

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges

Eigentum

Internationales Büro



(43) Internationales

Veröffentlichungsdatum

25. Juli 2013 (25.07.2013)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer

WO 2013/107436 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:

*C12N 15/81* (2006.01) *A61K 39/02* (2006.01)  
*A61K 39/00* (2006.01) *G01N 33/569* (2006.01)  
*A61K 39/12* (2006.01)

TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2012/001205

(22) Internationales Anmeldedatum:

12. Dezember 2012 (12.12.2012)

(25) Einreichungssprache:

Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache:

Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:

10 2011 121 069.9

13. Dezember 2011 (13.12.2011)

DE

(71) Anmelder: MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT  
HALLE-WITTENBERG [DE/DE]; Universitätsplatz 10,  
06108 Halle (Saale) (DE).

(72) Erfinder: BREUNIG, Karin; Leitergasse 2, 06108  
Halle/Saale (DE). BEHRENS, Sven-Erik; Springkrautweg  
14, 06120 Halle/Saale (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ,

Erklärungen gemäß Regel 4.17:

- hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii)
- hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, die Priorität einer früheren Anmeldung zu beanspruchen (Regel 4.17 Ziffer iii)
- Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv)

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eingehen (Regel 48 Absatz 2 Buchstabe h)
- mit Angaben bezüglich hinterlegtem biologischen Material, eingereicht gemäß Regel 13bis, getrennt von der Beschreibung (Regel 13bis Absatz 4 Buchstabe d Ziffer i und Regel 48 Absatz 2 Buchstabe a Ziffer viii)

WO 2013/107436 A1

(54) Title: VACCINATION BY MEANS OF RECOMBINANT YEAST BY PRODUCING A PROTECTIVE HUMORAL IMMUNE RESPONSE AGAINST DEFINED ANTIGENS

(54) Bezeichnung : VAKZINIERUNG MITTELS REKOMBINANTER HEFE DURCH ERZEUGUNG EINER PROTEKTIVEN HUMORALEN IMMUNANTWORT GEGEN DEFINIERTE ANTIGENE

(57) Abstract: The invention relates to recombinant yeasts of the *Kluyveromyces lactis* species for the production of a humoral immune response against defined antigens, to the production of said yeasts, and to the use thereof for protective vaccination against pathogens and malignant cells containing said antigens.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft rekombinante Hefen der Spezies *Kluyveromyces lactis* zur Erzeugung einer humoralen Immunantwort gegen definierte Antigene, die Herstellung dieser Hefen und deren Verwendung zur protektiven Vakzinerung gegen Pathogene und maligne Zellen, die diese Antigene enthalten.

## **Vakzinierung mittels rekombinanter Hefe durch Erzeugung einer protektiven humoralen Immunantwort gegen definierte Antigene**

### **Gebiet der Erfindung**

Die Erfindung betrifft rekombinante Hefen zur Erzeugung einer humoralen Immunantwort gegen definierte Antigene, die Herstellung dieser Hefen und deren Verwendung zur protektiven Vakzinierung gegen Pathogene und maligne Zellen, die diese Antigene enthalten.

### **Stand der Technik**

Vakzine werden eingesetzt, um Krankheiten vorzubeugen (präventive Impfstoffe) oder um etablierte Krankheiten zu behandeln (immuntherapeutische Impfstoffe). Präventive Impfprogramme haben in den letzten ca. 100 Jahren wesentlich zur Reduktion von Infektionskrankheiten beigetragen. Immuntherapeutische Impfstoffe werden erst seit etwa 20 Jahren entwickelt und eingesetzt, etwa gegen persistente Infektionen mit Viren, Bakterien oder Parasiten oder gegen kanzerogene Erkrankungen. Ziel der Impfung ist die Induktion einer zellulären (d.h. im Wesentlichen T- und NK-zellvermittelten) und/oder humoralen (d.h. im Wesentlichen B-zell/antikörper-vermittelten) Immunantwort sowie eines immunologischen Gedächtnisses („memory“) gegen antigene Komponenten von Pathogenen oder malignen (tumorgenen) Zellen.

Klassische Vakzine enthalten den gesamten Krankheitserreger in attenuierter (inaktivierter) oder abgetöteter Form, einschließlich dessen genetischen Materials, Nukleinsäuren in Form von DNA oder RNA. Diese klassischen Impfstoffe benötigen für die Herstellung meist besondere Sicherheitsvorkehrungen und/oder die Verwendung von Versuchstieren und/oder die Verwendung von Zellkulturen; zudem müssen sie oft aufwendig und unter der Verwendung von Kühlketten gelagert und transportiert werden. Außerdem bergen sie die Gefahr, dass Stoffe aus der Herstellung (z.B. aus dem Versuchstier oder aus der Zellkultur) im geimpften Individuum Nebenwirkungen erzeugen oder dass es zu unerwünschten Reaktivierungen des Erregers kommt. Probleme existieren auch bei der Diagnostik: So können beispielsweise im Fall der Impfung von Nutzieren geimpfte Tiere nicht von natürlich infizierten Tieren unterschieden werden, so dass das Frühwarnsystem, was auf dem Nachweis von Neuinfektionen basiert, versagen kann. Daher wurden

sog. „*subunit*“ Vakzine entwickelt, die nur Teile des Erregers enthalten. Voraussetzung dafür ist, dass „Hauptantigene“ des jeweiligen Krankheitserregers, bekannt sind. Hauptantigene sind meist Oberflächenbestandteile des Erregers, die vom Immunsystem erkannt werden können, z.B. Proteine einer Virushülle oder des Virus-Kapsids. Diese können auch in Abwesenheit eines kompletten Viruspartikels eine humorale und/oder zelluläre Immunantwort und ein immunologisches Gedächtnis im Wirt gegen das Virus induzieren. Da bei „*subunit* Vakzinierung“ also typische Bestandteile des Erregers fehlen, können durch eine Differenzialdiagnose vakzinierte- von natürlich infizierten Individuen unterschieden werden; es wird daher auch von einem „*subunit* Markervakzin“ gesprochen. Nachteile vieler *subunit* Vakzine sind eine oft aufwändige Herstellung und eine oft unzureichende Immunogenität: Während die Krankheitserreger selbst effizient (mit den oben ausgeführten Einschränkungen) gezüchtet werden können, müssen deren Hauptantigene durch kostenintensive und meist ineffiziente Verfahren gentechnisch hergestellt und aufwändig gereinigt werden. So gewonnene *subunit* Vakzine sind entsprechend empfindlich, müssen ebenfalls oft gekühlt gelagert und transportiert werden und haben eine geringe Haltbarkeit. Aus diesen Gründen beruht ein Großteil der Massenimpfstoffe immer noch auf dem klassischen Prinzip mit kompletten Krankheitserregern. Beispielsweise basieren die meisten Impfstoffe gegen die weit verbreitete Geflügelkrankheit Infektiöse Bursitis (IBD) derzeit in der Mehrzahl auf attenuierten (abgeschwächten) oder inaktivierten Viren des IBD auslösenden Virus der Infektiösen Bursitis (IBDV).

Das Problem der schwächeren Immunogenität bei *subunit* Vakzinen versucht man durch die zusätzliche Verwendung von Adjuvanzien zu kompensieren. Adjuvanzien sind Stoffe, die sich empirisch als immunstimulierend erwiesen haben. Sie verstärken unspezifisch und oft in wenig verstandener Weise die Immunreaktion. Bislang sind nur wenige Adjuvanzien für den menschlichen Gebrauch zugelassen. Die einzigen Hilfsmittel, die beispielsweise in den USA für den Einsatz am Menschen zugelassen sind, sind Aluminiumsalze, Aluminiumhydroxid und Aluminiumphosphat. Aluminiumsalz-Formulierungen verursachen allerdings zusätzliche Schwierigkeiten bei der Lagerung des betreffenden Vakzins. Außerdem entfalten diese Adjuvanzien nicht mit allen Antigenen eine ausreichend Wirksamkeit.

Die gentechnische Herstellung von Fremdproteinen, zu denen die meisten *subunit* Vakzine zählen, kann in verschiedenen Wirtszellen erfolgen. Neben dem

Darmbakterium *Escherichia coli* sind Säugerzellen, die in Zellkulturen vermehrt werden können, Pflanzenzellen und verschiedene Pilze als Wirtssysteme etabliert. Mikrobielle Systeme wie Bakterien und Pilze lassen sich besonders kostengünstig im großen Maßstab züchten. Hefezellen der Hefegattungen *Saccharomyces*, *Pichia* und *Kluyveromyces* werden bereits seit Dekaden routinemäßig zur Expression von Fremdproteinen eingesetzt. Hefezellen haben gegenüber Bakterien den Vorteil, dass es Eukaryoten sind, d.h. sie gleichen in vielen Aspekten den tierischen Zellen, und eukaryotische Proteine, d.h. Proteine, die in tierischen Zellen gebildet werden und/oder funktionsfähig sein müssen, können in Hefe in nativer oder nahezu nativer Form kostengünstig hergestellt werden (Bathurst, 1994; Gellissen & Hollenberg, 1997). Hefen wurden zunächst nur dafür verwendet die Fremdproteine zu produzieren, und die Proteine wurden aus den Hefezellen gereinigt und als *subunit* Vakzine eingesetzt. Erst seit kurzer Zeit wird versucht, Hefen selbst oder Zellfraktionen der Hefen als Vakzine zu verabreichen.

Seit etwa 5 Jahren wird versucht *Saccharomyces cerevisiae* ("Bäckerhefe", *S. cerevisiae*) selbst zur Vakzinierung einzusetzen: So konnte gezeigt werden, dass durch subkutan applizierte, Antigen-exprimierende Zellen von *S. cerevisiae* dendritische Zellen aktiviert und Antigen-spezifische T-Zell Immunantworten, speziell zytotoxische T-Zell Antworten gegen bestimmte Antigene erzeugt werden können. Diese zelluläre Immunantwort erwies sich als protektiv gegenüber der Gabe bestimmter Tumorzellen, d.h. in vakzinierter Tieren entstanden im Anschluss an die Vakzinierung weniger Tumoren als in Kontrolltieren. Dieses Verfahren wird derzeit auch in immuntherapeutischen Anwendungen bei Tumorerkrankungen getestet (Stubbs et al., 2001; Lu et al., 2004).

Dem Fachmann sind folgende Quellen aus dem Stand der Technik bekannt, in denen eine Hefe-basierte Vakzinierung beschrieben wird:

Eine Reihe von US Patenten, so z.B. 20090304741, 5830463 und 10738646 und 20070166323 beschreiben die Verwendung von *S. cerevisiae* die mindestens ein rekombinantes Antigen enthalten, in der Immuntherapie. Es wurde gezeigt, dass diese Hefen wirksam sind, um eine Immunreaktion, insbesondere eine Zell-vermittelte Immunreaktion, zu stimulieren.

WO/2006/044923 offenbart Hefe (*S. cerevisiae*), die verschiedene Proteine des Hepatitis C Virus (HCV) rekombinant exprimiert und die eine Immunreaktion, vor

allem eine T-Zell Antwort, gegen diese HCV Proteine auslösen kann und als Vakzin gegen chronische Hepatitis C eingesetzt werden soll.

WO/2007/092792 beschreibt den möglichen Einsatz rekombinanter *S. cerevisiae* gegen Influenzavirus-Infektionen, wobei eine Kombinationen verschiedener Hefestämme benutzt wird, deren Applikation zu einer T-Zell Induktion, also zu einer zellulären Immunantwort führt.

WO/2011/032119 betrifft ein Verfahren zur Verbesserung der Wirksamkeit einer Hefe-basierten Immuntherapie in Patienten. Das Verfahren umfasst ein Hefe-basiertes Mittel, dass die Produktion oder das Überleben von CD4+ TH17 Zellen moduliert.

In keinem der zugänglichen Patente wird Hefe nachweislich zur Induktion einer protektiven humoralen Immunantwort gegen Infektionskrankheiten oder Tumoren eingesetzt (Thema dieser Anmeldung). Zudem wurden entweder die Hefen *Saccharomyces cerevisiae* oder *Pichia pastoris* verwendet, nicht aber *Kluyveromyces lactis* (Thema dieser Anmeldung).

Wie *S. cerevisiae*, so besitzt auch die "Milchhefe" *Kluyveromyces lactis* (*K. lactis*) den GRAS Status (GRAS: *generally regarded as safe*), d.h. sie ist für die Anwendung in Tier oder Mensch geeignet (van Ooyen et al. 2006). Obwohl morphologisch sehr ähnlich der Bäckerhefe *S. cerevisiae* haben sich die Entwicklungslinien der beiden Gattungen vor über 100 Millionen Jahren von einem gemeinsamen Vorläufer in unterschiedliche Richtungen entwickelt. *K. lactis* unterscheidet sich daher in vielen Eigenschaften grundlegend von *S. cerevisiae*. Einige dieser Unterschiede sind von großer Bedeutung für die Verwendbarkeit in biotechnologischen Anwendungen. Die Evolution von *S. cerevisiae* brachte die Spezialisierung des Stoffwechsels auf alkoholische Gärung mit sich und damit den Verlust vieler Gene der Vorläufer. Die alkoholische Gärung ist für die meisten Hefen allerdings untypisch. Sie erfolgt in *S. cerevisiae* bei hohen Glucose-Konzentrationen auch dann, wenn Sauerstoff vorhanden ist und die mitochondriale Atmung eigentlich eine sehr viel effizientere Energieausbeute aus der Zuckeraumsetzung zuließe: Die Funktion der Mitochondrien, die "Kraftwerke" der Zelle, wird weitgehend durch "Glucose-Repression" unterdrückt. *K. lactis* unterscheidet sich in der Regulation der Funktion der Mitochondrien erheblich von *S. cerevisiae* (Chen and Clark-Walker, 1995, Clark-Walker, 2007). *K.*

*lactis* gehört im Gegensatz zu *S. cerevisiae* zu den sogenannten "Crabtree negativen" Hefen. Solche Hefen bilden unter strikt aeroben Bedingungen in der Regel kein Ethanol sondern bauen die Glucose über die mitochondriale Aktivität unter Bildung von ATP vollständig zu CO<sub>2</sub> ab. Diese physiologische Eigenschaft ist von fundamentaler Wichtigkeit, da sie zu einer deutlichen Erhöhung der Biomasseausbeute bei Fermentationen im Großmaßstab führt, was eine deutliche Kostensenkung bei der Nutzung dieser Hefen als Produzenten rekombinanter Proteine zur Folge hat. Außerdem haben Studien in *K. lactis* gezeigt, dass Mutationen im Hexokinase-vermittelten Glukose-Signalweg die Expression heterologer Gene verbessern können (Donnini et al., 2004). Eine reduzierte Glukoserepression, insbesondere von respiratorischen Genen, ist ein Merkmal der "Crabtree negativen" Hefen und könnte mit der empirisch beobachteten besseren Fremdgenexpression in solchen Hefen in Zusammenhang stehen.

*K. lactis* und *S. cerevisiae* weisen zudem erhebliche Differenzen in der Komposition der Zellwand-Glukane auf (Backhaus et al., 2011); diese Unterschiede beruhen vermutlich auf unterschiedlichen Glycosyltransferasen im Golgi-Apparat, die an der Maturierung von Glykoproteinen beteiligt sind: So enthalten Glykoproteine in *S. cerevisiae* vielfach Mannosephosphate, die Glykoproteine in *K. lactis* vor allem terminale N-Acetylglucosamine (Raschke and Ballou, 1972). Es ist anzunehmen, dass diese Unterschiede zwischen *S. cerevisiae* und *K. lactis* bei der Glykosylierung und Sekretion von Proteinen sowie in der Zellwandbiosynthese einen erheblichen Einfluss auf die intrazelluläre Lokalisation, die Faltung sowie Stabilität und somit auch auf die Immunogenität von heterolog exprimierten Fremdproteinen haben (Uccelletti et al., 2004).

WO/2010/054649 beschreibt die Herstellung eines rekombinanten Systems von *K. lactis*. In den dort angegebenen Anwendungsbeispielen wurden rekombinante Stämme, die vom Stamm VAK367-D4 abgeleitet waren, zur mukosalen oder oralen Vakzinierung gegen verschiedene Antigene eingesetzt. Nachteil der oralen/mukosalen Vakzinierung ist allerdings, dass die Vakzine in großen Mengen eingesetzt werden müssen, um eine protektive Immunisierung zu erreichen.

## Beschreibung der Abbildungen

**Abb. 1** zeigt schematisch die Herstellung des Impfstammes VAK887, der das IBDV VP2 Fremdgen trägt, über homologe Rekombination in den VAK367-D4 Ausgangsstamm. Über Transformation des Plasmids Klp3-MCS (SEQ ID Nr.: 10), das das VP2 Gen des IBDV Stammes D78 enthielt, wurde das VP2 Fremdgen über homologe Rekombination in den chromosomalen LAC4 Genort eingesetzt, der durch Insertion des URA3 Gens zerstört war. Bei der Rekombination in das Wirtsgenom wurde das URA3 Gen durch das VP2 Gen ersetzt und das LAC4 Gen wieder hergestellt; rekombinante Hefestämme konnten durch Selektion auf Lactose-Medium ohne Uracil erhalten werden. Nachfolgend wird die Expression von LAC4 ( $\beta$ -Galaktosidase) über den KIGAL80 Promotor, die Expression des VP2 Gens über den LAC4 Promotor gesteuert.

**Abb. 2A** zeigt die Expression von IBDV VP2 durch den Stamm VAK887 im Vergleich zum Ursprungsstamm (VAK367) und im Vergleich zu IBDV infizierten Hühnerzellen mittels Western Analyse mit einem VP2-spezifischen Antikörper. **Abb. 2B** zeigt die Expressionsanalyse von rekombinantem IBDV VP2 bzw. mutiertem IBDV VP2-T2S in verschiedenen VP2 exprimierenden *K. lactis* Varianten. Die ursprüngliche *K. lactis* Variante VP2 (VAK887) exprimierte nur moderate Mengen an viralem Protein. Die VP2 Proteinexpression konnte im Stamm *K. lactis* VP2-T2S (VAK888) gesteigert werden, indem Threonin an Aminosäureposition 2 des VP2 Proteins gegen Serin ausgetauscht wurde. Eine weitere Steigerung konnte erzielt werden durch Erhöhung der KIGAL4 Gendosis (VP2-T2S\_GAL4 = VAK890) bzw. durch Verwendung eines Hefe-Codon optimierten synthetischen VP2 Gens (oVP2-T2S = VAK910).

**Abb. 3** zeigt, dass die Hitzeinaktivierung der erfindungsgemäßen Hefen bei 90° C für 2 Stunden nicht zu einem Verlust des rekombinanten VP2-T2S Proteins führt (Abb. 3A). Es wurden jeweils gleiche Proteinmengen aus nicht inaktivierter Hefe, inaktivierter Hefe und Hefe aus einem Futterpellet auf einem SDS PAGE aufgetrennt und im Vergleich zu Zelllysaten aus Geflügelzellen, die mit IBDV infiziert oder nicht infiziert waren, in einem Western-Blot mit einem Anti-VP2-Antikörper getestet. Abb3 zeigt weiterhin, dass die Menge an VP2-T2S in der Variante VAK890 ca. 0,7 fg heterologes Protein pro Hefezelle beträgt (Abb. 3B). Hier wurden definierte Mengen

von gereinigtem VP2-T2S im Vergleich zu VP2 aus einer definierten Zellzahl im Fermenter gezogener *K. lactis* (Stamm VAK890) im Western Blot angefärbt und das Ergebnis densitometrisch ausgewertet.

**Abb. 4** erläutert die Vakzinierung in Mäusen mit subkutan applizierten, hitzeinaktivierten, kompletten Hefezellen der *K. lactis* Variante VAK890 im Vergleich zur oralen Vakzinierung mit kompletten Hefezellen der *K. lactis* Variante VAK890. Abb. 4A zeigt das Immunisierungsschema: Es wurde dreimal subkutan immunisiert, mit je zwei Wochen Pause; zum Vergleich wurde zweimal zwei Wochen lang gefüttert. Zwei Wochen (Pfeil) nach der letzten Hefeapplikation wurden Serumproben aus den behandelten Mäusen in einem IBDV-spezifischen ELISA (Abb. 4B) und in einem IBDV-Neutralisationsassay auf Anwesenheit von Anti-VP2 Antikörper geprüft (Abb. 4C). Abb. 4D fasst zusammen, dass Mäuse, die mit VP2-exprimierender *K. lactis* (Stamm KI VP2-T2S\_GAL4 (VAK890)) behandelt wurden, höhere Titer an Antikörpern/neutralisierenden Antikörpern aufweisen als Mäuse, die mit *K. lactis* Wildtyp (Stamm VAK367) behandelt wurden. Zudem wurde gezeigt, dass subkutan applizierte *K. lactis* (Stamm VAK890) deutlich höhere Titer an Antikörpern/neutralisierenden Antikörpern aufweisen, als Mäuse, die mit *K. lactis* (Stamm VAK890) gefüttert wurden. Mäuse, die oral mit *K. lactis* (Stamm 890) immunisiert wurden, zeigten allerdings auch einen erhöhten Titer an Antikörpern/neutralisierenden Antikörpern im Vergleich zu Mäusen, die mit *K. lactis* Wildtyp (Stamm VAK367) behandelt wurden.

**Abb. 5** zeigt die orale und subkutane Vakzinierung in Hühnern mit hitzeinaktivierten, kompletten Hefezellen der *K. lactis* Variante VP2-T2S\_GAL4 (VAK890). Für die orale Vakzinierung wurde entweder ein kurzes 1/1/1/1 Schema (1 Woche füttern, 1 Woche Pause, 1 Woche füttern, usw.) oder ein längeres 2/2/2 Schema angewandt (Abb. 5A). Nach 1 Woche bzw. 2 Wochen Pause nach der Vakzinierung, wurden alle behandelten Tiere mit IBDV (Stamm Edgar) in einer Konzentration von 100 EID50 pro Tier infiziert (Virus challenge; schwarze Balken). Nach oraler Vakzinierung, insbesondere nach Anwendung des verlängerten Behandlungsschemas, konnten in mehreren Tieren erhöhte Titer an Virus-neutralisierenden Antikörpern nachgewiesen werden. Die subkutane Vakzinierung mit rekombinantem *K. lactis* hingegen erzeugte hohe Titer an Virus-neutralisierenden Antikörpern in allen behandelten Tieren (Abb.

5B, C; IBDV-spezifischer ELISA, IBDV-Neutralisationsassay). Keines der mit rekombinanter *K. lactis*-Hefe behandelten Tiere starb nach Infektion mit IBDV, unabhängig davon, welches Behandlungsschema angewendet wurde. Im Gegensatz dazu betrug die Sterblichkeitsrate in der Kontrollgruppe 10-35% (Abb. 5C). Die Analyse der Läsionen in den Bursae der behandelten Tiere zeigte, dass etwa 10% der oral behandelten Tiere nach Anwendung des verlängerten Behandlungsschemas keine Anzeichen einer Virusinfektion nach Inokulation mit IBDV aufwiesen: Dabei wurde ein sog. „Läsionen score“ verwendet – score 1, 2 indizieren nicht oder kaum beschädigte Bursae; score 3, 4 indizieren beschädigte und stark beschädigte Bursae. Im Gegensatz dazu zeigten alle Tiere, in denen die rekombinante *K. lactis* Stamm VAK890 subkutan appliziert wurde, einen vollständigen Impfschutz gegen IBDV (Abb. 5C).

Abb. 6 zeigt schematisch den Aufbau des Vektors KlP3-MCS (**SEQ ID Nr.: 10**).

#### **Beschreibung der Erfindung:**

Die Möglichkeit der Anwendung rekombinanter Hefen zur subkutanen Vakzinierung ist dem Fachmann aus dem Stand der Technik bekannt: Stubbs et al., (2001) Nat. Med. 7: 625-629; Stubbs and Wilson (2002) Curr. Opin. Mol. Ther. 4: 35-40; Wansley et al., (2008) Clin. Cancer Res. 14: 4316-4325; US 5,830,463, WO/2006/044923; WO/2007/092792 und WO/2011/032119. In den Ausführungsbeispielen dieser Publikationen wurde allerdings ausschließlich mit der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* gearbeitet. „Hefe“ ist ein Sammelbegriff für einzellig wachsende eukaryotische Mikroorganismen mit z.T. sehr unterschiedlichen Eigenschaften aufgrund divergenter Evolution über hunderte Millionen von Jahren (ca. 100 Mio Jahre für *S. cerevisiae* und *K. lactis*). Beim Einsatz von *S. cerevisiae* und *K. lactis* zum Zwecke der Vakzinierung in höheren Eukaryoten wie Tier oder Mensch ist daher davon auszugehen, dass sich eine von *S. cerevisiae* ausgelöste Immunantwort stark von einer von *K. lactis* ausgelösten Immunantwort unterscheidet. Dies gilt sowohl für die Immunantwort gegen in der Hefe exprimierten Fremdantigene als auch für die Immunantwort gegen hefeige Antigene. Bei subkutanen Immunisierungen mit kompletten *S. cerevisiae* Zellen wurde eine T-Zell Induktion, also eine *zelluläre* Immunantwort erzeugt. Eine protektive, *humorale* Immunantwort gegen ein Antigen mit rekombinanter *S. cerevisiae* auf einfacherem Wege (d.h. durch direkte Applikation

eines einzelnen Antigen-exprimierenden Stammes) wurde bisher im Stand der Technik nicht belegt.

Ausgehend von dem oben dargestellten Hintergrund stellte sich die Aufgabe, ein Verfahren bereitzustellen, mit dem eine protektive, humorale Immunantwort gegen bestimmte Antigene erzeugt werden kann. Eine weitere Aufgabe bestand darin, ein *subunit* Markervakzin herzustellen, mit dem es möglich ist, vakzinierte gegenüber natürlich infizierten Individuen zu unterscheiden. Eine weitere Aufgabe bestand darin, ein *subunit* Markervakzin herzustellen, das zugleich stark adjuvierende Eigenschaften aufweist und damit stark immunogen ist.

Diese Aufgaben wurden gelöst durch Bereitstellung eines Hefe-basierten Expressionssystems, das die gezielte Integration von Fremdgenen in das Hefegenom erlaubt. Rekombinante Hefen, die Fremdgene exprimieren, können mit diesem System schnell (d.h. innerhalb weniger Wochen) hergestellt werden. Die Hefen können im Fermenter in großen Quantitäten (z.B. Kilogramm (kg) Bereich) kostengünstig vermehrt werden. Durch regulierte Expression und Fermentation im Fed-Batch Verfahren können auch zytotoxische Antigene in diesem Hefesystem exprimiert werden. Nach Expression des Fremdgens wird die Hefe hitzeinaktiviert und kann dann als Pulver ungekühlt gelagert und transportiert werden. Das Hefepulver kann direkt, d.h. ohne weitere Fraktionierung, entweder als Emulsion oder als Pellet (siehe Ausführungsbeispiele) als *subunit* Markervakzin eingesetzt werden. Die Antigen-Formulierung und der für die effektive, d.h. protektive Immunisierung notwendige Adjuvanzeffekt werden durch zwei Faktoren gewährleistet: (i) durch die Möglichkeit der gezielten gentechnischen Modifikation des exprimierten Fremdproteins, (ii) durch die Expression des Fremdproteins in der Hefe und die direkte Anwendung der Hefe in oraler oder subkutaner Form; die Hefe selbst hat einen starken Adjuvanzeffekt. Bevorzugt ist die subkutane Applikation. Es wurde ein rekombinanter Hefestamm hergestellt; dieser exprimiert ein spezifisches Virusantigen und kann in dem erfindungsgemäßen Verfahren zur subkutanen Vakzinierung verwendet werden. Es wurde eine vollständige präventive Protektion gegen eine Infektion durch das betreffende Virus erreicht. Dabei wurden nur sehr geringe Mengen an Hefe (z.B. im Milligramm (mg) Bereich bei subkutaner Anwendung in Geflügel) eingesetzt werden. Es war nur eine 2-3 malige Anwendung notwendig, um diese Protektion zu erreichen.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist sowohl für die Anwendung im humanmedizinischen als auch veterinärmedizinischen Bereich geeignet. Bevorzugt ist die Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens im veterinärmedizinischen Bereich.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird mit Hefen durchgeführt. Geeignete Hefen sind z. B. Hefen der Gattungen *Saccharomyces* spec., *Pichia* spec. und *Kluyveromyces* spec.. In einer bevorzugten Ausführungsform wird das erfindungsgemäße Verfahren mit Hefen der Gattung *Saccharomyces* spec. und *Kluyveromyces* spec. durchgeführt. Besonders bevorzugt ist dabei die Verwendung von *Saccharomyces cerevisiae* und *Kluyveromyces lactis* (*K. lactis*).

In der am meisten bevorzugten Ausführungsform wird das erfindungsgemäße Verfahren mit der Hefe *Kluyveromyces lactis* durchgeführt.

Die Hefe *K. lactis* gehört zu den sogenannten „food grade“ Hefen, die den GRAS Status (GRAS: generally regarded as safe) haben. Wie die Bäckerhefe, die als Nahrungsmittelzusatz über Jahrtausende erprobt und bewährt ist, gilt auch die in Molkereiprodukten häufig vertretene Hefe *K. lactis* für die Lebensmittelindustrie als unbedenklich.

Neben der unter „Stand der Technik“ erläuterten Möglichkeit zur Fermentation weist die Hefe *K. lactis* gegenüber *S. cerevisiae* zahlreiche Vorteile im Hinblick auf die Expression heterologer Gene auf. *K. lactis* gehört zu den sogenannten „petite negative“ Hefen, das heißt, der Verlust der mitochondrialen DNA ist letal (aufgrund des Zusammenbruchs des mitochondrialen Membranpotentials (Chen et al., 1995; Clark-Walker, 2007)). Die Mitochondrienfunktion ist eng gekoppelt an  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Signalvermittlung, die Produktion von reaktiven Sauerstoffverbindungen, die Stressantwort der Zelle, die Proteinglykosylierung und die Zellwandintegrität. Dadurch beeinflusst die Mitochondrienfunktion entscheidend die Produktion von rekombinanten Glycoproteinen und die Zusammensetzung der Zellwand.

Bei Hefen und Säugern sind die ersten Schritte der N-Glycosylierung von Proteinen, die im Endoplasmatischen Retikulum stattfindet, gleich. Allerdings weichen die im Golgi Apparat stattfindenden Schritte voneinander ab. Die im Golgi Apparat vorhandenen Glycosyltransferasen sind in den unterschiedlichen Hefespezies verschieden. Dadurch kommt es zu Unterschieden in der Zusammensetzung der Glycoproteine in der Zellwand. In *K. lactis* weisen die Glycoproteine terminale N-Acetylglucosamine auf, im Gegensatz zu Mannosephosphat bei *S. cerevisiae*.

(Raschke und Ballou, 1972). Dies könnte bei Vakzinierungen erhebliche Auswirkungen auf die Stimulierung des Immunsystems durch die jeweilige Hefespezies haben.

Die verbesserte Sekretion rekombinanter Proteine in *K. lactis* Mutanten mit veränderter  $\alpha$ 1,6-Mannosyltransferase (*KIOCH1*) verdeutlicht die Verbindung zwischen Proteinglycosylierung/Sekretion und Zellwandbiosynthese (Uccelletti et al., 2004). Veränderungen in der Proteinglycosylierung beeinflussen außerdem die intrazelluläre Lokalisation rekombinanter Proteine, die auf dem Weg zur Sekretion aufgrund fehlerhafter Faltung zurückgehalten werden.

*K. lactis* ist eine der wenigen Hefearten, die Laktose als Kohlenstoff- und Energiequelle verwerten können. Laktose ist ein billiger Zucker, der als Bestandteil der Molke in hohen Mengen (z.B. als Beiprodukt im der Molkereiwirtschaft) anfällt. *K. lactis* kann mit Laktose ähnliche Wachstumsraten wie mit Glukose erreichen. Die Regulation der am Laktose-Stoffwechsel beteiligten Gene wurde intensiv untersucht. Der starke  $\beta$ -Galaktosidasepromoter (*LAC4*) kann zur Regulierung der Expression heterologer Gene und Produktion rekombinanter Proteine benutzt werden. (van Ooyen et al., 2006, Breunig et al., 2000). Aufgrund der verminderten Glukoserepression kann die heterologe Expression von Genen in *K. lactis* Kulturen, die in Glukose-haltigem Medium kultiviert wurden, schnell und effizient durch die Zugabe von Laktose induziert werden.

Erfindungsgemäß wurde über gentechnische Verfahren ein *K. lactis* Stamm, vorzugsweise VAK367-D4 und Varianten dieses Stammes, generiert, der die gezielte Integration von Fremdgenen am *LAC4* Locus des Hefegenoms erlaubt (Abb. 1). Diese Integration erfordert nur einen Schritt über ein entsprechend konstruiertes Plasmid; eine Selektion von rekombinanten Stämmen ist ohne die Verwendung von Antibiotika-Resistenzgenen möglich, und die Fremdgenexpression in den rekombinanten Stämmen kann über den *LAC4* Promoter durch die Zugabe von Laktose in das Medium induziert werden. *K. lactis* Zellen mit integrierten Fremdgenen können über diese Methode in wenigen Wochen generiert und charakterisiert werden. Beide Aspekte dieses Systems sind von großer Wichtigkeit: Zum einen ist so die reproduzierbare Anzucht von Hefezellen möglich, die jeweils definierte Mengen eines Fremdproteins enthalten (Abb. 2, 3). Zum anderen können bei der Anwendung zur Vakzinierung gegen plastische (leicht veränderbare) Antigene (wie beispielsweise das Influenzaantigen Hämagglutinin) in kurzer Zeit neue Hefestämme generiert

werden, beispielsweise bei Auftreten neuer, potenziell pandemischer Influenzavirusstämme. Dabei ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass die neu generierten rekombinanten *K. lactis* Stämme ähnliche Eigenschaften wie die erprobten Stämme (z.B. in Bezug auf ihr Wachstumsverhalten im Fermenter) aufweisen. Durch die zusätzliche Integration von Genen des KIGal4 Transaktivators in das Hefegenom kann zudem die Expressionsrate des Fremdgens signifikant gesteigert werden (Kuger et al., 1990).

In einer weiteren Ausführungsform wird das erfindungsgemäße Verfahren mit einem speziellen *K. lactis* Stamm, VAK367-D4 und Abkömmlingen hiervon, durchgeführt. Es wurde eine Serie (VAK) auf dem *K. lactis* Stamm VAK367-D4 aufbauender rekombinanter Varianten generiert. Generell exprimieren diese Varianten induzierbar signifikante Mengen eines Fremdproteins, oder Domänen dieses Fremdproteins, oder Domänen dieses Fremdproteins fusioniert mit artfremden Proteindomänen. Die dabei verwandten artfremden Proteindomänen dienen der gezielten Stimulation der Immunantwort (Adjuvanz) bzw. der gezielten Kompartimentierung des exprimierten Fremdproteins in der Hefezelle. Neben Adjuvanzeffekten ist die Kompartimentierung des exprimierten Fremdproteins wichtig für die Optimierung der Expression bzw. die Formulierung des Expressionsproduktes.

In einer weiteren Ausführungsform wird das erfindungsgemäße Verfahren durchgeführt mit VAK367-D4 und Abkömmlingen hiervon in der Verwendung als *subunit* Markervakzin. Die Verwendung rekombinanter *K. lactis*, die nur definierte Proteinantigene (Fremdproteine) exprimieren, als Vakzin erlaubt in einer Differenzialdiagnose die Diskriminierung vakzinierten gegenüber natürlich infizierten Individuen. Einer dieser rekombinanten *K. lactis* Stämme (siehe Ausführungsbeispiele) wurde erfolgreich zur oralen und subkutanen Impfung eingesetzt. Bei der subkutanen Anwendung wurde eine vollständige Protektion der Impflinge erhalten.

Als „Fremdproteine“ im Sinne dieser Erfindung sind alle Peptide, Polypeptide und Proteine gemeint, die geeignet sind, eine protektive Immunantwort, bevorzugt eine protektive humorale Immunantwort, im Menschen oder in einem Tier gegen ein Pathogen oder kanzerogen entartete Zellen zu erzeugen. Fremdproteine können von Krankheitserregern oder Tumoren jeglicher Art stammen, für die Antigene charakterisiert wurden, die allein in der Lage sind, eine protektive Immunantwort, vorzugsweise eine protektive humorale Immunantwort, zu induzieren.

In einer bevorzugten Ausführungsform stammen die Fremdproteine von Krankheitserregern (Viren, Bakterien, Parasiten), für die Antigene charakterisiert wurden, die allein in der Lage sind, eine protektive Immunantwort, vorzugsweise eine protektive humorale Immunantwort zu induzieren.

Dies sind zum Beispiel:

Fremdproteine, die von Parasiten stammen

*Necator americanus; Ancylostoma duodenale*: ASP Protein, *Haemoglobin-abbauende Proteasen*

*Leishmania*: gp63, 46 kD *Promastigot-Antigen*, LACK

*Plasmodium*: CSP protein, 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 und 28, Paramyosin, *Parasiten-Myosin*, Sm14

Fremdproteine, die von Bakterien stammen

*Mycobakterium tuberculosis*: Ag85A, Hsp65, R8307, 19 kD, 45 kD, 10.4

*Helicobacter pylori*: VacA, LagA, NAP, hsp, Urease, Katalase

*Group A Streptococcus*: M, SCPA Peptidase, Exotoxine SPEA und SPEC, *Fibronectin binding protein*

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

*Salmonella typhimurium*: Vi Antigen

*Shigella*: LPS

*Vibrio cholera*: CTB

*Escherichia coli* ETEC: LT, LT-ST, CTB

*Yersinia pestis*: F1, V

Fremdproteine, die von Tumorzellen/Tumoren stammen (Tumor-assoziierte Antigene, TAA)

CEA

5T4

MUC1

MART1

HER-2

Insbesondere bevorzugt sind Fremdproteine, die von Viren stammen.

*Caliciviridae* (Norwalk, HEV): NV 60 kD; HEV ORF2

*Reoviridae* (Rota): VP7, VP4

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

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

*Flaviviridae* (genus Pestivirus BVDV, CSFV, BDV. Genus Hepacivirus HCV): E1, E2, E<sup>RNS</sup> (Pesti), C, NS3, NS4, NS5

*Hepadnaviridae* (HBV): HBS Antigen

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

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

*Rhabdoviridae* (Rabies): G

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

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

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

*Papillomaviridae*: L2, E6, E7

In der am meisten bevorzugten Ausführungsform der Erfindung stammen die Fremdproteine von Vertretern der Familie *Bimaviridae*, wie z. B. dem IBD-Virus, und sind in der Lage, eine protektive Immunantwort, vorzugsweise eine protektive humorale Immunantwort zu induzieren.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wurde eine *K. lactis* VAK367-D4 Variante VP2 (VAK887) erzeugt, die als Fremdprotein das Capsid-formierende VP2-Antigen des Virus der Infektiösen Bursitis (IBDV Stamm D78) exprimiert (**SEQ ID NR.: 1 und 2**). Besonders bevorzugt ist eine *K. lactis* VAK367-D4 Variante VP2-T2S (VAK888), bei der das VP2 Protein an Aminosäureposition 2 mutiert war (Austausch Threonin gegen Serin; Jagadish et al. (1991)) und die die Nukleotid- bzw. Aminosäursequenz gemäß **SEQ ID NR.: 3 und 4** aufweist.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wurde eine optimierte *K. lactis* VAK367-D4 Variante, VP2T2S\_GAL4, erzeugt, bei der das VP2 Protein an Aminosäureposition 2 mutiert war (**SEQ ID NR.: 3 und 4**) und die zusätzlich mindestens zwei *K/GAL4* Gene enthielt (VAK890). Besonders bevorzugt

ist eine *K. lactis* VAK367-D4 Variante, oVP2-T2S, in der das mutierte VP2-Antigen durch die Hefe Codon-optimierte Nucleotidsäuresequenz mit der SEQ ID NR.: 5 codiert wird bzw. in der das rekombinant exprimierte mutierte VP2 Antigen die Aminosäursequenz gemäß SEQ ID NR.: 6 aufweist. Die optimierte *K. lactis* oVP2-T2S\_GAL4 Variante (VAK911) weist folgende Vorteile auf:

- Durch die Mutation wurde das Fremdprotein zusätzlich stabilisiert.
- Durch die Überexpression des Trans-Aktivators und/oder durch Codon-Optimierung der Sequenz konnte eine deutliche Steigerung der VP2 Expression erreicht werden (Abb. 2).
- Die Integration zusätzlicher *K/GAL4* Gene korrelierte auch mit einer höheren Wachstumsrate dieser *K. lactis* Variante.
- Diese *K. lactis* Variante weist eine besonders hohe Reproduzierbarkeit in der Hochzelldichtefermentation und der Menge an exprimiertem VP2 Protein auf (Abb. 3).

Die erfindungsgemäß erzeugte *K. lactis* VP2-T2S\_GAL4 Variante, die als Fremdprotein das mutierte VP2-Antigen des IBDV rekombinant exprimiert sowie weitere Kopien des *K/GAL4* Transaktivatorgens enthält (VAK890), wurde am 29. November 2011 bei der Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DSMZ, Inhoffenstrasse 7B, 38124 Braunschweig, Deutschland, entsprechend dem Budapest Vertrag unter der Nummer DSM 25405 hinterlegt.

Die erfindungsgemäß erzeugte *K. lactis* oVP2-T2S Variante, die als Fremdprotein das mutierte und Codon-optimierte VP2-Antigen des IBDV rekombinant exprimiert (VAK910), wurde am 29. November 2011 bei der Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DSMZ, Inhoffenstrasse 7B, 38124 Braunschweig, Deutschland, entsprechend dem Budapest Vertrag unter der Nummer DSM 25406 hinterlegt.

Die erfindungsgemäß erzeugte *K. lactis* oVP2-T2S Variante, die als Fremdprotein das mutierte und Codon-optimierte VP2-Antigen des IBDV rekombinant exprimiert sowie weitere Kopien des *K/GAL4* Transaktivatorgens enthält (VAK911), wurde am 29. November 2011 bei der Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DSMZ, Inhoffenstrasse 7B, 38124 Braunschweig, Deutschland, entsprechend dem Budapest Vertrag unter der Nummer DSM 25407 hinterlegt

Eine weitere Ausführungsform betrifft die Verwendung der erfindungsgemäßen rekombinanten Hefen in einem Verfahren zur Erzeugung einer protektiven Immunisierung, insbesondere einer protektiven humoralen Immunisierung.

Ein solches Verfahren umfasst folgende Schritte:

- a) Anzucht und Vermehrung der erfindungsgemäßen rekombinanten Hefen,
- b) Ernte und Inaktivierung der Hefen,
- c) Applikation der rekombinanten Hefen gemäß einem festzulegenden Immunisierungsschema,
- d) Titerbestimmung der gebildeten Antikörper und/oder
- e) Nachweis der Immunisierung.

Die Anzucht und Vermehrung der erfindungsgemäßen rekombinanten Hefen kann mit jedem konventionell verfügbaren Verfahren erfolgen. Besonders bevorzugt sind dabei Verfahren, die kostengünstig zu hohen Zellausbeuten führen. Dazu gehören Fermentationsverfahren, insbesondere Verfahren der Hochzelldichtefermentation. Als besonders vorteilhaft hat sich die Durchführung der Fermentation unter Anwendung eines *fed-batch* Fermentationsprotokolls erwiesen.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird die protektive, humorale Immunisierung dadurch erreicht, dass die rekombinanten Hefen oral/mukosal oder subkutan appliziert werden. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden die rekombinanten Hefen subkutan appliziert. Insbesondere bevorzugt in dem erfindungsgemäßen Verfahren ist die Verwendung von *K. lactis*, speziell der gentechnisch veränderten Varianten VAK367-D4 und der hiervon abgeleiteten Variante VAK890 und Varianten hiervon für die subkutane Applikation.

Die rekombinanten Hefezellen sollten in dem erfindungsgemäßen Verfahren inaktiviert/abgetötet eingesetzt werden. Dazu werden die Hefe nach der Anzucht und Expression der Fremdgene getrocknet und anschließend inaktiviert. Die Inaktivierung kann mit jedem konventionell verfügbaren Verfahren durchgeführt werden. Besonders geeignet zur Anwendung in dem erfindungsgemäßen Verfahren ist die Hitzeinaktivierung (z.B. Hitzeinaktivierung für 2 Stunden bei 90°C).

Für die orale/mukosale Vakzinierung kann beispielsweise ein kurzes 1/1/1/1 Immunisierungsschema (1 Woche füttern, 1 Woche Pause, 1 Woche füttern, usw.) oder ein längeres 2/2/2 Schema (2 Wochen füttern, 2 Wochen Pause, 2 Wochen

füttern, usw.) angewandt werden. Für die subkutane Vakzinierung kann beispielsweise eine zweifache oder dreifache Anwendung im Abstand von je zwei Wochen verwendet werden (**Abb. 4 und 5**)

Zum Nachweis der erfolgten Immunisierung stehen alle konventionellen Methoden zur Verfügung. In einer Ausführungsform der Erfindung wird zum Nachweis der Immunisierung der Titer an Virus-neutralisierenden Antikörpern getestet. Dazu können zum Beispiel spezifische ELISA-Tests oder Neutralisationsassays durchgeführt werden. Im Neutralisationsassay wird eine definierte Anzahl an IBD-Viren mit einer definierten Menge Serum eines immunisierten Tieres oder eines Kontrolltieres versetzt. Nachfolgend wird auf eine Inhibition der Infektion (Neutralisation) durch die derart behandelten Viren in Zellkultur getestet. Ob eine Immunisierung erfolgreich war, kann auch in einem „challenge“ Experiment, z.B. in einem „Viruschallenge“ Experiment geprüft werden. Dazu wird den behandelten Tieren eine Dosis eines pathogenen Mikroorganismus oder Virus verabreicht, die normalerweise bei nicht immunisierten Tieren zur Erkrankung führen würde. Erfolgt nach einem solchen *challenge* keine Erkrankung der Tiere, ist der Nachweis für die erfolgreiche Immunisierung erbracht (**Abb. 5**). Schließlich kann der Nachweis der Immunisierung auch durch Immunhistochemie erbracht werden. Dabei werden nach dem *challenge* die Zielorgane des Pathogens auf Infektion oder Läsion hin untersucht (**Abb. 5**).

Erfindungsgemäß wurde gezeigt, dass rekombinante *K. lactis* Varianten, die jeweils von VAK367-D4 abgeleitet wurden, erfolgreich zur Vakzinierung durch subkutane Applikation eingesetzt werden konnten. Die in den Ausführungsbeispielen ausgeführte Stamm-Variante VAK890 exprimiert das VP2-Antigen des Virus der Infektiösen Bursitis (IBDV; Stamm D78). Beim VP2 des IBDV handelt es sich um ein virales Capsid-formierendes Protein. Für VP2 ist bekannt, dass das Auslösen einer humoralen Immunantwort gegen dieses Antigen hinreichend ist, um einen infizierten Organismus präventiv vor einer nachfolgenden Infektion durch das betreffende Virus (IBDV) zu schützen. Das Auslösen einer wirksamen humoralen Immunantwort konnte einerseits über die Quantifizierung Virus-neutralisierender Antikörper indiziert werden. Andererseits wurde der Nachweis einer protektiven Immunantwort über ein „Virus-challenge-Experiment“ und eine Immunhistochemie nach dem Virus-challenge geführt. Erfindungsgemäß konnte so rekombinante *K. lactis*, bzw. rekombinante *K. lactis*, ausgehend vom Stamm VAK367-D4, in subkutanen Anwendungen als effektiv

wirksames, d.h. zu 90-100% protektives Vakzin (90-100% entspricht „Gold-Standard“ bei der Vakzinierung) etabliert werden (Abb. 4 und 5). Die rekombinante *K. lactis*, bzw. rekombinante *K. lactis*, ausgehend vom Stamm VAK367-D4, wurde somit als „subunit“-Markervakzin gegen Infektionserreger wie z.B. Viren etabliert. Das heißt, als Antigen wurde eine einzelne, immunogene Proteinuntereinheit eines Virus verwendet. Der Einsatz als „subunit“ Markervakzin impliziert, dass dessen Verwendung die Unterscheidung vakzinierter von nicht-vakzinierter, infizierten Organismen ermöglicht. Dies ist z.B. möglich über die Verwendung einer differenziellen Diagnosemethode, die sowohl Antikörper gegen das zur Vakzinierung verwendete Antigen, als auch Antikörper gegen ein weiteres Antigen des Infektionserregers nachweist. Durch die Immunisierung mit dem rekombinanten *K. lactis* Stamm VAK890 (DSM 25405), ausgehend vom Stamm VAK367-D4, konnten hohe Antikörpertiter gegen das entsprechende Virusantigen erzeugt werden. Für diese Antikörper konnte gezeigt werden, dass sie virusneutralisierend sind. Bereits über diese Eigenschaft und den gemessenen hohen Titer kann empirisch ableitet werden, dass diese humorale Immunantwort ausreicht, um einen Organismus vor einer nachfolgenden Infektion mit dem betreffenden Virus zu schützen. Der finale Beweis konnte für das IBDV erbracht werden. Der hohe Titer erzeugter virusneutralisierender Antikörper korrelierte im Huhnmodell mit einer vollständigen Protektion der vakzinierter Tiere gegen eine nachfolgende Virusinfektion (Abb. 5). Die Verwendung von *K. lactis*, speziell einer gentechnisch veränderten Variante, VAK367-D4 und Abkömmlingen hiervon, wie zum Beispiel *K. lactis* VP2-T2S\_GAL4 (VAK890), hat folgende, wesentliche Vorteile gegenüber herkömmlichen Verfahren:

1. Für die Verwendung zur Fremdgenexpression hat *K. lactis* gegenüber *S. cerevisiae* wesentliche, grundsätzliche Vorteile, die in der über Jahrtausenden von *S. cerevisiae* divergierenden Physiologie von *K. lactis* begründet sind.
2. Die Expression des Fremdgens erfolgt *nicht* über Plasmidvektoren, sondern nach gezielter und stabiler Integration des Fremdgens in einen definierten Genort des *K. lactis* Genoms. Dies erlaubt eine hohe Reproduzierbarkeit der Proteinexpression unter nicht-selektiven Bedingungen. Dieser Aspekt ist wesentlich für die reproduzierbare Erzeugung des Impfstoffs durch Kultivierung des Hefestammes im Fermenter. Das Prinzip des Stammes VAK367-D4 und Abkömmlingen hiervon ist bereits für eine orale Vakzinierung beschrieben worden (WO 20101054649 A2). In der vorliegenden Erfindung

wird nun gezeigt, dass der Stamm VAK367-D4 und seine Abkömmlinge, insbesondere *K. lactis* VP2-T2S\_GAL4 (VAK890) und oVP2-T2S\_GAL4 (VAK911) bei subkutaner Vakzinierung unter Einsatz wesentlich geringerer Hefemengen zur effektiven Protektion bei Virusinfektionen führt.

3. Die Genexpression ist induzierbar und kann über Erhöhung der Konzentration des Transkriptionsaktivators Gal4 und/oder durch Codon-Optimierung der Nukleotidsequenz des Fremdgens in Anpassung an den Hefewirt weiter gesteigert werden. Die Etablierung eines Fed-Batch Fermentationsprotokolls erlaubt die effiziente Produktion auch cytotoxischer Antigene.
4. Die Integration des Fremdgens in VAK367-D4 und Abkömmlingen hiervon ist eine „Ein-Schritt-Prozedur“. D.h. in ca. 3 Wochen können neue rekombinante Stämme erzeugt und charakterisiert werden; dies ist für die schnelle Entwicklung effizienter Impfstoffe gegen veränderte Virusvarianten besonders wichtig.
5. Durch subkutane Verabreichung rekombinanter Hefe des Typs *K. lactis*, speziell rekombinanter Hefe des Stammes VAK367-D4 und Abkömmlingen hiervon, konnte sowohl in der Maus, als auch im Huhn eine protektive Immunantwort erzeugt werden. Die Prozedur ist denkbar einfach: Eine definierte Quantität inaktivierter (Hitze-abgetöteter) Hefezellen werden dem Impfling in einem 2-3 maligen Verfahren unter die Haut gespritzt. Zwei Wochen nach der letzten Anwendung wird das Serum des Impflings auf die Präsenz und Funktionalität antigen-spezifischer Antikörper hin untersucht. Durch Virusneutralisationstests konnte nachgewiesen werden, dass diese Immunantwort vorwiegend, wenn nicht ausschließlich auf der Erzeugung neutralisierender Antikörper beruhte (protektive humorale Immunantwort). Damit unterscheidet sich die durch *K. lactis* in der subkutanen Anwendung induzierbare Immunantwort grundlegend von der durch *S. cerevisiae* induzierbaren Immunantwort, die vor allem eine T-Zell Antwort induziert. Die Möglichkeiten einer subkutanen Anwendung von *K. lactis* sind daher grundsätzlich andere als die Möglichkeiten einer subkutanen Anwendung von *S. cerevisiae*: während *K. lactis* als *subunit* Vakzin bei Antigenen zur Anwendung kommen kann, die eine protektive humorale Immunantwort erzeugen können (z.B. virale Antigene wie das VP2 Antigen des Virus der infektiösen Bursitis, IBDV oder Hämagglutinin HA Antigen des Influenzavirus),

so kann *S. cerevisiae* als *subunit* Vakzin bei Antigenen zur Anwendung kommen, die eine protektive zelluläre Immunantwort erzeugen können (wie z.B. beim NS3 Protein des Hepatitis C Virus oder Tumorantigenen wie dem Her-2). Zurückzuführen sind diese Unterschiede in der Form der induzierten Immunantwort vermutlich auf die stark unterschiedlichen Eigenschaften der *S. cerevisiae* und *K. lactis* Zellen, die oben ausgeführt wurden

Zusammengefasst leistet die vorliegende Erfindung einen umfangreichen Beitrag zum Stand der Technik und stellt zahlreiche vorteilhafte Ausführungsformen gegenüber dem Stand der Technik bereit:

- Den Erfindern ist es gelungen, *subunit* Markervakzine herzustellen, mit denen es möglich ist, vakziinierte gegenüber natürlich infizierten Individuen zu unterscheiden.
- Weiterhin können *subunit* Markervakzine hergestellt werden, die zugleich stark adjuvierende Eigenschaften aufweisen und damit stark immunogen sind.
- Die erfindungsgemäßen *subunit* Markervakzine können mehrfach angewandt werden.
- Die erfindungsgemäßen *subunit* Markervakzine erzeugen eine systemische protektive Immunantwort und immunologisches *memory* im Impfling.
- Mit der vorliegenden Erfindung ist es auch möglich, Vakzine gegen cytotoxische Antigene herzustellen.
- Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt die möglichst schnelle Erzeugung neuer Vakzinvarianten.
- Die Vakzinierungsverfahren sind insbesondere sehr kostengünstig.
- Für die Herstellung der erfindungsgemäßen Vakzine sind keine Versuchstiere oder die Verwendung animaler oder humaner Zellen in Kultur notwendig.
- Die erfindungsgemäßen Vakzine sind nicht temperaturempfindlich, sie können ohne Kühlung transportiert und gelagert werden.
- In dem erfindungsgemäßen Verfahren werden keine lebenden rekombinanten Zellen oder Organismen verwendet.
- Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist es möglich, sowohl die Quantitäten an verwendetem Vakzin, als auch die Anzahl an Anwendungen, die für das Erzielen einer protektiven Immunisierung notwendig sind, auf ein minimales Niveau zu beschränken.

## Ausführungsbeispiele

### 1. Erzeugung des *K. lactis* Stammes VAK367-D4 (*metA ura3-5 lac4::ScURA3*).

Der Ausgangsstamm VAK367 zur heterologen Expression von Fremdproteinen hat folgende Eigenschaften: Er erlaubt die Kultivierung zu hoher Zelldichte, ohne dass dabei intrazelluläre Proteine nachweisbar freigesetzt werden. Diesbezüglich unterscheidet sich dieser Stamm von vielen nahe verwandten *K. lactis* Stämmen. Der Stamm VAK367 wurde durch zwei Mutagenese-Runden von dem Stamm CBS 2359 (Centraalbureau voor Schimmelcultures <http://www.fungalbiodiversitycentre.com>) abgeleitet und ist auxotroph für die Aminosäure Methionin und die Nucleobase Uracil. Vom Stamm VAK367 wurde mit gentechnischen Methoden der Stamm VAK367-D4 (hinterlegt am 18.11.2009 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) in Braunschweig unter der Hinterlegungsnummer DSM 23097) abgeleitet, in dem mit Hilfe des Plasmids pD4-2 die Sequenz von +358 bis +1181 des *LAC4* Gens durch das *ScURA3* Gen ersetzt wurde. Der Stamm VAK367-D4 erlaubt nun die Integration von Fremdgenen am *LAC4* Locus ohne zusätzliche Marker, indem auf Lactose-Wachstum selektiert wird. Dabei wird bei Benutzung eines geeigneten Integrationsvektors, wie z.B. Klp3-MCS (Abb. 6) durch homologe Rekombination die Disruptionskassette so ersetzt, dass unter Verlust des *ScURA3* Markers ein intaktes *LAC4* Gen rekonstituiert wird. (Abb. 1)

### 2. Erzeugung eines Integrationsvektors, der die induzierbare Expression von Fremdgenen erlaubt.

Vektor: Klp3-MCS

Vektor: Klp3-MCS (**SEQ ID Nr.: 10**)

Bei dem Vektor Klp3-MCS (**SEQ ID Nr.: 10**) (Abb. 6) handelt es sich um einen *E. coli* Vektor, basierend auf YRp7, der in Hefen nicht autonom replizieren kann, da die ARS1 Sequenz deletiert wurde. Klp3-MCS (**SEQ ID Nr.: 10**) enthält den *K. lactis* *LAC4* Promotor und Sequenzen, die die Integration am *LAC4* Locus durch homologe Rekombination ermöglichen.

Zwischen *LAC4* Promotor und Transkriptionsstart wurde ein DNA Abschnitt inseriert, der den *TEF1* Terminator und den *KIGAL80* Promotor enthält. Dadurch kann der *LAC4* Leserahmen nach Rekonstitution über homologe Rekombination unter der

Kontrolle des *KIGAL80* Promotors exprimiert werden. Der *KIGAL80* Promotor wird über den Transkriptionsfaktor *KiGal4* mit dem *LAC4* Promotor ko-reguliert (Zenke et al. 1993). Diese Konstruktion ermöglicht es, über Messung der *LAC4* codierten β-Galactosidase, die Induktion der Fremdgenexpression zu verfolgen. Klp3-MCS (**SEQ ID Nr.: 10**) erlaubt die Insertion des Fremdgens zwischen *LAC4* Promotor und *TEF1* Terminator über eine der unikalen Schnittstellen in der *multiple cloning site* (MCS) (**Abb. 6**). Zur Integration wird das resultierende Plasmid mit geeigneten Restriktionsenzymen verdaut, sodass die Expressionskassette von den *E. coli* Vektorsequenzen getrennt wird. Nach Transformation in *K. lactis* VAK367-D4 wird die Expressionskassette chromosomal integriert; die resultierenden Stämme enthalten keine bakteriellen Sequenzen.

*3: K. lactis Variante, die das VP2-Antigen des Virus der infektiösen Bursitis (IBDV Variante D78) exprimiert.*

#### *Herstellung des rekombinanten Hefestamms*

Die cDNA, die für IBDV D78 VP2 kodiert, wurde aus dem Plasmid pD78A (Icard et al., 2008) mit Hilfe der folgenden Oligonukleotide amplifiziert:

IBDV\_Ascl\_fwd (5'-GGCGCGCCGATGACAAACCTGCAAGATC-3') (**SEQ ID NR.: 7**), enthaltend eine *Ascl* Restriktionschnittstelle, und

VP2\_NotI\_rev (5'-ATAAGAATGCGGCCGCTCACACAGCTATCCTCCTTATG-3') (**SEQ ID NR.: 8**) enthaltend eine *NotI* Restriktionsschnittstelle.

Für die Generierung von VP2-T2S wurde folgendes Oligonukleotidpaar verwendet:

IBDV\_S:T\_Ascl\_fwd (5'-GGCGCGCCGATGTCTAACCTGCAAGATCAAACCCA-3') (**SEQ ID NR.: 9**), und VP2\_NotI\_rev (s.o.).

Die so amplifizierten DNA Fragmente wurden nach Überprüfung und Bestätigung der Nukleotidsequenzen über die *Ascl* und *NotI* Schnittstellen in den Vektor Klp3-MCS (**SEQ ID Nr.: 10**) (**Abb. 6**) kloniert. Danach erfolgte die Integration in das Genom (**Abb. 1**). Im Einzelnen wurde das Integrationsplasmid mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* verdaut und die verdauten Fragmente in kompetente VAK367-D4 Zellen transformiert. Die transformierten Zellen wurden auf YEPD Medium plattiert und über Nacht bei 30°C inkubiert. Für das Auffinden von positiven Kolonien wurde die Transformationsplatte auf SM Medium, das Laktose als Kohlenstoffquelle enthielt,

dupliziert und für 2 Tage bei 30°C inkubiert. Die bei diesem Verfahren identifizierten positiven Klone wurden weiter untersucht.

Die genomische Integration von zusätzlichen *KIGAL4* Genkopien wurde nach einer konventionellen Methode durchgeführt (Kuger et al. (1990). Die Codon-Optimierung folgte einem *Saccharomyces cerevisiae* Algorithmus (mr.gene.com, Raab et al., 2010). Die Codon-optimierten DNA Fragmente wurden direkt synthetisiert. Bei der Synthese wurden die 5' *Ascl* und 3' *NotI* Restriktionsschnittstellen bereits eingebaut (mr.gene.com, Regensburg, Deutschland). Anschließend erfolgte die Klonierung in den Vektor Klp3-MCS (**SEQ ID Nr.: 10**).

*Western Blot Analyse.*

Zellpellets wurden in B60 Puffer (50 mM HEPES-KOH pH 7.3; 60 mM Kaliumacetat; 5 mM Magnesiumacetat; 0,1 % Triton X100; 10 % Glycerol; 1 mM Natriumfluorid; 20 mM Glycerolphosphat; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM DTT; Protease Komplettinhibitor (Roche)) resuspendiert und durch kräftiges Mixen mit Glasperlen aufgeschlossen. Der Extrakt wurde zentrifugiert (14000 U/min, 20 min bei 4°C) und die Proteinkonzentration bestimmt. 40 µg des Proteinextraktes wurden mittels SDS-PAGE in einem 12% Gel getrennt. Danach wurden die Proteine auf eine Membran übertragen. Die Western Blot Analysen wurden mit einem α-IBDV Antiserum aus Kaninchen (1:15,000; Granzow et al., 1997) und einem Ziegen-α-Kaninchen HRP-gekoppelten Antikörper (1:3000, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) unter Nutzung konventioneller Methoden durchgeführt.

*Northern Blot Analyse.*

Für die vollständige Extraktion der RNA wurden 5 ml einer Hefekultur auf Eis gekühlt. Die Zelllyse wurde in Prot K Puffer (100 mM Tris/ HCl pH 7.9, 150 mM NaCl, 25 mM EDTA, 1 % SDS) und 50 mg Proteinase K (Fermentas) unter starkem Schütteln mit Glasperlen durchgeführt. Die Proben wurden 1 h bei 35 °C inkubiert und die RNA extrahiert, mit Ethanol gefällt und in DEPC Wasser resuspendiert. Die Northern-Analyse wurde wie in Engler-Blum et al., 1993 beschrieben, allerdings mit einigen Abweichungen, durchgeführt. 5 µg der totalen RNA wurden auf einem 1 % Formaldehyd-Agarosegel getrennt und auf eine Nylon Membran (Amersham HybondTM-N+, GE Healthcare) übertragen. Die Membran wurde bei 68°C mit einer DIG-markierten RNA Sonde inkubiert, die durch *in vitro* Transkription von PCR

Fragmenten in Anwesenheit von DIG-NTPs (Roche) hergestellt wurde. Der Blot wurde mit einer Blockierungslösung behandelt und mit einem anti-DIG alkalische-Phosphatase-konjugiertem Antikörper (Roche) inkubiert. Die Bestimmung der Aktivität der alkalischen Phosphatase wurde mittels konventioneller Methoden durchgeführt.

*Quantifizierung von heterolog exprimiertem VP2.*

Verwendet wurde ein modifiziertes Protokoll nach Saugar et al., 2005. 2000 ODE einer Hefekultur, die mit einem episomalen VP2 Plasmid (pADH1-P\_VP2-T2S) transformiert war, wurden auf selektivem Medium (0,67% YNB, 2% Glukose und folgende Zusätze: 11 mg/l Ade; 14 mg/l Tyr; je 38 mg/l His, Trp, Arg, Met; 48 mg/l Phe; je 58 mg/l Leu, Ile, Lys, Val, Thr) über Nacht kultiviert. Nach Ernte und Waschen mit destilliertem Wasser wurden die Zellen mit Glasperlen in Lysispuffer (10 mM Tris (pH 8.0), 150 mM NaCl, 20 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, Protease Komplettinhibitor (Roche), pH 8.0) aufgeschlossen. Der resultierende Proteinextrakt wurde zentrifugiert (10,000g für 1h bei 4°C) und die lösliche Fraktion auf ein 20% (w/v) Sucrosekissen in Sucrosepuffer geschichtet (10mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 20 mM CaCl<sub>2</sub>; enthielt Protease Komplettinhibitor (Roche)). Nach Zentrifugation bei 170.000 g für 3 h bei 4°C wurde das Pellet in 200 µl Sucrosepuffer gelöst und weitere 17 h bei 114.000 g in einem 20 bis 53 % Sucrosegradienten in Sucrosepuffer zentrifugiert. Der Gradient wurde in 700 µl Fraktionen aufgefangen und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Oligomere Proteinkomplexe des heterolog exprimierten VP2 konnten auf diese Weise konzentriert und aufgereinigt werden. Das Protein konnte nachgewiesen und die Proteinmenge mittels SDS PAGE und Coomassie Färbung im Vergleich zu einem Standardprotein bestimmt werden (nicht gezeigt). Das so gereinigte VP2 wurde dann als Standard in einem vergleichenden Western Blot mit anti-VP2 Antikörper eingesetzt. Verglichen wurde die VP2 Menge einer definierten Zahl von Hefezellen aus verschiedenen Fermentationen (Abb. 3).

*Hefefermentation und Hitzeinaktivierung.*

Alle experimentellen Fermentationen wurden in einem DasGip Parallelbioreaktorsystem (DasGip AG, Jülich, Deutschland) mit vier voll ausgerüsteten 2l Fermentoren durchgeführt. Fermentationen im Produktionsmaßstab wurden durch die Firma Organobalance GmbH (Berlin, Deutschland) oder im eigenen Labor in

einem Biostat ED Bioreactor (B. Braun Biotech, Melsungen, Deutschland) mit 10 l Arbeitsvolumen durchgeführt. Alle Produktionsprozesse wurden im Fed-Batch Verfahren durchgeführt. Es wurde ein komplexes Kulturmedium mit 2% Hefe-Extrakt und 1% Pepton und eine 20%ige Lactose-Feed-Lösung benutzt. Die Temperatur der Hefekultur wurde bei 30°C gehalten und der pO<sub>2</sub> wurde auf 30% Sättigung gesteuert. Der pH-Wert wurde während der Fermentation auf 5.0 durch Zugabe von 2M NaOH oder 2M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> gehalten.

Für die *in vivo* Experimente in Mäusen und Hühnern wurden die Hefen gefriergetrocknet und danach für 2 h bei 90°C hitzeinaktiviert. Nach Nutzung dieses Verfahrens waren weniger als 10 Zellen pro Gramm Zelltrockengewicht lebensfähig.

#### *4. Subkutane Applikation in Mäusen*

Für die subkutane Applikation einer *K. lactis* Variante, die das VP2-Antigen des Virus der infektiösen Bursitis (IBDV Variante D78) exprimiert (VAK890), in Mäusen wurde die getrocknete und pulverisierte Hefe für die erste Anwendung mit komplettem Freund-Adjuvant (CFA) gemischt; in den weiteren Anwendungen wurde die Hefe mit inkompletten Freund-Adjuvant (IFA) gemischt (100 µg Hefematerial pro 200 µl CFA oder IFA). 200 µl der Emulsionen (mit enthaltenen 100 µg Hefe) wurde pro Immunisierung/boost pro Individuum injiziert. Damit entsprach die pro subkutane Immunisierung an ein Mausindividuum verabreichte Menge an VP2 ca. 18 ng (Abb. 3) Nach der initialen Injektion (Tag 0) wurde zweimal in zwei Wochen-Intervallen „geboosted“ (an Tag 14 und 28; Abb. 4). Nach weiteren zwei Wochen wurden die Tiere zur Gewinnung des Blutserums durch Narkose getötet.

#### *5. Subkutane Applikation in Hühnern*

Für die subkutane Applikation in Hühnern wurden 5 mg der getrockneten und pulverisierten *K. lactis* Variante, die das VP2-Antigen des Virus der infektiösen Bursitis (IBDV Variante D78) exprimiert (VAK890), in 750 µl Phosphatpuffer/Saline (PBS) sowie 500 µl sterile destilliertem Wasser gelöst und eine Emulsion mit 1.25 ml IFA hergestellt. 500 µl dieser Emulsion (mit enthaltenen 1 mg Hefe) wurden an Tag 0, 14 sowie Tag 28 injiziert (Abb. 5). Damit entsprach die pro subkutane Immunisierung eines Huhnindividuums verabreichte Menge an VP2 ca. 180 ng (Abb. 3, 4).

#### 6. Virus "challenge"

Nach der Vakzinierung (Abb. 5) wurden Huhnimpflinge an Tag 42 über den oralen Weg mit 100 EID<sub>50</sub> des IBDV Stammes „Edgar“ infiziert und nach sechs Tagen die Mortalitätsrate bestimmt. Nach anschließender Tötung der Tiere unter Narkose wurden die Seren gewonnen und die Bursae der Tiere entnommen. Diese wurden zunächst für 24 Stunden in 10% neutral gepuffertem Formalin fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet.

#### 7. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Die IBDV spezifischen Antikörpertiter in den Seren der Impflinge wurden über einen käuflichen ELISA-Test bestimmt IDEXX FlockChek® IBD ELISA kit (IDEXX Laboratories, Inc.). Im Falle der Seren aus Mausimpflingen wurde ein vom Hersteller abweichender sekundärer Antikörper verwendet (Sigma Aldrich).

#### 8. Neutralisations-Assay.

Der Neutralisationsassay zur Bestimmung der Konzentration Virus-neutralisierender Antikörper wurde nach dem Protokoll von Schröder et al., 2000 durchgeführt.

#### 9. Immunhistochemie.

Aus den in Paraffin eingebetteten Bursae wurden 4 Mikrometer dicke Organschnitte hergestellt. Nach Entfernung des Paraffins wurden diese nach Standardprozeduren mit Haematoxylin und Eosin angefärbt. Die Proben wurden mikroskopisch untersucht und der sog. "Läsions score" in einer Skala von 1-4 bestimmt (1 = normal bis 10% follikuläre Atrophie; 2 = 10-30% follikuläre Atrophie; 3 = 30-70% follikuläre Atrophie; 4 = > 70% Atrophie).

### Ergebnisse

#### *Herstellung und Optimierung des IBDV VP2 exprimierenden K. lactis Stammes*

Es wurden verschiedene *K. lactis* Varianten mit integriertem IBDV VP2 Gen hergestellt. Für die Vakzinierungsexperimente wurde eine optimierte Variante verwendet, bei der das VP2 Protein an Aminosäureposition 2 mutiert war (Austausch Threonin gegen Serin; Jagadish et al. (1991)), und die eine zusätzliche tandem-Integration von mindestens zwei *KIGAL4* Genen enthielt (Variante VP2-T2S\_GAL4; Stamm VAK890). Durch die Mutation wurde das Fremdprotein zusätzlich stabilisiert;

durch die Überexpression des Trans-Aktivators konnte eine deutliche Steigerung der VP2 Expression erreicht werden (Abb. 2). Die Integration zusätzlicher *K/GAL4* Gene korrelierte auch mit einer höheren Wachstumsrate dieser *K. lactis* Variante. Die Wachstumsbedingungen für den betreffenden VP2-exprimierenden *K. lactis* Stamm VAK890 wurden optimiert, so dass sich die Hefe in hohen Dichten und mit reproduzierbarer Quantität an exprimiertem VP2 fermentieren ließ. Nach der Herstellung wurde die Hefe gefriergetrocknet und bei 90° C für 2 Stunden inaktiviert. Der Nachweis der Inaktivierung wurde geführt: Pro g inaktiviertem Hefematerial verblieben weniger als 10 lebende Hefezellen. Die Quantität an VP2 pro Hefezelle wurde bestimmt: Sie betrug mit dem Stamm VAK890 ca. 0.7 fg heterologes VP2 Protein pro Hefezelle (Abb. 3)

#### *Subkutane Applikation in Mäusen und Hühnern*

Die Immunisierungen wurden wie oben beschrieben durchgeführt; zwei Wochen nach der letzten Applikation wurden die Sera der behandelten Impflinge auf die Präsenz neutralisierender Antikörper hin untersucht. Dazu wurde ein IBDV-spezifischer ELISA verwendet und ein IBDV Neutralisationsassay durchgeführt (Abb. 4 und 5). Mit den vakzinierten Hühnern wurde zudem ein „Virus-challenge“ Experiment durchgeführt. Dazu wurde den Tieren eine Virusdosis von 100 EID50 pro Tier des stark virulenten IBDV Stamms „Edgar“ zugeführt, eine Konzentration, die bei nicht vakziniertem Geflügel zu einer signifikanten Bursitis mit einer Mortalitätsrate von ca. 10-35% (Abb. 5D) führt. Im Anschluss an das „Virus-challenge“ Experiment wurden die Bursae der Impflinge über Immunhistochemie auf Infektionsanzeichen und Läsionen in den Bursae hin untersucht und durch den sog. „Läsionen score“ (Abb. 5) charakterisiert.

Sowohl die Experimente mit Mäusen, als auch die Experimente mit Hühnern zeigten, dass durch die subkutane Applikation der *K. lactis* Stamm VAK890 hohe Titer Virus-neutralisierender Antikörper in praktisch allen behandelten Tieren erzeugt werden konnten (Abb. 4B, 4C; Abb. 5B, 5C). Ebenso konnte gezeigt werden, dass praktisch alle vakzinierten Huhnprobanden gegen Viruschallenge geschützt waren und praktisch keinerlei Zeichen einer Virusinfektion in ihren Bursae aufwiesen (Abb. 5). Alle subkutan mit dem *K. lactis* Stamm VAK890 inokulierten Tiere zeigten somit eine signifikante humorale Immunantwort gegen VP2. Diese Immunantwort war bereits nach einem einmaligen boost zu beobachten, woraus zu schließen ist, dass zwei

Injektionen, die zudem mit inkomplettem Freund Adjuvanz durchgeführt werden können (Immunisierung und ein boost), bereits ausreichend sind, um einen Schutz herzustellen. Zudem waren alle Huhnprobanden, die mit dem *K. lactis* Stamm VAK890 inkuliert waren, gegen eine nachfolgende Virusinfektion geschützt (**Abb. 5**).

**Abkürzungen**

ARS1	autonom replizierende Sequenz; Nukleotidsequenz auf der DNA, an dem die Replikation eingeleitet wird
Asc I	Restriktionsendonuklease Asc I
CFA	komplettes Freund-Adjuvant
DNA	Deoxyribonucleic acid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG-NTP	Digoxigenin-Nukleotidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DTT	Dithiothreithol
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EcoRI	Restriktionsendonuklease EcoR I
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
EID50	Egg oder Embryo Infectious dose – Anzahl an infektiösen Viren, die notwendig ist, um bei 50% infizierter Eier eine Infektion auszulösen
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
GAL4	hefespezifischer Transkriptionsaktivator
GRAS	generally regarded as safe
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Hpa I	Restriktionsendonuklease Hpa I
HRP	horseradish peroxidase
IBDV	Virus der Infektiösen Bursitis
IFA	inkomplettes Freund-Adjuvant
<i>K. lactis</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>
KIGAL4	<i>K. lactis</i> Gen codierend für das KIGal4/Lac9 Protein
KIGAL80	<i>K. lactis</i> Gen codierend für das KIGal80 Protein
LAC4	<i>K. lactis</i> Gen codierend für ein $\beta$ -Galactosidase-Enzym
Not I	Restriktionsendonuklease Not I
ODE	Optische Dichte Einheit
PBS	Phosphatpuffer/Saline
PCR	Polymerase chain reaction
RNA	Ribonucleic acid
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Sal I	Restriktionsendonuklease Sal I

SDS	Sodiumdodekylsulfat
SDS-PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese unter Verwendung von SDS
TEF1	<i>Arxula adeninivorans</i> Gen codierend für den Translationsfaktor EF-1alpha
VP2	Capsidbildendes Virusprotein des IBDV
VP2-T2S	VP2 mit einem Aminosäureaustausch Threonin gegen Serin an Position 2
VAK	Vakzinstamm
YEPD	Yeast Extract Peptone Dextrose
YRp7	<i>S. cerevisiae</i> - <i>E.coli</i> shuttle Vektor, Genbank Accession U03501 (Botstein et al., 1979)

**Referenzliste**

Backhaus, K. et al. Milk and sugar: Regulation of cell wall synthesis in the milk yeast *Kluyveromyces lactis*. *European Journal of Cell Biology* **90**, 745-750 (2011).

Bathurst, I.C. Protein Expression in Yeast as an Approach to Production of Recombinant Malaria Antigens. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **50**, 20 -26 (1994).

Botstein D, Falco, S.C., Stewart, S.E., Brennan, M., Scherer, S., Stinchcomb, D.T., Struhl, K. & Davis, R.W. Sterile host yeast (SHY): a eukaryotic system of biological containment for recombinant DNA experiments. *Gene* **8**, 17-24 (1979).

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

Chen, X.J. & Clark-Walker, G.D. Specific mutations in alpha- and gamma-subunits of F1-ATPase affect mitochondrial genome integrity in the petite-negative yeast *Kluyveromyces lactis*. *EMBO Journal* **14**, 3277-3286 (1995).

Clark-Walker, G.D. The F1-ATPase inhibitor Inh1 (IF1) affects suppression of mtDNA loss-lethality in *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Research* **7**, 665-674 (2007).

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

Engler-Blum, G., Meier, M., Frank, J. & Muller, G.A. Reduction of background problems in nonradioactive northern and southern blot analyses enables higher sensitivity than 32P-based hybridizations. *Analytical Biochemistry* **210**, 235-244 (1993).

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

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

Jagadish, M.N., Laughton, D.L., Azad, A.A. & Macreadie, I.G. Stable synthesis of viral protein 2 of infectious bursal disease virus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **108**, 275-279 (1991).

Icard, A.H., Sellers, H.S., & Mundt, E. Detection of infectious bursal disease virus isolates with unknown antigenic properties by reverse genetics. *Avian Disease* **52**, 590-598. (2008)

Kuger, P., Gödecke, A. & Breunig, K.D. A mutation in the Zn-finger of the GAL4 homolog LAC9 results in glucose repression of its target genes. *Nucleic Acids Research* **18**, 745-751 (1990).

Lu, Y. et al. Mutation-Selective Tumor Remission with Ras-Targeted, Whole Yeast-Based Immunotherapy. *Cancer Research* **64**, 5084 -5088 (2004).

Raab, D., Graf, M., Notka, F., Schödl, T. & Wagner, R. The GeneOptimizer Algorithm: using a sliding window approach to cope with the vast sequence space in multiparameter DNA sequence optimization. *Systems and Synthetic Biology* **4**, 215-225 (2010).

Raschke, W.C. & Ballou, C.E. Characterization of a yeast mannan containing N-acetyl-D-glucosamine as an immunochemical determinant. *Biochemistry* **11**, 3807-3816 (1972).

Sauger, I. et al. Structural polymorphism of the major capsid protein of a double-stranded RNA virus: An Amphipathic [alpha] Helix as a Molecular Switch. *Structure* **13**, 1007-1017 (2005).

Schröder, A., van Loon, A.A.W.M., Goovaerts, D. & Mundt, E. Chimeras in noncoding regions between serotypes I and II of segment A of infectious bursal disease virus are viable and show pathogenic phenotype in chickens. *Journal of General Virology* **81**, 533-540 (2000).

Stubbs, A.C. et al. Whole recombinant yeast vaccine activates dendritic cells and elicits protective cell-mediated immunity. *Nature Medicine* **7**, 625-629 (2001).

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

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

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

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

Zenke, F.T., Zachariae, W., Lunkes, A., & Breunig, K.D. Gal80 proteins of *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae* are highly conserved but contribute differently to glucose repression of the galactose regulon. *Molecular and Cellular Biology* **13**, 7566-7576 (1993)

## Patentansprüche

1. Rekombinante Hefe der Spezies *Kluyveromyces lactis*, die ein Fremdgen trägt und die die Expression von Fremdproteinen ermöglicht, dadurch gekennzeichnet, dass die rekombinante Hefe der Spezies *Kluyveromyces lactis* zur Erzeugung einer protektiven humoralen Immunantwort verwendet wird.
2. Rekombinante Hefe nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die rekombinanten Hefen als *subunit* Markervakzine verwendet wird.
3. Rekombinante Hefe nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die *subunit* Markervakzine dafür verwendet werden, vakzinierte gegenüber natürlich infizierten Individuen zu unterscheiden.
4. Rekombinante Hefe nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass die *subunit* Markervakzine zugleich stark adjuvierende Eigenschaften aufweisen.
5. Rekombinante Hefe nach einem der Ansprüche 2 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die *subunit* Markervakzine stark immunogen sind.
6. Rekombinante Hefe nach einem oder mehreren der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Integration des Fremdgens ohne zusätzliche Vektorsequenzen oder Selektionsmarker erfolgt ist.
7. Rekombinante Hefe nach einem oder mehreren der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Fremdgenexpression konstitutiv erfolgt.
8. Rekombinante Hefe nach einem oder mehreren der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Fremdgenexpression induzierbar ist.
9. Rekombinante Hefe nach einem oder mehreren der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Fremdgenexpression indirekt über die Expression eines endogenen Reportergens quantifiziert werden kann.

10. Rekombinante Hefe nach einem oder mehreren der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Fremdgen die Expression von Fremdproteinen mit antigenen Eigenschaften ermöglicht.
11. Rekombinante Hefe nach einem oder mehreren der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die rekombinante Hefe induzierbar oder konstitutiv signifikante Quantitäten eines Fremdproteins oder Domänen dieses Fremdproteins oder Domänen dieses Fremdproteins fusioniert mit artfremden Proteindomänen exprimiert.
12. Rekombinante Hefe nach einem oder mehreren der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der *Kluyveromyces lactis* Stamm *Kluyveromyces lactis* VAK367-D4 (DSM 23097) oder eine Variante davon ist.
13. Rekombinante Hefe nach einem oder mehreren der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Fremdprotein von einem Krankheitserreger oder einem Tumor stammt.
14. Rekombinante Hefe nach einem oder mehreren der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Fremdprotein ein Tumor-assoziierte Antigen ist, ausgewählt aus CEA, 5T4, MUC1, MART1 und HER-2.
15. Rekombinante Hefe nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass das Fremdprotein von einem Virus, einem Bakterium oder einem Parasiten stammt.
16. Rekombinante Hefe nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass das Fremdprotein von einem Parasiten stammt.
17. Rekombinante Hefe nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass das Fremdprotein von *Necator americanus*, *Ancylostoma duodenale*, *Leishmania spec.*, *Plasmodium spec.* oder *Schistosoma spec.* stammt.

18. Rekombinante Hefe nach Anspruch 16 oder 17, dadurch gekennzeichnet dass das Fremdprotein ausgewählt ist aus der Gruppe, umfassend

*Necator americanus* oder *Ancylostoma duodenale*: ASP Protein und Hämoglobin-abbauende Proteasen;

*Leishmania* spec.: gp63, 46 kD Promastigot-Antigen, LACK;

*Plasmodium* spec.: CSP protein, 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* spec.: TP1, Sm23, ShGSTs 26 und 28, Paramyosin, Parasiten-Myosin, Sm14.

19. Rekombinante Hefe nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass das Fremdprotein von einem Bakterium stammt.

20. Rekombinante Hefe nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass das Fremdprotein von *Mycobakterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori*, *Streptococcus* spec. der Gruppe A, *Streptococcus pneumonia*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella* spec., *Vibrio cholera*, *Escherichia coli* oder *Yersinia pestis* stammt.

21. Rekombinante Hefe nach Anspruch 19 oder 20, dadurch gekennzeichnet, dass das Fremdprotein ausgewählt ist aus der Gruppe, umfassend:

*Mycobakterium tuberculosis*: Ag85A, Hsp65, R8307, 19 kD, 45 kD, 10.4;

*Helicobacter pylori*: VacA, LagA, NAP, hsp, Urease, Katalase;

*Streptococcus* spec. der Gruppe A: M, SCPA Peptidase, Exotoxine SPEA und SPEC, Fibronectinbindungsprotein;

*Streptococcus pneumonia*: PspA, Psa A, BHV 3, BHV 4;

*Salmonella typhimurium*: Vi Antigen;

*Shigella* spec.: LPS ;

*Vibrio cholera* CTB;

*Escherichia coli*: ETEC: LT, LT-ST, CTB; und

*Yersinia pestis*: F1 und V.

22. Rekombinante Hefe nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass das Fremdprotein von einem Virus stammt.

23. Rekombinante Hefe nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass das Fremdgen die Expression viraler Proteine mit antigenen Eigenschaften ermöglicht.
24. Rekombinante Hefe nach Anspruch 22 oder 23, dadurch gekennzeichnet, dass das Fremdgen die Expression von viralen Strukturproteinen ermöglicht.
25. Rekombinante Hefe nach einem oder mehreren der Ansprüche 22 bis 24, dadurch gekennzeichnet, dass das Fremdprotein von den *Birnaviridae*, *Caliciviridae*, *Reoviridae*, *Retroviridae*, *Flaviviridae*, *Flaviviridae*, *Hepadnaviridae*, *Paramyxoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Herpesviridae*, *Coronaviridae*, *Orthomyxoviridae* oder *Papillomaviridae* stammt.
26. Rekombinante Hefe nach einem oder mehreren der Ansprüche 22 bis 25, dadurch gekennzeichnet, dass das Fremdprotein ausgewählt ist aus der Gruppe, umfassend:

*Birnaviridae*: VP2

*Caliciviridae* (Norwalk, HEV): NV 60 kD; HEV ORF2;

*Reoviridae* (Rota): VP7, VP4;

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

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

*Flaviviridae* (genus Pestivirus BVDV, CSFV, BDV. Genus Hepacivirus HCV): E1, E2, E<sup>RNS</sup> (Pesti), C, NS3, NS4, NS5;

*Hepadnaviridae* (HBV): HBS Antigen;

*Paramyxoviridae* (*Paramyxovirinae*: PIV-1, PIV-2, Mumps, Sendai, PIV-2, PIV-4, Morbilli): M, HN, N, F;

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

*Rhabdoviridae* (Rabies): G;

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

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

*Orthomyxoviridae* (Influenza A, B): HA, NA, M1, M2, NP; und

*Papillomaviridae*: L2, E6, E7.

27. Rekombinante Hefe nach einem oder mehreren der Ansprüche 22 bis 26, dadurch gekennzeichnet, dass das Fremdprotein von einem Vertreter der Familie *Birnaviridae* stammt.
28. Rekombinante Hefe nach einem oder mehreren der Ansprüche 22 bis 27, dadurch gekennzeichnet, dass das Fremdprotein das VP2-Antigen des Virus der Infektiösen Bursitis (IBDV) ist.
29. Rekombinante Hefe nach einem oder mehreren der Ansprüche 22 bis 28, dadurch gekennzeichnet, dass das VP2-Antigen vom Virus der Infektiösen Bursitis (IBDV) Stamm D78 stammt.
30. Rekombinante Hefe nach einem oder mehreren der Ansprüche 22 bis 29, dadurch gekennzeichnet, dass das VP2-Antigen des Virus der Infektiösen Bursitis (IBDV) durch eine Nukleotidsequenz, ausgewählt aus SEQ ID NR.: 1, SEQ ID NR.: 3 und SEQ ID NR.: 5, kodiert wird.
31. Rekombinante Hefe nach einem oder mehreren der Ansprüche 22 bis 30, dadurch gekennzeichnet, dass das VP2-Antigen des Virus der Infektiösen Bursitis (IBDV) eine Aminosäuresequenz, ausgewählt aus SEQ ID NR.: 2, SEQ ID NR.: 4 und SEQ ID NR.: 6, aufweist.
32. Rekombinante Hefe nach einem oder mehreren der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der *Kluyveromyces lactis* Stamm ausgewählt ist aus:  
*Kluyveromyces lactis* VAK367-D4 890 DSM 25405,  
*Kluyveromyces lactis* VAK367-D4 910 DSM 25406, und  
*Kluyveromyces lactis* VAK367-D4 911 DSM 25407.
33. Rekombinante Hefe nach einem oder mehreren der Ansprüche 22 bis 31, dadurch gekennzeichnet, dass das Fremdprotein ein mutiertes VP2-Antigen des Virus der Infektiösen Bursitis (IBDV) ist.

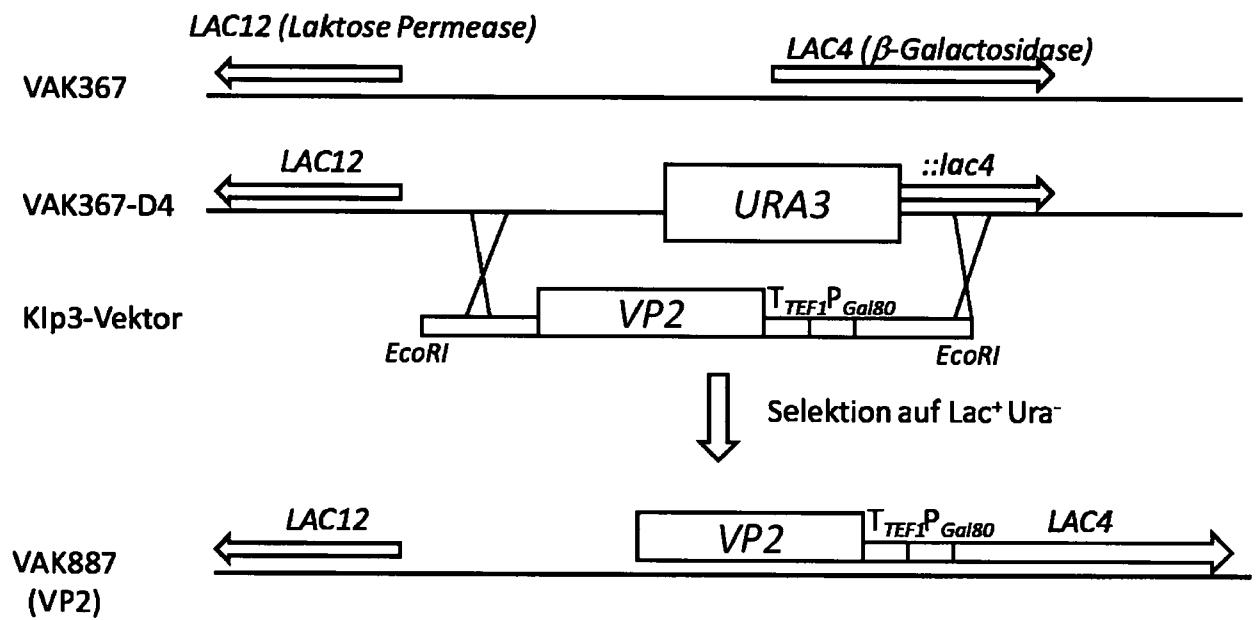
34. Rekombinante Hefe nach einem oder mehreren der Ansprüche 22 bis 32, dadurch gekennzeichnet, dass das Fremdprotein ein Codon-optimiertes VP2-Antigen des Virus der Infektiösen Bursitis (IBDV) ist.
35. Rekombinante Hefe nach einem oder mehreren der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der *Kluyveromyces lactis* Stamm ausgewählt ist aus *Kluyveromyces lactis* VAK890, VAK910 und VAK911.
36. Verwendung einer rekombinante Hefe gemäß einem oder mehrerer der Ansprüche 1-35 in einem Verfahren zur subkutanen Vakzinierung.
37. Verfahren zur subkutanen Vakzinierung mittels rekombinanter Hefen, dadurch charakterisiert dass das Verfahren die folgenden Schritte umfasst:
- Anzucht und Vermehrung der rekombinanten Hefen,
  - Ernte und Inaktivierung der Hefen,
  - Applikation der rekombinanten Hefen gemäß einem festzulegenden Immunisierungsschema,
  - Titerbestimmung der gebildeten Antikörper und/oder
  - Nachweis der Immunisierung.
38. Verfahren zur subkutanen Vakzinierung mittels rekombinanter Hefen, dadurch gekennzeichnet, dass in dem Verfahren eine rekombinante Hefe gemäß einem oder mehrerer der Ansprüche 1-35 verwendet wird.
39. Verfahren nach Anspruch 37 oder 38, dadurch gekennzeichnet, dass mittels subkutaner Applikation kompletter Hefezellen einer rekombinanten Hefe nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 35 eine spezifische Immunisierung gegen exprimiertes Fremdprotein erzeugt wird.
40. Verfahren nach Anspruch 39, dadurch gekennzeichnet, dass eine spezifische Immunisierung gegen ein Fremdprotein von einem Krankheitserreger oder einem Tumor erzeugt wird.

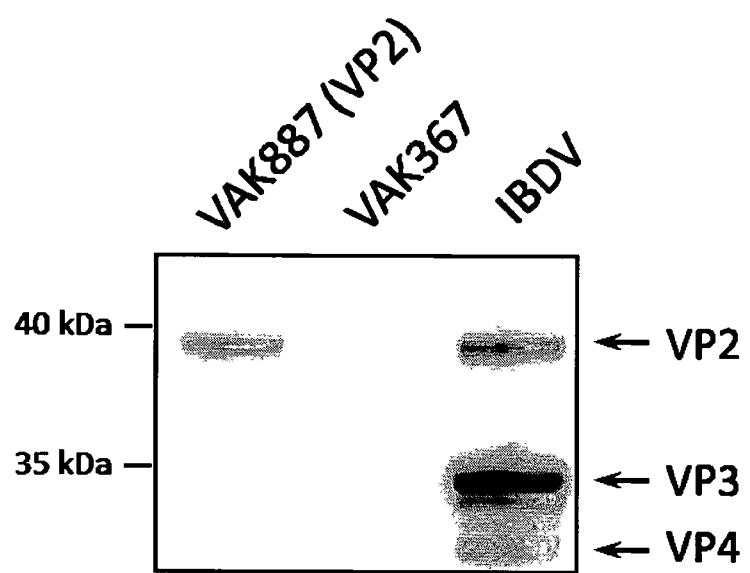
41. Verfahren nach Anspruch 40, dadurch gekennzeichnet, dass das Fremdprotein von einem Parasiten, einem Bakterium oder Virus nach einem der Ansprüche 13 bis 31 stammt.
42. Verfahren nach Anspruch 39, dadurch gekennzeichnet, dass eine spezifische Immunisierung gegen ein cytotoxisches Antigen erzeugt wird.
43. Verfahren nach einem der Ansprüche 37 bis 42, dadurch gekennzeichnet, dass mittels subkutaner Applikation kompletter Hefezellen einer rekombinanten Hefe nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 35 eine humorale Immunisierung gegen exprimiertes Fremdprotein erzeugt wird.
44. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 37 bis 43, dadurch gekennzeichnet, dass mittels subkutaner Applikation kompletter Hefezellen einer rekombinanten Hefe nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 35 eine protektive humorale Immunisierung gegen exprimiertes Fremdprotein erzeugt wird.
45. Spezifisches ELISA-Verfahren zur Detektion und Quantifizierung einer Immunantwort gegen Fremdproteine gemäß einem oder mehreren der vorherigen Ansprüche .
46. ELISA-Verfahren nach Anspruch 45 zur Detektion und Quantifizierung einer Immunantwort gegen das IBDV VP2 Protein und/oder das mutierte IBDV VP2T2S Protein.
47. Verfahren zum Nachweis neutralisierender Antikörper aus Seren von Individuen, die nach einem der Ansprüche 37-44 immunisiert wurden.
48. Verfahren zum Nachweis neutralisierender Antikörper gegen das IBDV VP2 Protein und/oder das mutierte IBDV VP2-T2S Protein und/oder das Codon-optimierte oVP2-T2S Protein aus Seren von Individuen, die nach einem der Ansprüche 37-44 immunisiert wurden.

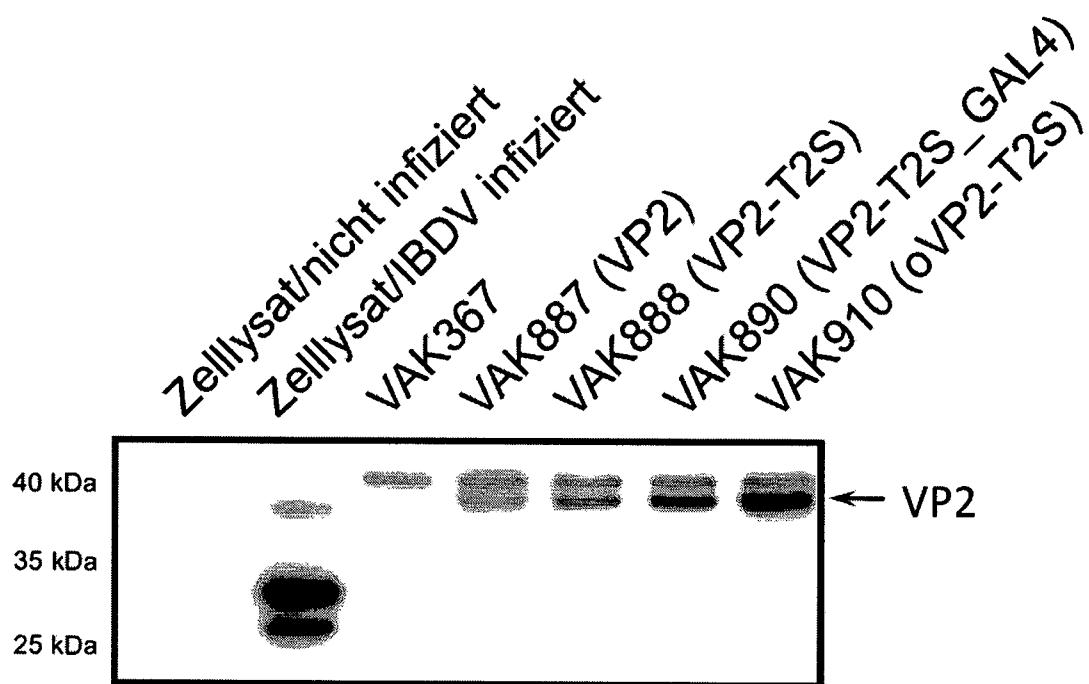
49. Verfahren zum Nachweis der Immunisierung nach einem der Ansprüche 37-44 über Challenge mit Antigen.
50. Verfahren zum Nachweis der Immunisierung nach einem der Ansprüche 37-44 über Challenge mit viralem Antigen oder Challenge mit Virus.
51. Verfahren zum Nachweis der Immunisierung nach einem der Ansprüche 37-44 über Challenge mit IBDV VP2 und/oder mutiertem IBDV VP2-T2S und/oder Codon-optimiertem oVP2-T2S Protein.
52. Oligonukleotid, das eine Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NR.: 7, SEQ ID NR.: 8 oder SEQ ID NR.: 9 aufweist.
53. Expressionsvektor, der ein Fremdgen trägt, dadurch gekennzeichnet, dass das Fremdgen die Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NR.: 1, SEQ ID NR.: 3 oder SEQ ID NR.: 5 aufweist.
54. Expressionsvektor nach Anspruch 53, dadurch gekennzeichnet, dass das Fremdgen die natürliche oder die codon-optimierten Nucleotidsequenz enthält, die für das IBDV VP2 Protein oder das IBDV VP2-T2S Protein codiert.
55. Expressionsvektor nach einem der Ansprüche 53 oder 54, dadurch gekennzeichnet, dass das Fremdgen für das IBDV VP2 Protein mit der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NR.: 2 oder das IBDV VP2-T2S Protein mit der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NR.: 4 kodiert.
56. Expressionsvektor nach einem der Ansprüche 53 bis 55, dadurch gekennzeichnet, dass der Expressionsvektor der Vektor Klp3 oder Klp3-MCS (**SEQ ID Nr.: 10**) ist.

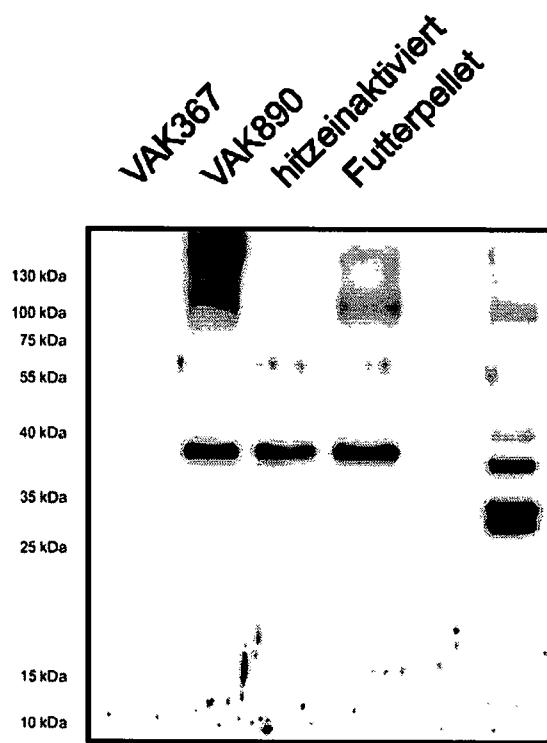
## Zeichnungen

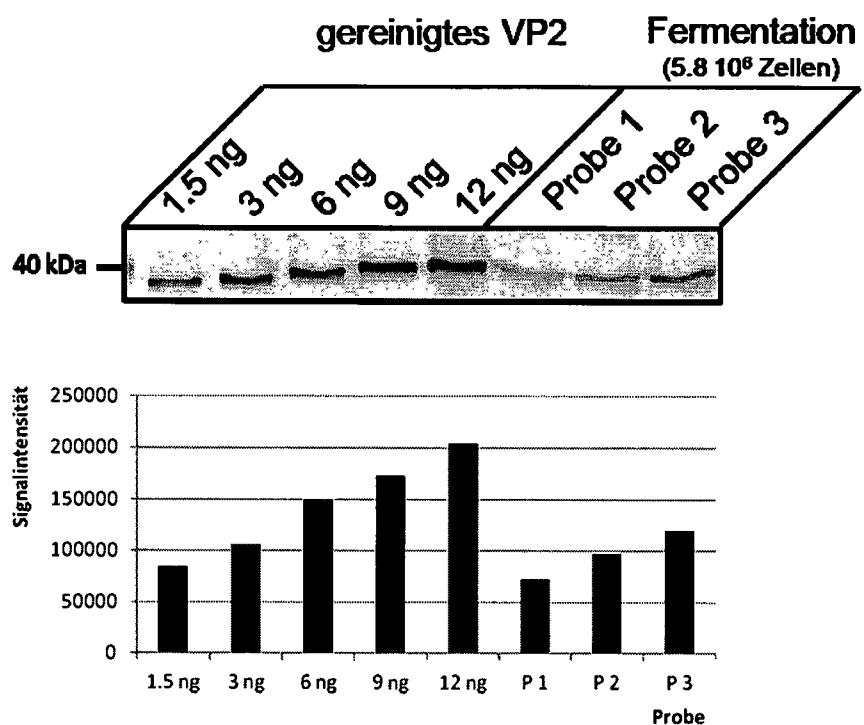
### Abbildung 1



**Abbildung 2A**

**Abbildung 2B**

**Abbildung 3A**

**Abbildung 3B**

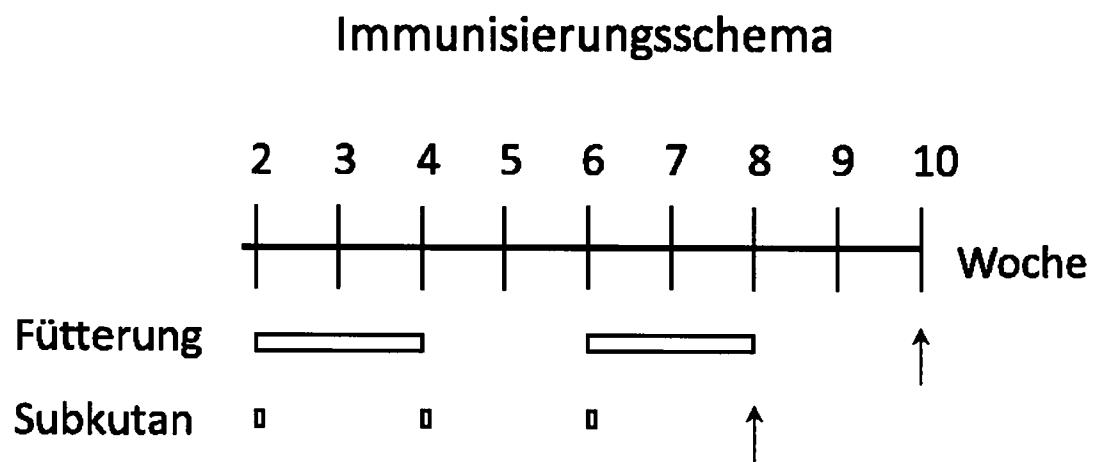
**Abbildung 4A**

Abbildung 4B

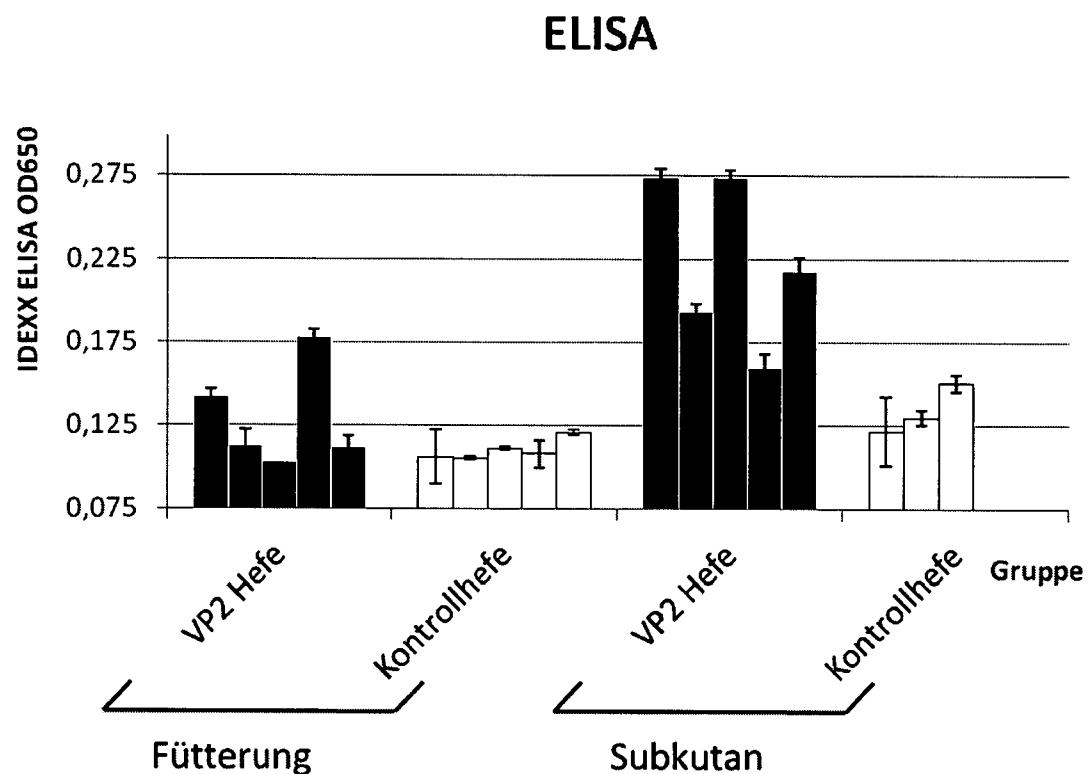
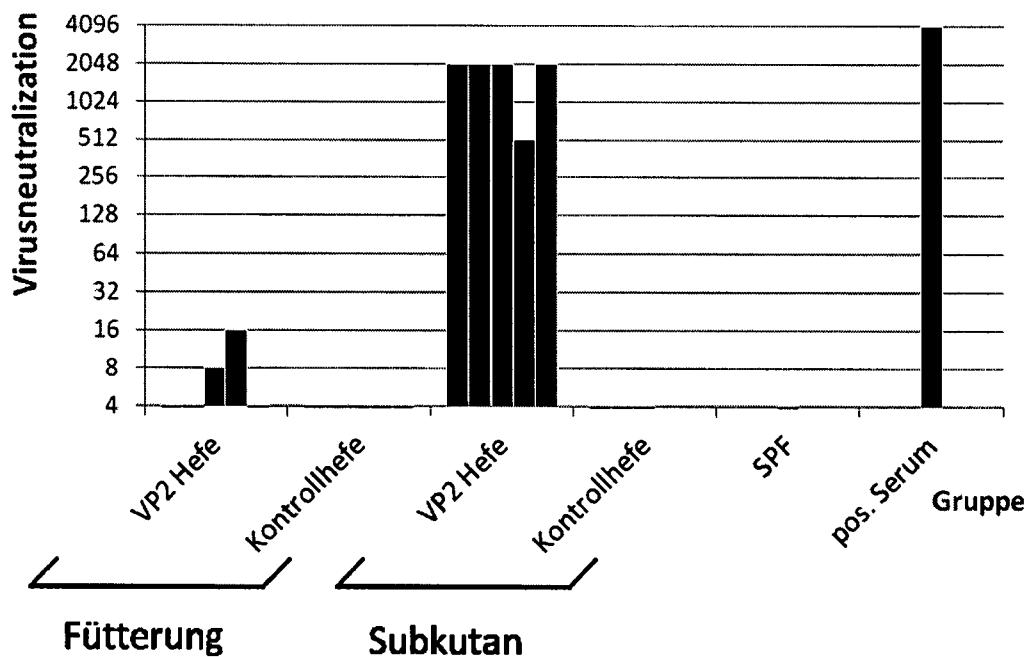


Abbildung 4C



**Abbildung 4D**

	<b>Gruppe</b>	<b>ELISA</b>	<b>VN Nr. positiv</b>
<b>Fütterung</b>	<b>VP2 Hefe</b>	<b>0.13 ± 0.031</b>	<b>40 %</b>
	<b>Kontrollhefe</b>	<b>0.11 ± 0.006</b>	<b>0 %</b>
<b>Subkutan</b>	<b>VP2 Hefe</b>	<b>0.22 ± 0.05</b>	<b>100 %</b>
	<b>Kontrollhefe</b>	<b>0.13 ± 0.015</b>	<b>0 %</b>

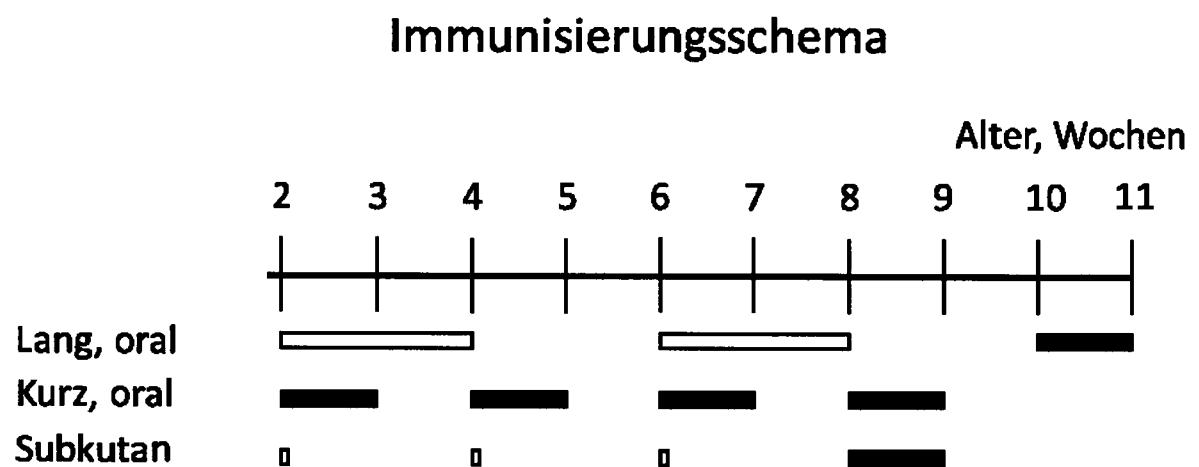
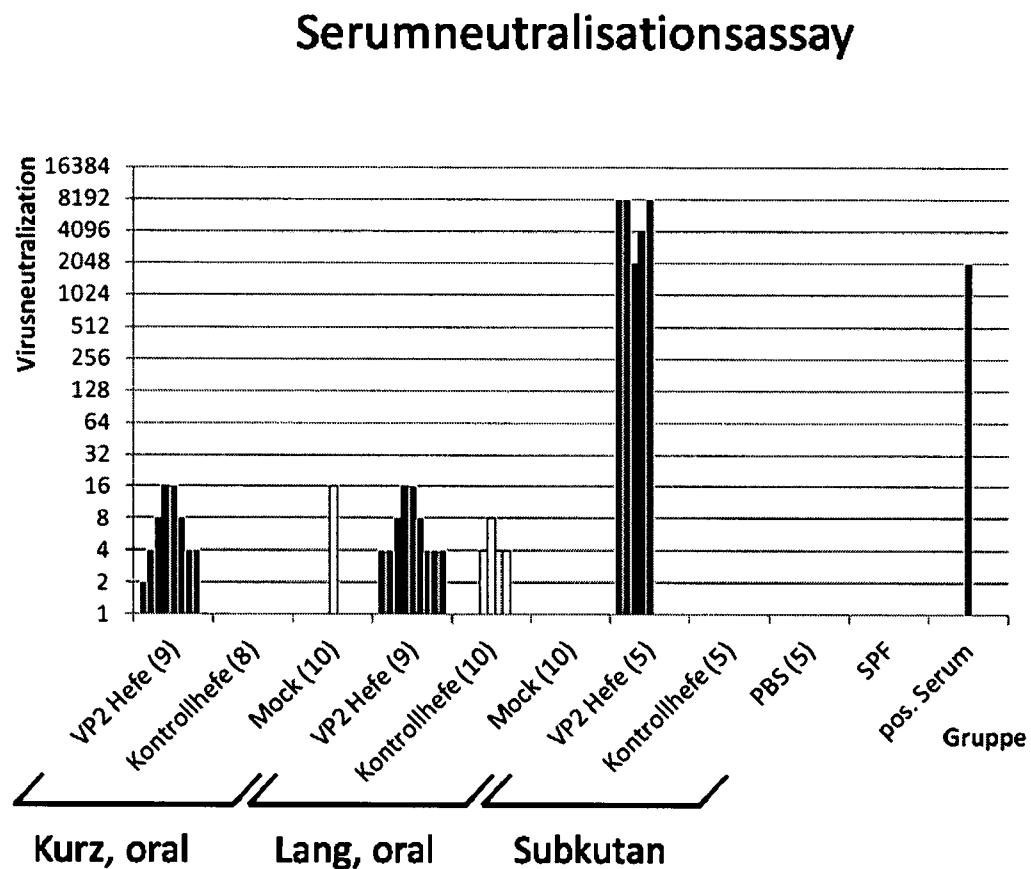
**Abbildung 5A**

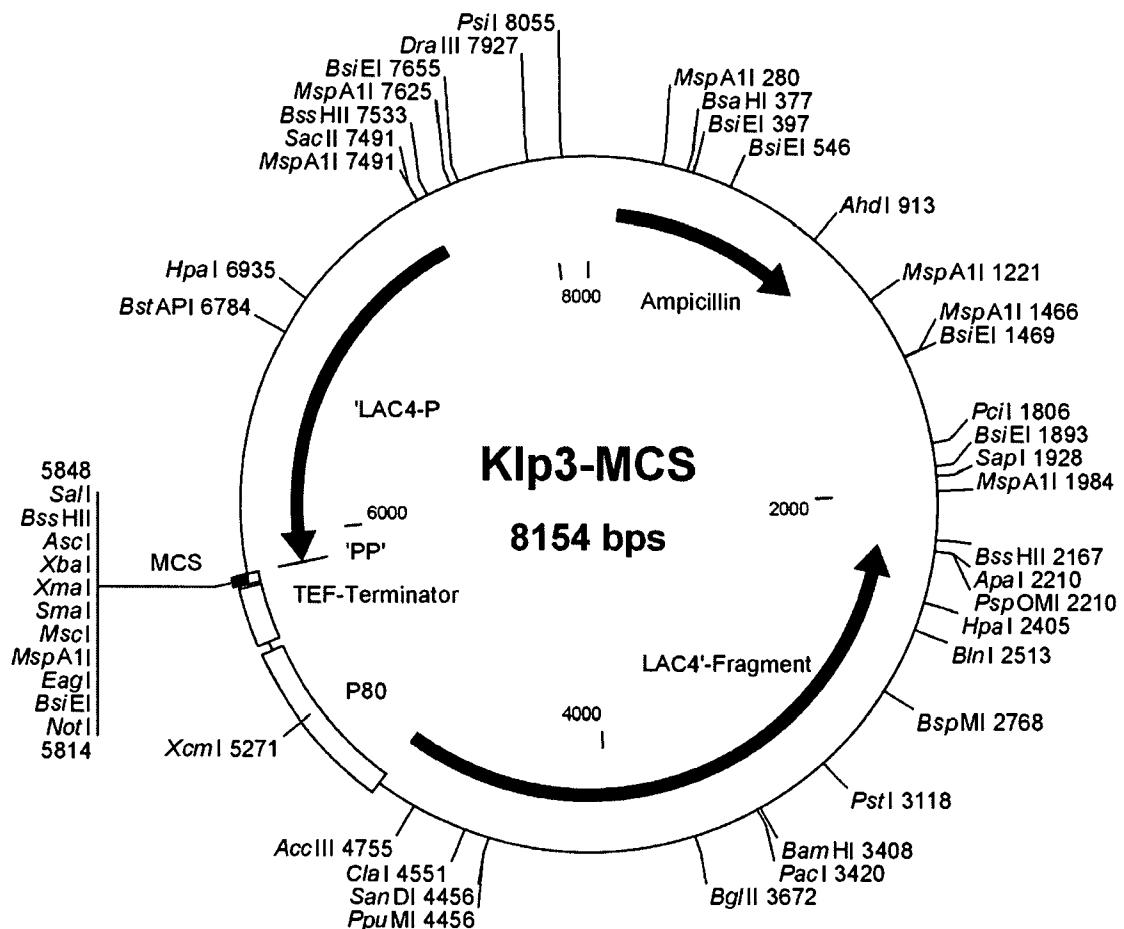
Abbildung 5B



## Abbildung 5C

Gruppe	ELISA (Titre)	VN	Mortalität	Läsionen Score
VP2 Hefe, Kurz (9)	1	6.89 ± 5.75	0/9	4, 4, 4, 4, 4, 4, 4
Kontrollhefe, Kurz (8)	1	0	3/8	4, 4, 4, 4, 4, 4, 4
Mock, Kurz (10)	1	1.6 ± 5.06	1/10	4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4
VP2 Hefe, Lang (9)	35.56 ± 36.12	7.56 ± 5.08	0/9	1, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4
Kontrollhefe, Lang (10)	9.4 ± 19.6	2 ± 2.91	1/10	4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4
Mock, Lang (10)	4 ± 2.58	0	0/10	4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4
VP2 Hefe, Lang, Saponin (10)	68.8 ± 70.87	6.8 ± 5.46	0/10	2, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4
Kontrollhefe, Lang, Saponin (9)	33.7 ± 38	0.89 ± 1.76	1/9	4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4
Mock, Lang, Saponin (9)	1	0	0/9	4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 4
VP2 Hefe (5)	2707 ± 823.4	3072 ± 1448.2	0/5	1, 1, 1, 1, 3
Kontrollhefe (5)	1	>8	1/5	4, 4, 4, 4, 4, 4
PBS (5)	1	>8	1/5	4, 4, 4, 4, 4, 4

Abbildung 6



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/DE2012/001205

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:
  - a. (means)  
 on paper  
 in electronic form
  - b. (time)  
 in the international application as filed  
 together with the international application in electronic form  
 subsequently to this Authority for the purposes of search
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/DE2012/001205

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
 INV. C12N15/81 A61K39/00 A61K39/12 A61K39/02 G01N33/569  
 ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
 C12N A61K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, FSTA

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2010/054649 A2 (UNIV HALLE WITTENBERG [DE]; BREUNIG KARIN [DE]; BEHRENS SVEN-ERIK [DE]) 20 May 2010 (2010-05-20) cited in the application the whole document -----	1-56
X	WO 90/15140 A1 (COMMW SCIENT IND RES ORG [AU]) 13 December 1990 (1990-12-13) the whole document -----	1-56
A	EP 1 752 468 A1 (CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACION [ES]; BIONOSTRA S L [ES]) 14 February 2007 (2007-02-14) the whole document ----- -/-	1-56

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
25 April 2013	14/05/2013
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Sirim, Pinar

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/DE2012/001205

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	VILLEGAS PEDRO ET AL: "Infectious bursal disease subunit vaccination.", AVIAN DISEASES DEC 2008, vol. 52, no. 4, December 2008 (2008-12), pages 670-674, XP002695513, ISSN: 0005-2086 the whole document -----	1-56
A	PITCOVSKI J ET AL: "Development and large-scale use of recombinant VP2 vaccine for the prevention of infectious bursal disease of chickens", VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, vol. 21, no. 32, 1 December 2003 (2003-12-01), pages 4736-4743, XP004469693, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/S0264-410X(03)00525-5 the whole document -----	1-56
A	STUBBS A C ET AL: "WHOLE RECOMBINANT YEAST VACCINE ACTIVATES DENDRITIC CELLS AND ELICITS PROTECTIVE CELL-MEDIATED IMMUNITY", NATURE MEDICINE, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, vol. 7, no. 5, 1 May 2001 (2001-05-01), pages 625-629, XP008073223, ISSN: 1078-8956, DOI: 10.1038/87974 cited in the application the whole document -----	1-56
A	STUBBS A C ET AL: "Recombinant yeast as a vaccine vector for the induction of cytotoxic T-lymphocyte responses", CURRENT OPINION IN MOLECULAR THERAPEUTICS, CURRENT DRUGS, LONDON, GB, vol. 4, no. 1, 1 February 2002 (2002-02-01), pages 35-40, XP008092368, ISSN: 1464-8431 cited in the application the whole document ----- ----- -/-	1-56

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/DE2012/001205

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WANSLEY ELIZABETH K ET AL: "Vaccination with a recombinant <i>Saccharomyces cerevisiae</i> expressing a tumor antigen breaks immune tolerance and elicits therapeutic antitumor responses", CLINICAL CANCER RESEARCH, THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 14, no. 13, 1 July 2008 (2008-07-01), pages 4316-4325, XP002587490, ISSN: 1078-0432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0393 cited in the application the whole document</p> <p>-----</p>	1-56
A	<p>BATHURST I C: "PROTEIN EXPRESSION IN YEAST AS AN APPROCH TO PRODUCTION OF RECOMBINANT MALARIA ANTIGENS", AMERICAN JOURNAL OF TROPICAL MEDICINE &amp; HYGIENE, AMERICAN SOCIETY OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE, US, vol. 50, no. 4, SUPPL, 1 January 1994 (1994-01-01), pages 20-26, XP001088993, ISSN: 0002-9637 cited in the application the whole document</p> <p>-----</p>	1-56
X, P	<p>ARNOLD MARINA ET AL: "Protective Vaccination against Infectious Bursal Disease Virus with Whole Recombinant <i>Kluyveromyces lactis</i> Yeast Expressing the Viral VP2 Subunit", PLOS ONE, vol. 7, no. 9, September 2012 (2012-09), XP002695514, ISSN: 1932-6203 the whole document</p> <p>-----</p>	1-56
A, P	<p>JORRIT-JAN KRIJGER ET AL: "A novel, lactase-based selection and strain improvement strategy for recombinant protein expression in <i>Kluyveromyces lactis</i>", MICROBIAL CELL FACTORIES, BIOMED CENTRAL, LONDON, NL, vol. 11, no. 1, 20 August 2012 (2012-08-20), page 112, XP021128994, ISSN: 1475-2859, DOI: 10.1186/1475-2859-11-112 the whole document</p> <p>-----</p>	1-56

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/DE2012/001205

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 2010054649	A2	20-05-2010	CN 102741414 A DE 102008057451 A1 DE 112009003267 A5 EP 2403947 A2 JP 2012508697 A US 2011293659 A1 WO 2010054649 A2	17-10-2012 20-05-2010 15-11-2012 11-01-2012 12-04-2012 01-12-2011 20-05-2010
WO 9015140	A1	13-12-1990	AU 643216 B2 AU 5731590 A EP 0474676 A1 WO 9015140 A1	11-11-1993 07-01-1991 18-03-1992 13-12-1990
EP 1752468	A1	14-02-2007	EP 1752468 A1 ES 2242542 A1 US 2007212375 A1 WO 2005105834 A1	14-02-2007 01-11-2005 13-09-2007 10-11-2005

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2012/001205

**Feld Nr. I Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz(en) (Fortsetzung von Punkt 1 c) auf Blatt 1)**

1. Hinsichtlich der Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz, die in der internationalen Anmeldung offenbart wurde, ist die internationale Recherche auf der Grundlage eines Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das
  - a. (Form)  
 in Papierform  
 in elektronischer Form
  - b. (Zeitpunkt)  
 in der eingereichten internationalen Anmeldung  
 zusammen mit der internationalen Anmeldung in elektronischer Form  
 bei dieser Behörde nachträglich für die Zwecke der Recherche eingereicht wurde.
2.  Wurden mehr als eine Version oder Kopie eines Sequenzprotokolls eingereicht, so sind zusätzlich die erforderlichen Erklärungen, dass die Information in den nachgereichten oder zusätzlichen Kopien mit der Information in der Anmeldung in der eingereichten Fassung übereinstimmt bzw. nicht über sie hinausgeht, vorgelegt worden.
3. Zusätzliche Bemerkungen:

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2012/001205

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
 INV. C12N15/81 A61K39/00 A61K39/12 A61K39/02 G01N33/569  
 ADD.

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
 C12N A61K G01N

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, FSTA

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 2010/054649 A2 (UNIV HALLE WITTENBERG [DE]; BREUNIG KARIN [DE]; BEHRENS SVEN-ERIK [DE]) 20. Mai 2010 (2010-05-20) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument -----	1-56
X	WO 90/15140 A1 (COMMW SCIENT IND RES ORG [AU]) 13. Dezember 1990 (1990-12-13) das ganze Dokument -----	1-56
A	EP 1 752 468 A1 (CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACION [ES]; BIONOSTRA S L [ES]) 14. Februar 2007 (2007-02-14) das ganze Dokument ----- -/-	1-56



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

25. April 2013

14/05/2013

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Sirim, Pinar

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2012/001205

## C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	VILLEGAS PEDRO ET AL: "Infectious bursal disease subunit vaccination.", AVIAN DISEASES DEC 2008, Bd. 52, Nr. 4, Dezember 2008 (2008-12), Seiten 670-674, XP002695513, ISSN: 0005-2086 das ganze Dokument -----	1-56
A	PITCOVSKI J ET AL: "Development and large-scale use of recombinant VP2 vaccine for the prevention of infectious bursal disease of chickens", VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, Bd. 21, Nr. 32, 1. Dezember 2003 (2003-12-01), Seiten 4736-4743, XP004469693, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/S0264-410X(03)00525-5 das ganze Dokument -----	1-56
A	STUBBS A C ET AL: "WHOLE RECOMBINANT YEAST VACCINE ACTIVATES DENDRITIC CELLS AND ELICITS PROTECTIVE CELL-MEDIATED IMMUNITY", NATURE MEDICINE, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, Bd. 7, Nr. 5, 1. Mai 2001 (2001-05-01), Seiten 625-629, XP008073223, ISSN: 1078-8956, DOI: 10.1038/87974 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument -----	1-56
A	STUBBS A C ET AL: "Recombinant yeast as a vaccine vector for the induction of cytotoxic T-lymphocyte responses", CURRENT OPINION IN MOLECULAR THERAPEUTICS, CURRENT DRUGS, LONDON, GB, Bd. 4, Nr. 1, 1. Februar 2002 (2002-02-01), Seiten 35-40, XP008092368, ISSN: 1464-8431 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ----- -/-	1-56

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2012/001205

**C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>WANSLEY ELIZABETH K ET AL: "Vaccination with a recombinant <i>Saccharomyces cerevisiae</i> expressing a tumor antigen breaks immune tolerance and elicits therapeutic antitumor responses", CLINICAL CANCER RESEARCH, THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, Bd. 14, Nr. 13, 1. Juli 2008 (2008-07-01), Seiten 4316-4325, XP002587490, ISSN: 1078-0432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0393 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1-56
A	<p>BATHURST I C: "PROTEIN EXPRESSION IN YEAST AS AN APPROCH TO PRODUCTION OF RECOMBINANT MALARIA ANTIGENS", AMERICAN JOURNAL OF TROPICAL MEDICINE &amp; HYGIENE, AMERICAN SOCIETY OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE, US, Bd. 50, Nr. 4, SUPPL, 1. Januar 1994 (1994-01-01), Seiten 20-26, XP001088993, ISSN: 0002-9637 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1-56
X, P	<p>ARNOLD MARINA ET AL: "Protective Vaccination against Infectious Bursal Disease Virus with Whole Recombinant <i>Kluyveromyces lactis</i> Yeast Expressing the Viral VP2 Subunit", PLOS ONE, Bd. 7, Nr. 9, September 2012 (2012-09), XP002695514, ISSN: 1932-6203 das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1-56
A, P	<p>JORRIT-JAN KRIJGER ET AL: "A novel, lactase-based selection and strain improvement strategy for recombinant protein expression in <i>Kluyveromyces lactis</i>", MICROBIAL CELL FACTORIES, BIOMED CENTRAL, LONDON, NL, Bd. 11, Nr. 1, 20. August 2012 (2012-08-20), Seite 112, XP021128994, ISSN: 1475-2859, DOI: 10.1186/1475-2859-11-112 das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1-56

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2012/001205

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 2010054649	A2	20-05-2010	CN 102741414 A DE 102008057451 A1 DE 112009003267 A5 EP 2403947 A2 JP 2012508697 A US 2011293659 A1 WO 2010054649 A2	17-10-2012 20-05-2010 15-11-2012 11-01-2012 12-04-2012 01-12-2011 20-05-2010
WO 9015140	A1	13-12-1990	AU 643216 B2 AU 5731590 A EP 0474676 A1 WO 9015140 A1	11-11-1993 07-01-1991 18-03-1992 13-12-1990
EP 1752468	A1	14-02-2007	EP 1752468 A1 ES 2242542 A1 US 2007212375 A1 WO 2005105834 A1	14-02-2007 01-11-2005 13-09-2007 10-11-2005