen extraño en función de la cepa inicial o bien mediante o $P_{LAC4-12-LR2}$ y la segunda mediante $P_{LAC4-LR2}$. Como alternativa se genera mediante inserción de un marcador de selección entre los dos casetes de expresión en los sitios de corte *SmlI*, *MluI* o *PmeI* y separación de la secuencia de selección como diana (*targeting sequence*) de *LAC4* a través de *KpnI*, un casete en tandem, que puede integrarse en el genoma a través de NHEJ de manera no dirigida. Si se recorta el casete de expresión con *MreI* y *ApaI*, los extremos compatibles puede ligarse y de este modo generarse casetes de expresión múltiple largos. Mediante nueva restricción con *MreI* y *ApaI* se enriquecen en la mezcla de ligación fragmentos en los que los casetes de expresión están dispuestos en tandem (cabeza en cola). Estos se transforman y se integran de manera no dirigida con selección del marcador.

30 Ejemplo 5: Cebador:

35 VK30:

5'-

40 TATAGGGCGAATTGGAGCTCCGCCGGCGGAAGAGGTAAACGCCTTTGTTAAC-3' (SEQ ID NO: 15)

45 VK31: 5'-CTAACCGGAACTCGCATTAAATCTCGTTTCGACACTGGATGG-3' (SEQ ID NO: 16)

VK32:

5'-

46 GCGAGTTCCGTTAGACCGCGTTAAACTTGTAAATTATTATGGGGCAGGCGAG

50 A-3' (SEQ ID Nr.: 17)

55 VK33: 5'-CGGGGAATGCGCTGCTTTCGACACTGGATGGCGCGTTA-3' (SEQ ID NO: 18)

VK34: 5'-GCAGCGCATTCCCCGGGTACCGCTCTCGACTAGGGTAGTGCG-3' (SEQ ID NO: 19)

VK35: 5'-AAAAGCTGGTACCGGGCCCCTAGTCGAGAGTTAACCGTGACTACAGCTA-3' (SEQ ID NO: 20)

Ejemplo 5.1: Aplicación satisfactoria de la estrategia de múltiples copias.

La estrategia se confirmó con VP2 de IBDV como antígeno y un casete de expresión derivado de Kl_p3 que contiene dos secuencias que codifican VP2 de IBDV (*CDS-VP2_{IBDV}*) en tándem. El casete de expresión de VP2 de IBDV en tándem (figura 7A) en el vector Kl_p3 (plásmido Kl_p3-tándem-oVP2T2s, SEQ ID NO: 21) se compone de dos secuencias codificantes reguladas por promotor de *LAC4* para VP2/IBDV (*CDS-VP2_{IBDV}*) de Kl_p3-MCS-oVP2T2s (Arnold *et al.*, (2012)). Las secuencias de promotor se componen de la región -1123 a -10 del promotor de *LAC4* para la primera copia y -1099 a -10 para la segunda copia. Ambas *CDS-VP2_{IBDV}* están flanqueadas en el extremo 3' de un terminador de *AgTEF1*. El plásmido Kl_p3-tándem-oVP2T2s se cortó con *Hpa*I y se transformó el inicio de restricción en la cepa VAK367-D4. La cepa de levadura VAK1118 así generada contiene el casete de expresión en tándem integrado en el locus *LAC4*. Como se muestra mediante inmunotransferencia de tipo Western, está presente una mayor concentración de proteína VP2 de IBDV en esta cepa con respecto a la cepa isogénica con solo una copia (figura 7B). El casete de expresión en tándem es muy estable genéticamente: Tras crecimiento a lo largo de 78 generaciones en medio de inducción (YNB + lactosa), menos de 100 colonias sometidas a prueba mediante PCR no mostraron un cambio genético del casete de expresión (datos no mostrados).

Ejemplo 6: Herramientas para la producción de una prototrofia en cepas de *K. lactis* para la fermentación simplificada en medio sintético y medio completo.

En estudios realizados, se había mostrado que cepas de levadura auxótrofas de uracilo en medio completo crecen peor que cepas protótrofas de uracilo, un efecto que pudo compensarse solo en parte mediante la adición de uracilo. Para simplificar la fermentación de las cepas de vacuna, facilitar el establecimiento de los procesos de producción y hacerlos más rentables y evitar efectos de crecimiento por absorción insuficiente de metionina y/o uracilo, se encontrarán por tanto modos para conseguir de manera rápida y reproducible la compensación de estas auxotrofias necesarias para la construcción de cepas. Para la reconstrucción de *KlURA3* a partir de *Klura3-20* se genera con ayuda del cebador VK67 y VK69 y el gen *KlURA3* de tipo salvaje como matriz un fragmento de ADN a través de PCR (figura 8A). Para la reparación del alelo *Klmet5-1* se genera de manera análoga un fragmento de PCR con ayuda del cebador VK74 y VK75 y el alelo de tipo salvaje *KIMET5* como plantilla (figura 8B). La transformación de los fragmentos de PCR en las cepas mutadas correspondientes (individual o conjuntamente) y selección de medio sin metionina y/o sin uracilo llevó de manera muy eficiente a la reconstrucción de los alelos de tipo salvaje. Este proceso se llevó a cabo, entre otras cosas, para la generación de las cepas VAK1171 y VAK1400 (véase anteriormente).

Cebador

VK67: 5'-GACATCACTGTCTTCCCCTTAATGATC-3' (SEQ ID NO: 22)
 VK69: 5'-TCAGCAAGCATCAATAATCCCCCTGGTTC-3' (SEQ ID NO: 23)
 VK74: 5'-GAAAGAAAGACGTTGGTCTACGTTG-3' (SEQ ID NO: 24)
 VK75: 5'-AGATTATAAGTTCCCTGGGGCTTACCCAC-3' (SEQ ID NO: 25)

Ejemplo 7: Inmunización protectora mediante levaduras de vacuna inactivadas optimizadas

Las modificaciones y optimizaciones realizadas de acuerdo con los ejemplos 1 a 5 de la plataforma de vacunas de *K. lactis* se validaron en distintos estudios de vacunación.

Ejemplo 7.1: Inmunogenicidad de una plataforma de *K. lactis* optimizada, en el ejemplo de una cepa de levadura de VP2 de IBDV (VAK1127).

La cepa VAK1127 contiene un casete de expresión de VP2 de IBDV en tándem (SEQ ID NO: 21), dos copias de *KIGAL4* y la delección LR2 en el promotor de *LAC4*. Para la caracterización de la inmunogenicidad de la cepa de levadura se llevaron a cabo ensayos de inmunización en el organismo diana, pollo. En los experimentos de exposición (*challenge*), se consiguió una protección completa de pollos SPF contra la cepa de IBDV altamente virulenta (vv) 89163/7.3 (AFSSA, Ploufragan, Francia), que fue bien caracterizada por Eterradosi y colaboradores (1997) (Tablas 1 y 2). En los dos ensayos llevados a cabo independientemente se aplicó para ello dos veces (figura 9A y B), por vía subcutánea 1 mg de levadura liofilizada, inactivada por calor (2 h, 90 °C) (VAK1127) con adyuvante de Freund incompleto (IFA) (prime-boost). Las aplicaciones tuvieron lugar dos semanas y cuatro semanas tras la eclosión, la carga viral (exposición (*challenge*)) seis semanas tras la eclosión. Tras 19 días en los animales vacunados con VAK1127 son ya medibles altos títulos de anticuerpos anti-VP2 de IBDV. En los controles aparecen títulos de anticuerpos anti-VP2 de IBDV solo después de exposición (*challenge*) con vvIBDV (figura 9). En ambos experimentos se observó una protección completa (0 % de morbilidad, 0 % de mortalidad) de los animales vacunados con VAK1127 contra la exposición (*challenge*) con vvIBDV (tabla 1 y 2). Con estos experimentos pudo observarse en un procedimiento de vacunación prime-boost clásico una protección contra vvIBDV con una vacuna de subunidades.

La inmunogenicidad de las levaduras de vacuna no se ve afectada por la mutación genética inversa a cepas de levadura protótrofas portadoras de antígeno. Esto se demostró con ayuda de las formas auxótrofas o protótrofas de una cepa de levadura de VP2 de IBDV en un experimento de vacunación de ratones (figura 10C). La cepa de levadura

VAK1127 (auxótrofa) fue prototrofizada en dos etapas con fragmentos de PCR para producir VAK1171, como se ha descrito anteriormente (ejemplo 6; figura 8). Ambas formas de cepa no muestran diferencias significativas en el nivel de expresión de proteína recombinante (figuras 10A y B). Los ratones fueron inoculados por vía subcutánea tres veces a intervalos de dos semanas con 0,1 mg de levadura inactivada por calor por vía subcutánea con IFA. No se detectaron diferencias en la fuerza de seroconversión entre la cepa auxótrofa tBDV-VP2 (VAK1127) y el derivado protótrofo (VAK1171) (figura . 10C).

Ejemplo 7.2: Protección completa mediante vacunación en un esquema de "one shot".

Una vacunación "one shot", es decir, vacunación mediante aplicación única de la vacuna, no es eficaz con vacunas de *subunidades* normalmente debido a falta de inmunogenicidad. Sin embargo, los datos sobre el desarrollo de los títulos de anticuerpos obtenidos con la cepa VAK1127 optimizada en el procedimiento de *prime/boost* (figura 9) indicaron la posibilidad de obtener también protección en un enfoque de *one shot*. Para comprobarlo, se llevó a cabo una vacunación de *one shot* con la cepa de levadura protótrofa VAK1171 (figura 11; tabla 3). Para ello se aplicó la levadura solo una vez, para ello en dosis elevadas (10 mg), y se llevó a cabo entonces una exposición (*challenge*) con una separación de 4 semanas. Se demostró que el VAK1171 con "one shot" se puede realmente conseguir una protección completa contra vvIBDV (0 % de morbilidad, 0% de mortalidad) (tabla 3). Este resultado se debió al desarrollo de títulos elevados de anticuerpos protectores aproximadamente 20 días después de la vacunación (figura 11). El hecho de que el esquema de vacunación *one shot* sea altamente protector contra el vvIBDV demuestra el fuerte potencial inmunogénico de la vacuna utilizada y valida de manera impresionante la plataforma de vacuna optimizada.

Ejemplo 7.3: Protección mejorada de una vacuna bivalente de levadura contra las infecciones por el virus de la gripe A en comparación con una vacuna monovalente de levadura.

Se generaron tres cepas de vacuna diferentes para la vacunación contra el virus de la gripe tipo A. En primer lugar, se generó VAK952 (DSM 32705), que expresa el antígeno principal de una cepa de gripe A (Puerto Rico/8/1934; PR8/34), el gen HA (hemaglutinina). El gen está integrado en VAK952 de la manera descrita por Krijger *et al.* (2012) y Arnold *et al.* (2012) en el locus LAC4 en el genoma. En segundo lugar se generó VAK1283 (DSM 32697). En este caso, además del gen de HA de PR8/34 en el locus LAC4, el gen M1 también está integrado en el locus URA3. El gen M1 codifica otro antígeno importante de la gripe A que está significativamente más conservado que la HA. Informes publicados anteriormente han demostrado que la inmunogenicidad de una vacuna contra la gripe A puede aumentar y que se puede conseguir una protección cruzada contra varios virus de la gripe combinando ambos antígenos. Para validar también este aspecto con una vacuna bivalente de levadura, se generó otra cepa (VAK1395; DSM 32706) que también contiene el gen M1 en el locus URA3 y en la que el gen HA de PR8/34 se sustituye por el gen HA del virus de la gripe California/4/2009. Se comprobó la expresión comparable de HA o la expresión adicional de M1 de las cepas respectivas; igualmente se mostró que las cepas presentan un crecimiento comparable, con ligeras ventajas en VAK1283 con respecto a VAK952 (figura 12). En estudios de vacunación, en los que se empleó en cada caso un esquema de *prime-boost* o *one shot* con diferentes concentraciones de levadura en el modelo de ratón, se mostró que VAK952 y VAK1283 inducen en cada caso títulos comparables de anticuerpos neutralizantes de virus (figura 13). En el experimento de exposición (*challenge*) se aclara entonces que la vacuna de VAK1283 bivalente tanto en el esquema de *prime-boost* como en el esquema de *one shot* permite una protección máxima, mientras que este no es el caso con la vacuna de VAK952 monovalente. Además, se consiguió un efecto protector similar con la vacuna VAK1283 en el experimento de un solo disparo en la mitad del material de levadura utilizado que con VAK952 en el enfoque *prime-boost* (figura 14 y tabla 3). En los experimentos en los que se utilizó VAK1395 como vacuna, también se observó protección frente a la gripe PR8/34. Con ello se consiguió con una vacuna de levadura bivalente una protección cruzada contra distintas variantes de gripe.

Indicaciones para una producción de carga en pollos SPF vacunados

Tabla 1

Vacunación (a)	Lesiones de la bursa histopatológicos					índice bur/bod (c)					
	Valoración										
cepas de levadura (VAK)	cantidad de VP2 por dosis de vacunación	Adyuvante	0	1	2	3	4	con carga	sin carga	morbilidad (%) (d)	mortalidad (%) (e)
367	sin	IFA	-	-	-	1	7	2,80 ± 1,32	5,36 ± 0,65	6/10 (60)	4/10 (40)
	4,1 ± 0,25 µg	IFA	8	-	-	1	-	4,40 ± 0,76	4,89 ± 0,63	0/10	0/10
	-	PBS	-	-	-	-	10	4,08 ± 1,91	4,92 ± 0,94	10/10 (100)	8/10 (80)

Indicaciones para una producción de carga en pollos SPF vacunados

Tabla 2

Vacunación (a)	Lesiones de la bursa histopatológicos					índice bu/bod (c)					
	Valoración										
cepa de levadura (VAK)	cantidad de VP2 por dosis de vacunación	Adyuvante	0	1	2	3	4	con carga	sin carga	mortalidad (%) (d)	mortalidad (%) (e)
1127	4,1 ± 0,71 µg	IFA	6	-	-	-	-	5,10 ± 0,78	4,81 ± 1,20	0/9 (0)	0/9 (0)
-	PBS	IFA	-	-	-	-	8	4,09 ± 1,87	5,32 ± 0,85	9/9 (100)	7/9 (78)

Indicaciones para una producción de carga en pollos SPF vacunados

		Vacunación (a)					Lesiones de la bursa histopatológicos			índice bu/bod (c)	
		Valoración									
		0 1 2 3 4					con carga sin carga			mortalidad (%)	
cepa de levadura (VAK)	cantidad de VP2 por dosis de vacunación	Adyuvante	0	1	2	3	4	con carga	sín carga	mortalidad (%) (d)	mortalidad (%) (e)
PBS	sin	MF59	-	-	-	-	9	3,73 ± 1,92	4,77 ± 1,02	9/9 (100)	6/9 (66)
VAK367	sin	MF59	-	-	-	-	10	4,09 ± 1,58	3,60 ± 0,89	10/10 (100)	9/10 (90)
VAK1171	35 ± 4,2 µg	IFA	10	-	-	-	-	4,48 ± 0,37	3,96 ± 1,02	0/10 (0)	0/10 (0)

Explicaciones sobre la tabla 1

- 5 (a) Los pollos se vacunaron dos semanas tras la eclosión por vía subcutánea con 1 mg de levadura (o PBS) y IFA como adyuvante. Dos semanas tras la vacunación se *reforzaron* de la misma manera. Otras dos semanas más tarde tuvo lugar la prueba de carga viral *a través de la ruta oculonasal* con 10^4 EtD vvIBDV (muy virulento 89163/7.3). Se utilizó levadura completa inactivada de la cepa VAK1127 como levadura de vacuna, y un grupo inoculado solo con PBS e IFA sirvió como control de la infección. Como control para el efecto de la levadura sola funcionó un grupo, en el que se aplicó levadura de tipo salvaje sin antígeno (VAK367).
- 10 (b) La valoración de la lesión de la bursa histopatológicos tuvo lugar con una escala de 0-4: 0: sin lesiones; 1: 5-25 % de los folículos afectados; 2: 26-50 % de los folículos afectados; 3: 51-75 % de los folículos afectados; 76-100 % de daño en la bursa (pérdida estructural)
- 15 (c) El valor medio del índice de la bursa con respecto al peso corporal (bu/bod) se calculó con la fórmula: (peso de la bursa/peso corporal)*1000. El grupo de control no cargado se componía de al menos siete pollos, el grupo cargado de diez. La desviación estándar está indicada.
- (d) La morbilidad está representada como número de pollos enfermos por número de pollos del grupo en total. El porcentaje de pollos enfermos se muestra entre paréntesis.
- (e) La mortalidad está representada como número de pollos muertos por número de pollos del grupo en total. El porcentaje de pollos muertos se muestra entre paréntesis.

20 Explicaciones sobre la tabla 2

- 25 (a) Los pollos se vacunaron dos semanas tras la eclosión por vía subcutánea con 1 mg de levadura (o PBS) y IFA como adyuvante. Dos semanas tras la vacunación se *reforzaron* de la misma manera. Otras dos semanas más tarde tuvo lugar la prueba de carga viral *a través de la ruta oculanasal* con 10^4 EtD vvIBDV (muy virulento 89163/7.3). Se utilizó levadura completa inactivada de la cepa VAK1127 como levadura de vacuna, y un grupo inoculado solo con PBS e IFA sirvió como control de la infección.
- (b) La valoración de la lesión de la bursa histopatológicos tuvo lugar con una escala de 0-4: 0: sin lesiones; 1: 5-25 % de los folículos afectados; 2: 26-50 % de los folículos afectados; 3: 51-75 % de los folículos afectados; 76-100 % de daño en la bursa (pérdida estructural).
- 30 (c) El valor medio del índice de la bursa con respecto al peso corporal (bu/bod) se calculó con la fórmula: (peso de la bursa/peso corporal)*1000. El grupo de control no cargado se componía de al menos cinco pollos, el grupo cargado de nueve. La desviación estándar está indicada.
- (d) La morbilidad está representada como número de pollos enfermos por número de pollos del grupo en total. El porcentaje de pollos enfermos se muestra entre paréntesis.
- 35 (e) La mortalidad está representada como número de pollos muertos por número de pollos del grupo en total. El porcentaje de pollos muertos se muestra entre paréntesis.

Explicaciones sobre la tabla 3

- 40 (a) Los pollos se vacunaron dos semanas tras la eclosión por vía subcutánea con 10 mg de levadura (o PBS) y IFA como adyuvante. Cuatro semanas más tarde tuvo lugar la prueba de carga viral *a través de la ruta oculanasal* con 10^4 EtD vvIBDV (muy virulento 89163/7.3). Levadura completa inactivada de la cepa VAK1171 se usó una vez como levaduras de vacunación. Como control de infección sirvió por un lado un grupo, que se vacunó solo con PBS y MF59, así como un grupo que se vacunó con levadura de tipo salvaje y MF59, a ambos se administró dos semanas tras la primera vacunación un refuerzo (*boost*) con la misma cantidad de levadura, o PBS.
- 45 (b) La valoración de la lesión de la bursa histopatológicos tuvo lugar con una escala de 0-4: 0: sin lesiones; 1: 5-25 % de los folículos afectados; 2: 26-50 % de los folículos afectados; 3: 51-75 % de los folículos afectados; 76-100 % de daño en la bursa (pérdida estructural).
- (c) El valor medio del índice de la bursa con respecto al peso corporal (bu/bod) se calculó con la fórmula: (peso de la bursa/peso corporal)*1000. Cada grupo se componía de al menos nueve pollos. La desviación estándar está indicada.
- 50 (d) La morbilidad está representada como número de pollos enfermos por número de pollos del grupo en total. El porcentaje de pollos enfermos se muestra entre paréntesis.
- (e) La mortalidad está representada como número de pollos muertos por número de pollos del grupo en total. El porcentaje de pollos muertos se muestra entre paréntesis.

Secuencias

60 La solicitud de patente contiene las siguientes secuencias como parte constituyente de la descripción:

SEQ ID NO:	Denominación
1	<i>K. lactis</i> avt3::LAC9
2	PLAC4-12-LR2
3	vector <i>KlpURA3</i>
4	vector <i>KlpMET5</i>

(continuación)

SEQ ID NO:	Denominación
5	variante de promotor de LAC4-12 PLAC4-12
6	variante de promotor de LAC4-12 PLAC4-12-LR2
7	variante de promotor de LAC4-12 PLAC4
8	variante de promotor de LAC4-12 PLAC4-LR2
9	secuencia de cebador VK183
10	secuencia de cebador VK184
11	secuencia de cebador MAB6
12	secuencia de cebador VK71
13	secuencia de cebador VK211
14	BCR de PLAC4-12
15	secuencia de cebador VK30
16	secuencia de cebador VK31
17	secuencia de cebador VK32
18	secuencia de cebador VK33
19	secuencia de cebador VK34
20	secuencia de cebador VK35
21	K/p3-tándem-oVP2T2S
22	secuencia de cebador VK67
23	secuencia de cebador VK69
24	secuencia de cebador VK74
25	secuencia de cebador VK75

Referencias

- 5 Arnold, M.; Durairaj, V.; Mundt, E.; Schulze, K.; Breunig, K. D. & Behrens, S.-E. Protective Vaccination against Infectious Bursal Disease Virus with Whole Recombinant Kluyveromyces lactis Yeast Expressing the Viral VP2 Subunit, PLoS ONE, Public Library of Science, 2012, 7, e42870
- 10 Berthoud, T. K.; Hamill, M.; Lillie, P. J.; Hwenda, L.; Collins, K. A.; Ewer, K. J.; Milicic, A.; Poyntz, H. C.; Lambe, T. & Fletcher, H. A.
- 15 Potent CD8+ T-cell immunogenicity in humans of a novel heterosubtypic influenza A vaccine, MVA- NP+ M1, Clinical infectious diseases, Oxford University Press, 2011, 52, 1-7
- Bathurst, I. C.
- Protein expression in yeast as an approach to production of recombinant malaria antigens, The American journal of tropical medicine and hygiene, ASTMH, 1994, 50, 20-26
- 20 Breunig, K. D.
- Multicopy plasmids containing the gene for the transcriptional activator LAC9 are not tolerated by *K. lactis* cells, Current genetics, Springer, 1989, 15, 143-148
- de Silva; Chandimal, U.; Tanaka, H.; Nakamura, S.; Goto, N. & Yasunaga, T. A comprehensive analysis of reassortment in influenza A virus, Biology open, The Company of Biologists Ltd, 2012, 1, 385-390
- 25 Eterradossi, N.; Toquin, D.; Abbassi, H.; Rivallan, G.; Cotte, J. & Guittet, M. Passive Protection of Specific Pathogen Free Chicks Against Infectious Bursal Disease by In-Ovo Injection of Semi-Purified Egg-Yolk Antiviral Immunoglobulins, Zoonoses and Public Health, Wiley Online Library, 1997, 44, 371-383
- Gellissen, G. & Hollenberg, C. P.
- Application of yeasts in gene expression studies: a comparison of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* and *Kluyveromyces lactis*-a review, Gene, Elsevier, 1997, 190, 87-97
- 25 Gödecke, A.; Zachariae, W.; Arvanitidis, A. & Breunig, K. D.
- Coregulation of the *Kluyveromyces lactis* lactose permease and β-galactosidase genes is achieved by interaction of multiple LAC9 binding sites in a 2.6 kbp divergent promoter, Nucleic acids research, Oxford University Press, 1991, 19, 5351-5358
- Granzow, H.; Birghan, C.; Mettenleiter, T. C.; Beyer, J.; Köllner, B. & Mundt, E. A second form of infectious bursal disease virus-associated tubule contains VP4., Journal of virology, Am Soc Microbiol, 1997, 71, 8879-8885
- 30 Kasanga, C. J.; Yamaguchi, T.; Wambura, P. N.; Maeda-Machang'u, A. D.; Ohya, K. & Fukushi, H.
- Molecular characterization of infectious bursal disease virus (IBDV): diversity of very virulent IBDV in Tanzania, Archives of virology, Springer, 2007, 152, 783-790
- 35 Kirchenbaum, G. A. & Ross, T. M.
- Eliciting broadly protective antibody responses against influenza, Current opinion in immunology, Elsevier, 2014, 28, 71-76
- Kirunda, H.; Erima, B.; Tumushabe, A.; Kiconco, J.; Tugume, T.; Mulei, S.; Mimbe, D.; Mworozi, E.; Bwogi, J. & Luswa, L.
- 40 Prevalence of influenza A viruses in livestock and free-living waterfowl in Uganda, BMC veterinary research, BioMed Central, 2014, 10, 50
- Krammer, F. & Palese, P.
- Influenza virus hemagglutinin stalk-based antibodies and vaccines, Current opinion in virology, Elsevier, 2013, 3,

- 521-530
 Krijger, J.-J.; Baumann, J.; Wagner, M.; Schulze, K.; Reinsch, C.; Klose, T.; Onuma, O. F.; Simon, C.; Behrens, S.-E. & Breunig, K. D.
 A novel, lactase-based selection and strain improvement strategy for recombinant protein expression in Kluyveromyces lactis, *Microbial Cell Factories*, 2012, 11, 112
- 5 Kumar, K.; Singh, K. C. P. & Prasad, C. B.
 Immune responses to intermediate strain IBD vaccine at different levels of maternal antibody in broiler chickens, *Tropical animal health and production*, Springer, 2000, 32, 357-360
- 10 Negash, T.; Gelaye, E.; Petersen, H.; Grummer, B. & Rautenschlein, S.
 Molecular evidence of very virulent infectious bursal disease viruses in chickens in Ethiopia, *Avian diseases*, BioOne, 2012, 56, 605-610
- Rautenschlein, S.; Kraemer, C. H.; Vanmarcke, J. & Montiel, E.
 Protective efficacy of intermediate and intermediate plus infectious bursal disease virus (IBDV) vaccines against very virulent IBDV in commercial broilers, *Avian diseases*, BioOne, 2005, 49, 231-237
- 15 Remington's Practice of Pharmacy, 13. Ausgabe und J. of. Pharmaceutical Science & Technology, Vol. 52, Nr. 5, Sept-Okt., S. 238-311
- Ridpath, J. F.
 Emerging pestiviruses infecting domestic and wildlife hosts, *Animal Health Research Reviews*, Cambridge University Press, 2015, 16, 55-59
- 20 RKI, Influenza (Teil 2): Erkrankungen durch zoonotische Influenzaviren, 2016 Schrauwen, E. J. A. & Fouchier, R. A. M.
 Host adaptation and transmission of influenza A viruses in mammals, *Emerging microbes & infections*, Nature Publishing Group, 2014, 3, e9
- 25 Short, K. R.; Richard, M.; Verhagen, J. H.; van Riel, D.; Schrauwen, E. J. A.; van den Brand, J. M. A.; Mänz, B.; Bodewes, R. & Herfst, S.
 One health, multiple challenges: The inter-species transmission of influenza A virus, *One health*, Elsevier, 2015, 1, 1-13
- 30 Steel, J.; Lowen, A. C.; Wang, T. T.; Yondola, M.; Gao, Q.; Haye, K.; García-Sastre, A. & Palese, P.
 Influenza virus vaccine based on the conserved hemagglutinin stalk domain, *MBio*, Am Soc Microbiol, 2010, 1, e00018-10
 WHO, Influenza (Seasonal), 2016
 WHO, Biologicals, Influenza, 2017

REIVINDICACIONES

1. Cepa de *Kluyveromyces lactis* (*K. lactis*) para la clonación dirigida de ácidos nucleicos que codifican antígenos extraños y/o proteínas extrañas en el genoma de levadura de la cepa de *K. lactis*, caracterizada por que la cepa de *K. lactis*, además del locus *KILAC4*, presenta casetes de expresión integrados en el locus *KIURA3-20* (*KLLAOE22771g*) y/o en el locus *KIMET5-1* (*KLLAOB03938g*) para antígenos extraños, en donde los casetes de expresión contienen el promotor de *K. lactis LAC4-12* (*PLAC4-12*) o variantes de este promotor, incluyendo la región intergénica entre *LAC12* y *LAC4*, la región codificante de antígenos o proteína extraña y el terminador de *AgTEF1*, y en donde las variantes del promotor de *K. lactis LAC4-12* (*PLAC4-12*) se seleccionan de
- 10 • un promotor de *LAC4-12* con estructura de promotor modificada, que en condiciones no inducidas no permite ninguna expresión de proteínas extrañas o permite una expresión de proteínas extrañas solo reducida, caracterizado por que la región de control basal (*basal control region*) (BCR) del promotor *PLAC4-12* está delecionada entre -1065 y -1540 (delección LR2; *PLAC4-12-LR2*(SEQ ID NO:2)); y
- 15 • un promotor de *LAC4-12* con estructura de promotor modificada, que permite una modulación de la expresión de proteínas extrañas, caracterizado por que varía el número de sitios de unión para el activador *KIGal4* del promotor ("secuencias de activación en sentido de 5' ("upstream activating sequences") 1, 2 y 4, 5) y están presentes o bien 1, 2, 3 o bien 4 sitios de unión de *KIGal4*.
- 20 2. Cepa de *K. lactis* según la reivindicación 1, caracterizada por que en el locus *KILAC4* o en el locus *KIURA3-20* o en el locus *KIMET5-1* de las cepas de *K. lactis* resultantes están insertadas varias copias de un ácido nucleico que codifica antígenos extraños a través de casetes de expresión en tandem o múltiples; o por que en el locus *KILAC4* y/o en el locus *KIURA3-20* y/o en el locus *KIMET5-1* están insertadas una o varias copias de distintos ácidos nucleicos que codifican antígenos extraños a través de casetes de expresión sencillos, en tandem o múltiples.
- 25 3. Cepa de *K. lactis* según una de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizada por que en los loci *KILAC4* y *KIURA3-20* de la cepa de *K. lactis* están insertados y se expresan los genes codificantes de los antígenos extraños gripe A/Puerto Rico/8/1934(H1N1) HA y gripe A/Puerto Rico/8/1934(H1N1) M1.
- 30 4. Cepa de *K. lactis* según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que la cepa de *K. lactis*, además del gen *KIGAL4* genómico, contiene también una segunda copia ectópica del gen *KIGAL4*.
- 35 5. Cepa de *K. lactis* según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que la función génica de los alelos *Kllac4*, *Klura3-20* y *Klmet5-1* está restablecida y la cepa de *K. lactis* es protótrofa.
- 40 6. Cepa de *K. lactis* según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que en los loci *KILAC4*, *KIURA3-20* y *KIMet5-1* de la cepa de *K. lactis* están insertados los genes de los antígenos extraños ectodominio de E2 de BVDV (tipo 1, CP7), ectodominio de E2 de BVDV (tipo 2, New York 93) y Npro-NS3 de BVDV (tipo 1, CP7).
7. Cepa de *K. lactis*, seleccionada de las cepas:
- | | |
|---------|-------------|
| VAK1283 | DSM 32697; |
| VAK1395 | DSM 32706 y |
| VAK1400 | DSM 32698. |
- 45 8. Composición farmacéutica, que contiene una cepa de *K. lactis* según una de las reivindicaciones 1 a 7.
9. Cepa de *K. lactis* según una de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso en la vacunación.
- 50 10. Cepa de *K. lactis* para su uso según la reivindicación 9 caracterizada por que la vacunación es una vacunación protectora.
11. Cepa de *K. lactis* para su uso según una de las reivindicaciones 9 o 10, que comprende la administración de una cepa de *K. lactis* según una de las reivindicaciones 1 a 7 en un sujeto en una cantidad que es suficiente para desencadenar en el sujeto una respuesta inmunitaria protectora contra uno o varios antígenos extraños.
- 55 12. Cepa de *K. lactis* para su uso según una de las reivindicaciones 9 a 11, caracterizada por que la cepa de *K. lactis* se administra por vía subcutánea, intramuscular u oral/mucosa.
- 60 13. Cepa de *K. lactis* para su uso según una de las reivindicaciones 9 a 11, caracterizada por que la cepa de *K. lactis* desencadena una respuesta inmunitaria protectora contra un patógeno en una aplicación/inmunización única ("one shot") o en una aplicación/inmunización doble ("prime-boost").
14. Cepa de *K. lactis* para su uso según una de las reivindicaciones 9 a 11, caracterizada por que la cepa de *K. lactis*

desencadena una respuesta inmunitaria de protección cruzada contra distintas variantes de un patógeno en una aplicación/inmunización única ("one shot") o en una aplicación/inmunización doble ("prime-boost").

- 5 15. Cepa de *K. lactis* según una de las reivindicaciones 9 a 11, caracterizada por que la cepa de *K. lactis* desencadena una respuesta inmunitaria protectora contra distintos patógenos en una aplicación/inmunización única ("one shot") o en una aplicación/inmunización doble ("prime-boost").

Figura 1

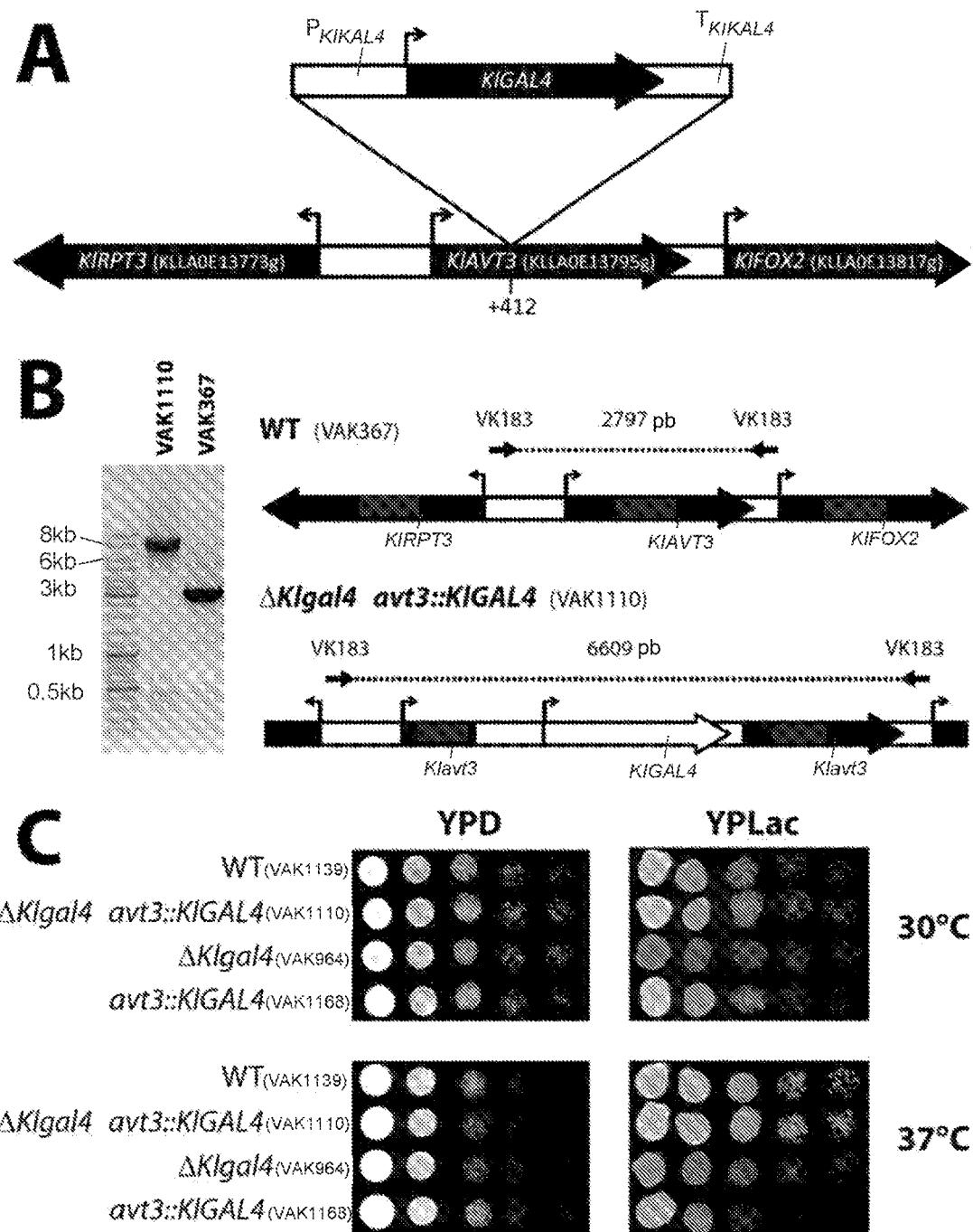


Figura 2

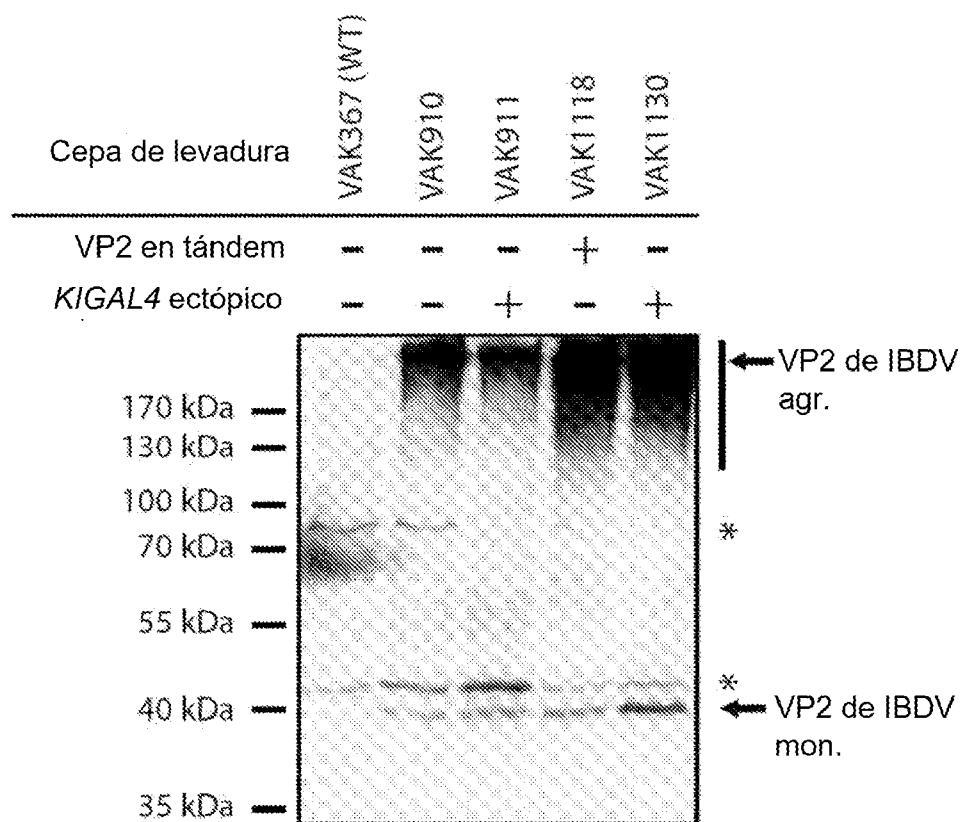


Figura 3

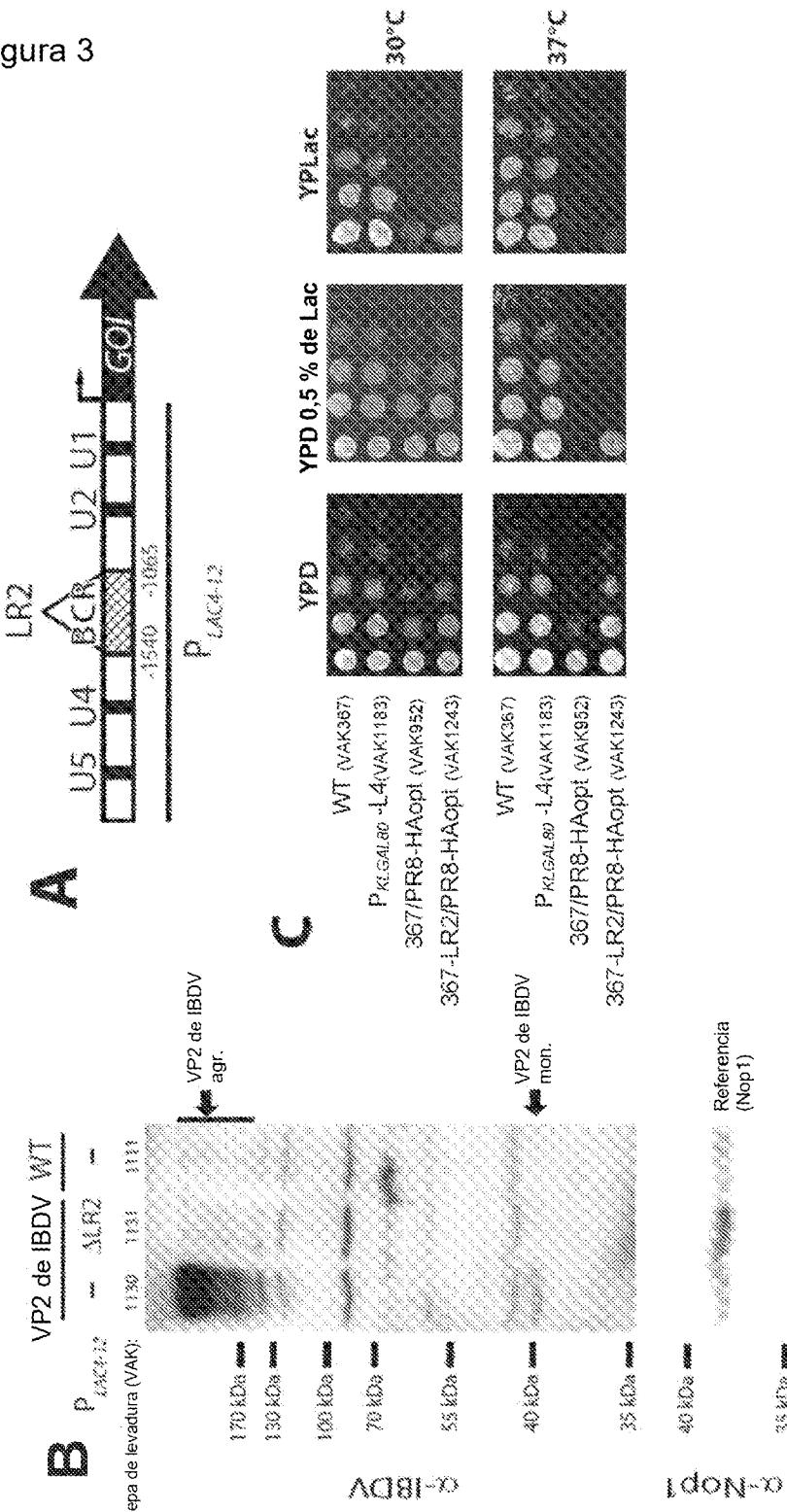


Figura 4

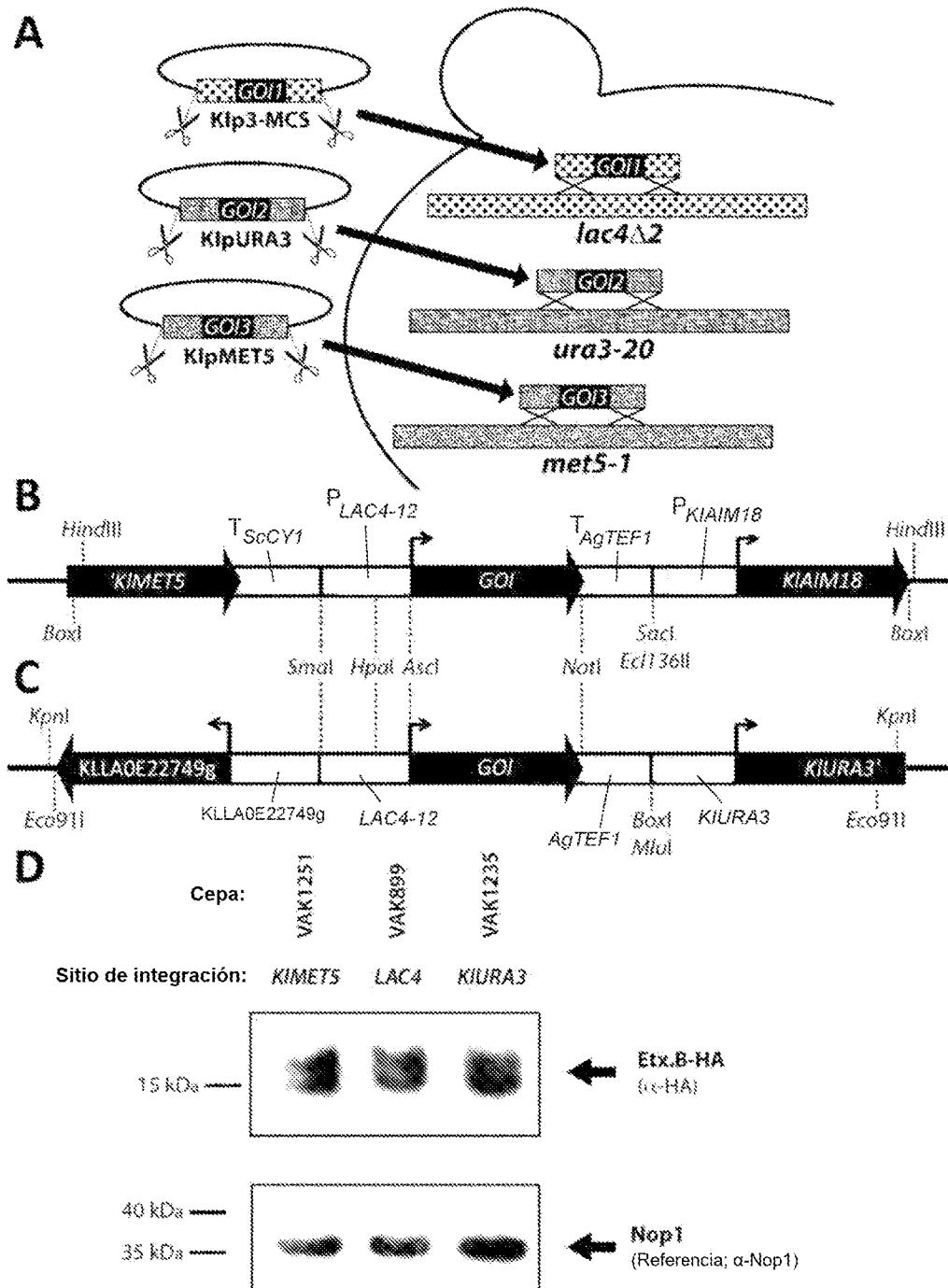
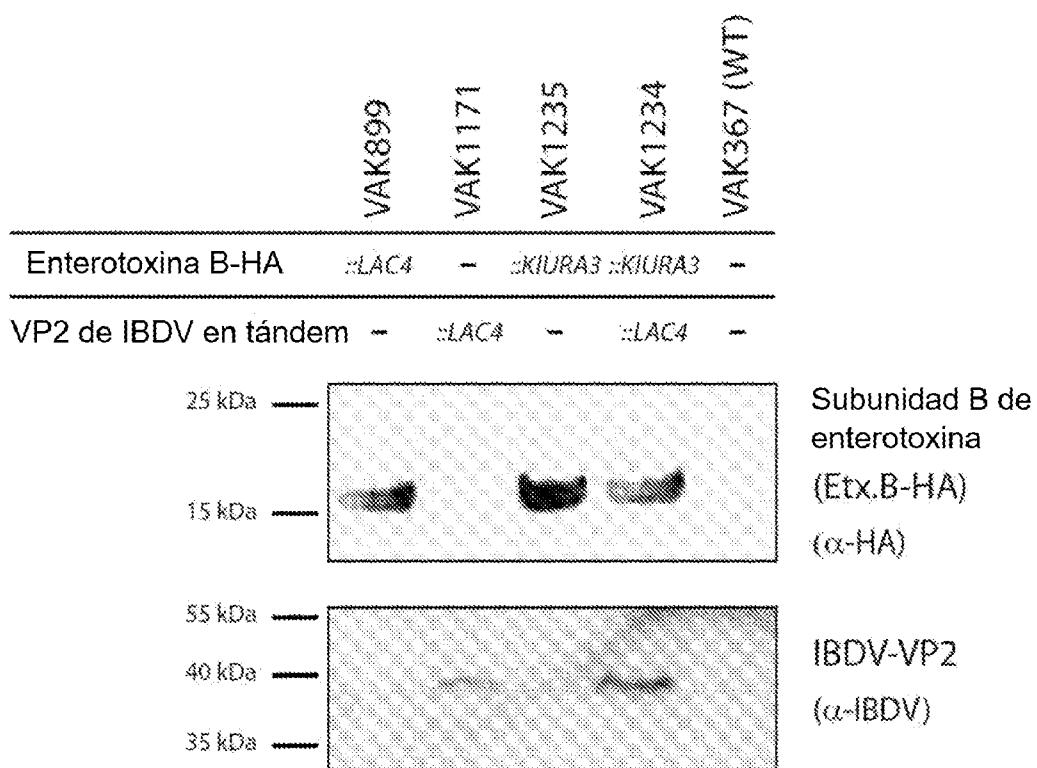


Figura 5

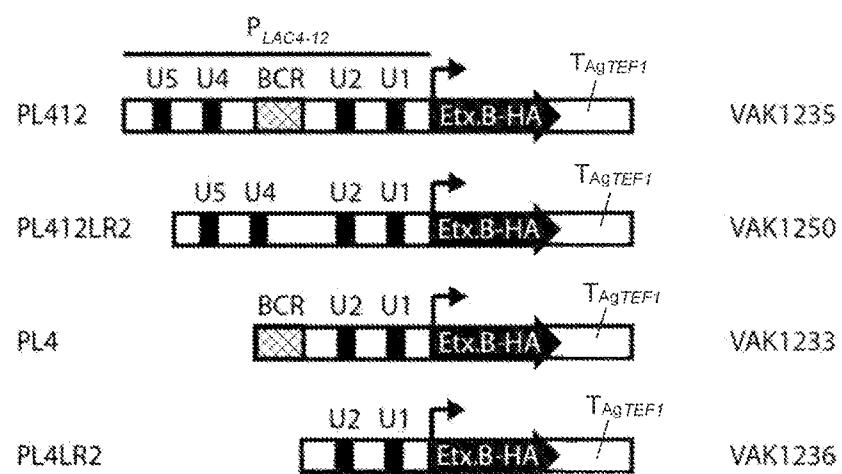


A

Variante de promotor

Figura 6

Cepa de levadura

**B**

VAK367 (WT)

VAK1236

VAK1233

VAK1250

VAK1235

Promotor de *LAC4-12*
Longitud

α -HA
(Etix.B-HA)

α -Nop1
(Referencia)

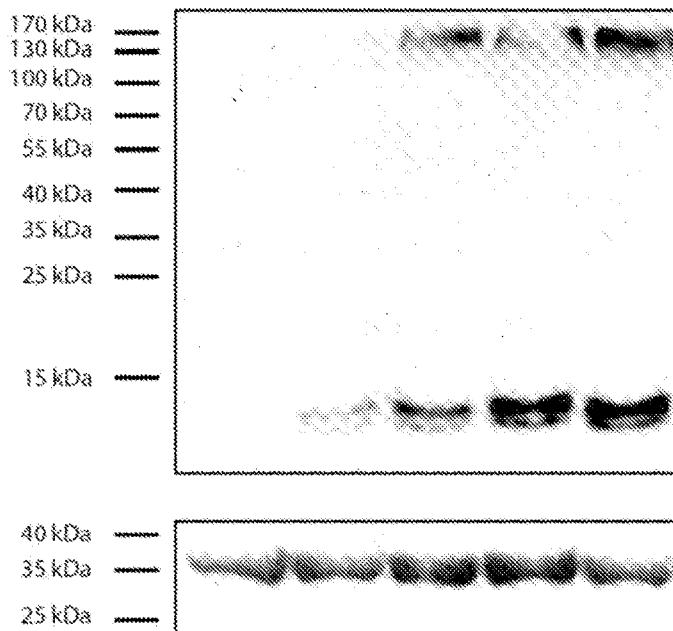


Figura 7

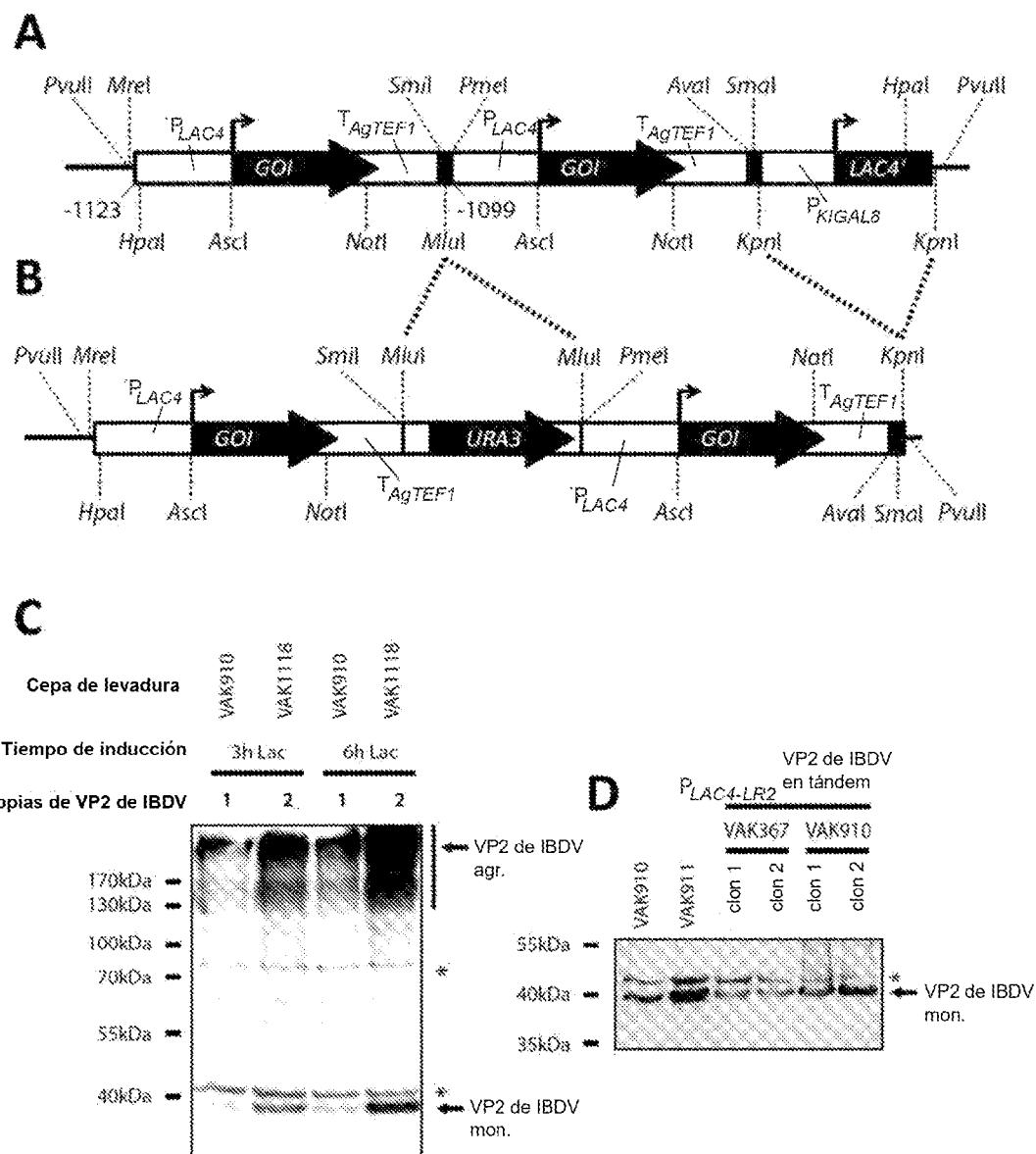


Figura 8

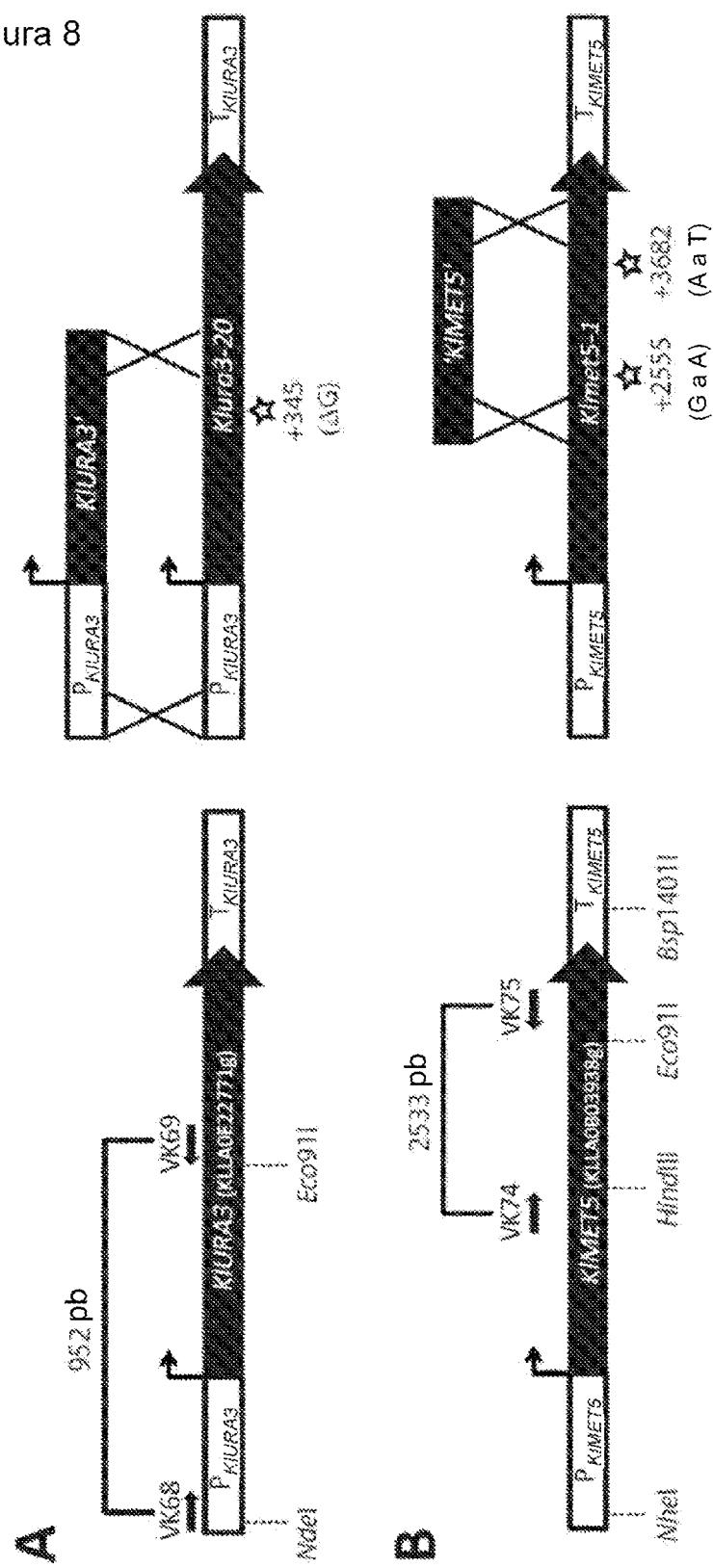


Figura 9

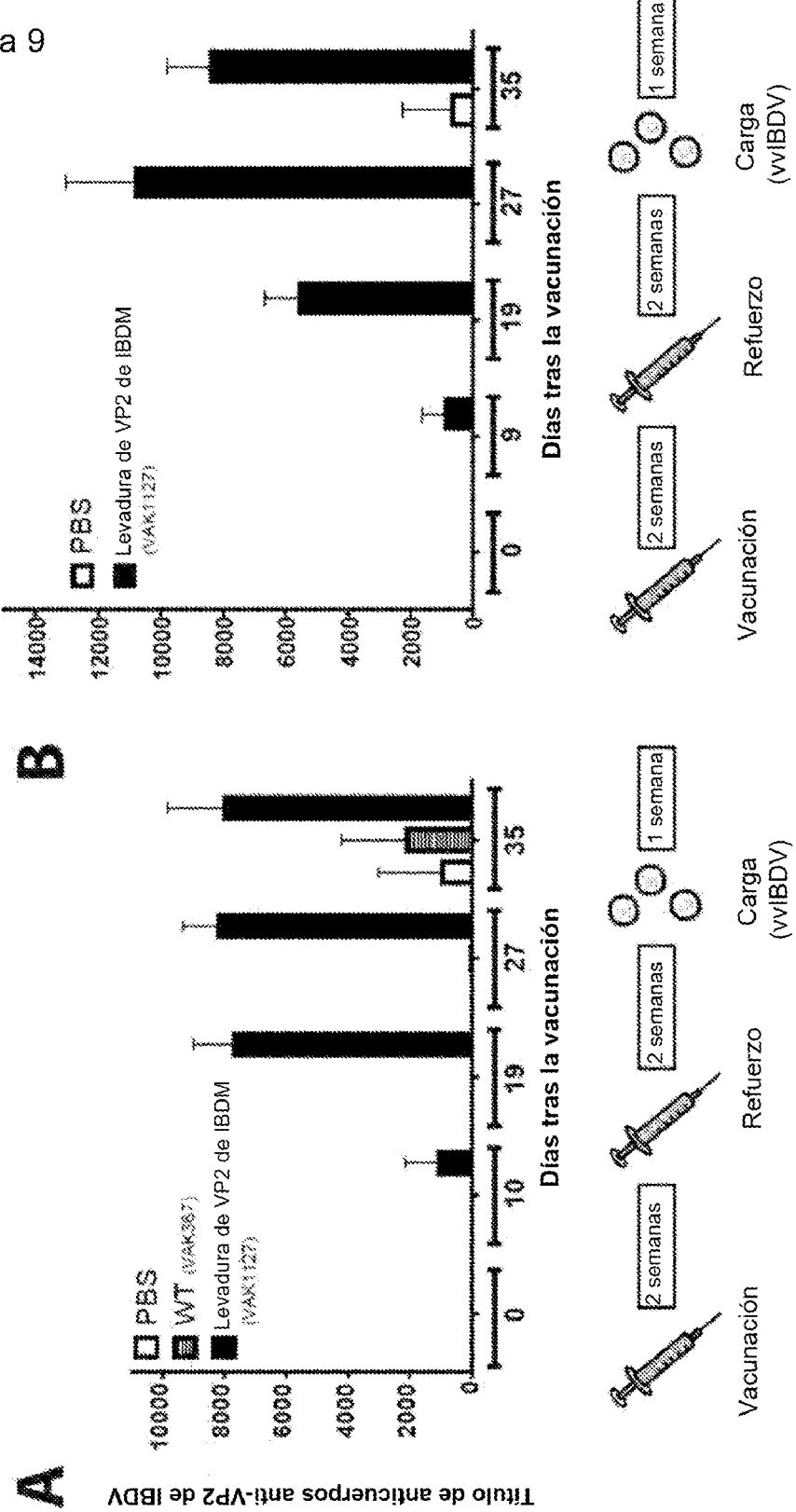


Figura 10

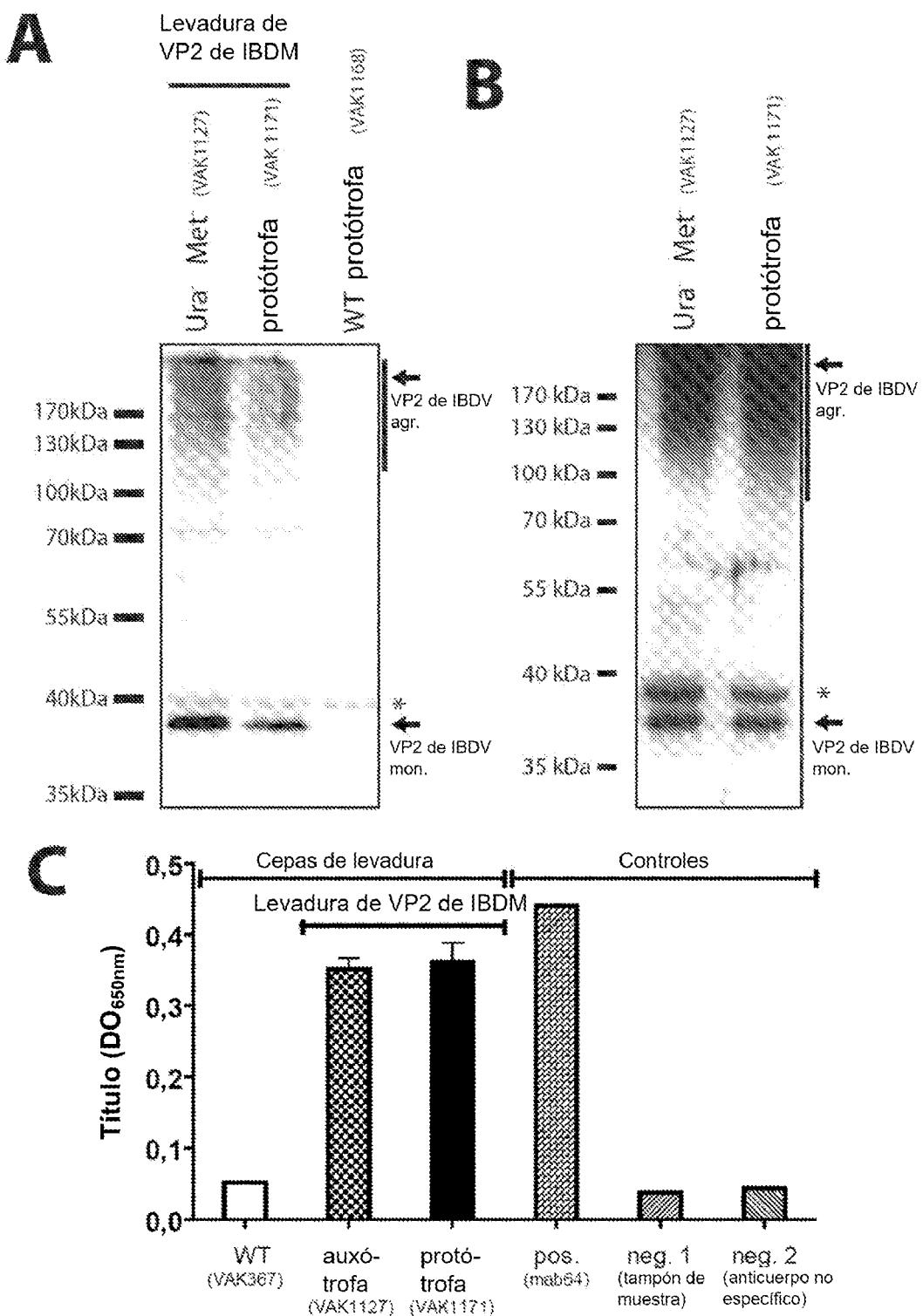


Figura 11

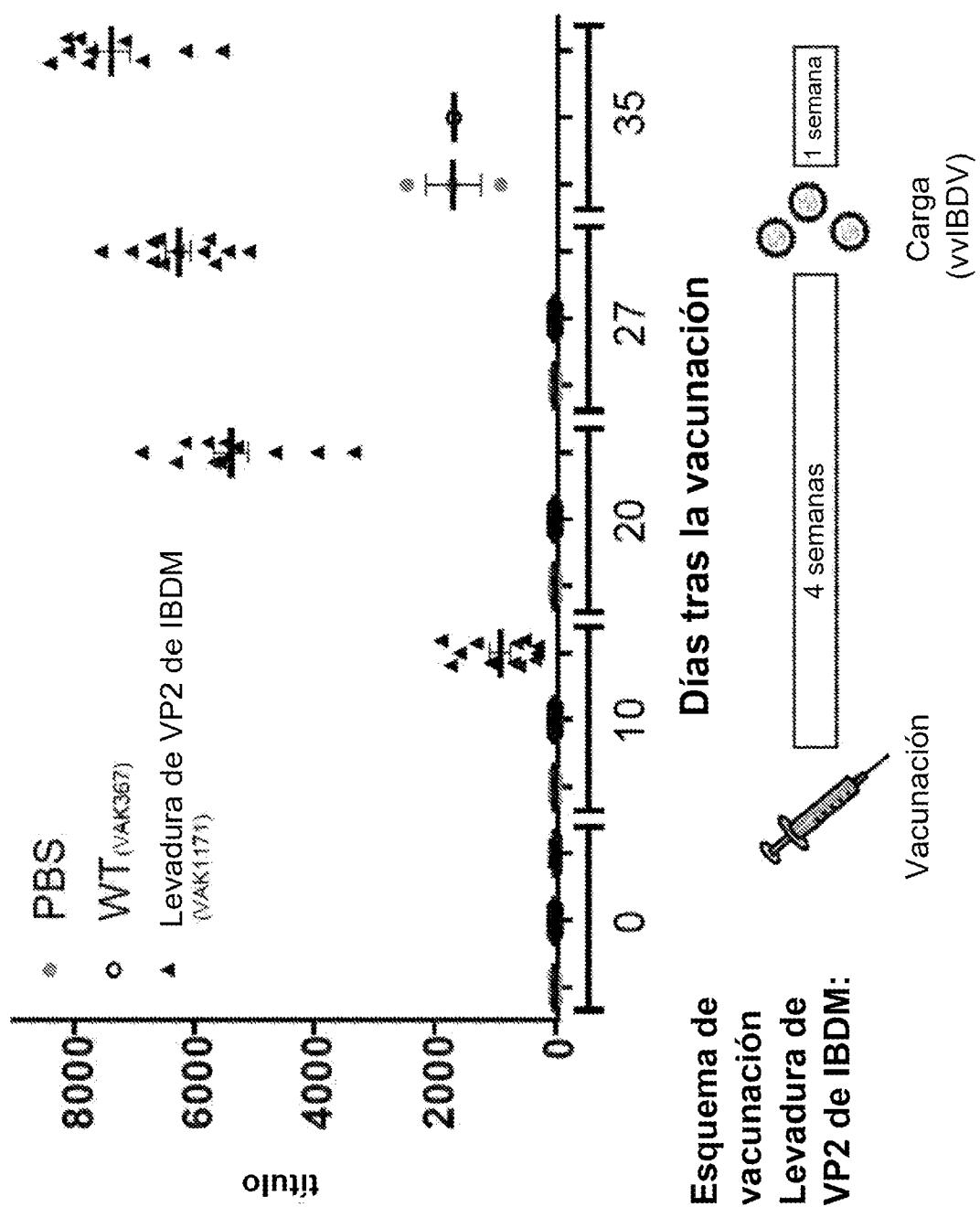


Figura 12

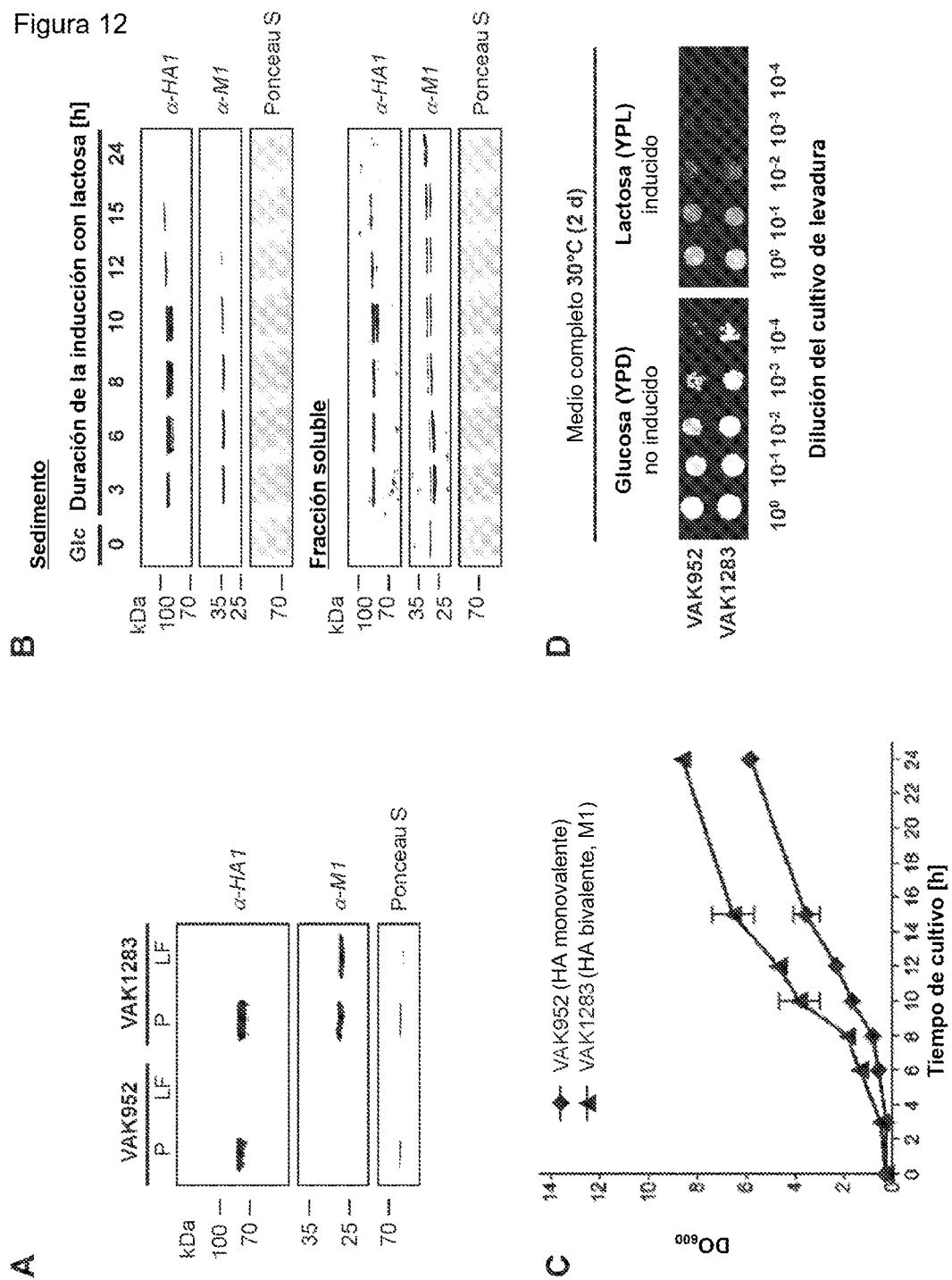


Figura 13

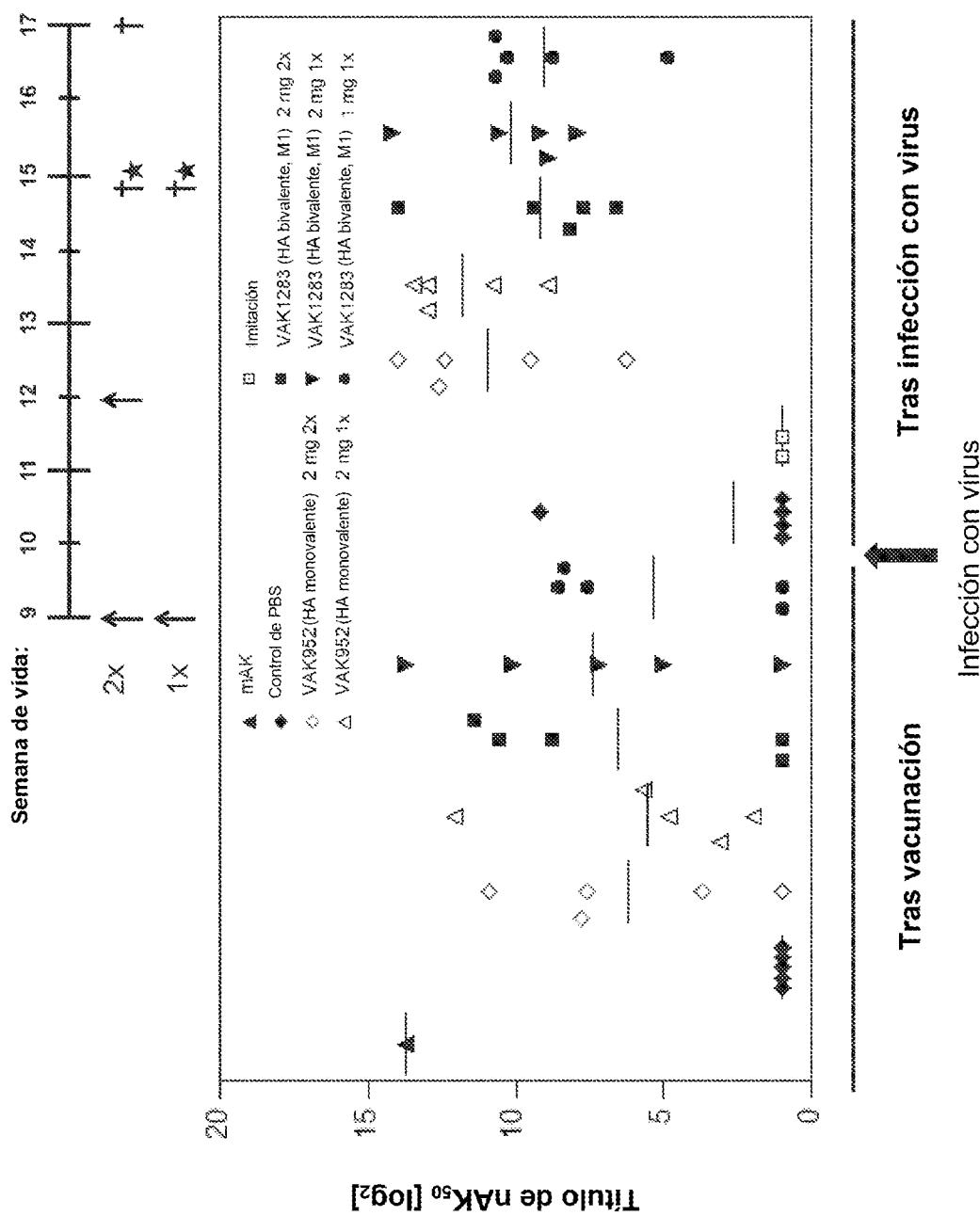


Figura 14

