



## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
2023.10.26

(21) Номер заявки  
202091435

(22) Дата подачи заявки  
2018.12.19

(51) Int. Cl. *C12N 15/81* (2006.01)  
*A61K 39/12* (2006.01)

(54) ОПТИМИЗИРОВАННАЯ СИСТЕМА ВЕКТОР-ХОЗЯИН ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЗАЩИТНОЙ МОНО- И ПОЛИВАЛЕНТНОЙ СУБЪЕДИНИЧНОЙ ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ ДРОЖЖЕЙ *KLUYVEROMYCES LACTIS*

(31) 10 2017 012 109.5

(32) 2017.12.27

(33) DE

(43) 2020.08.28

(86) PCT/DE2018/000379

(87) WO 2019/129321 2019.07.04

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
ФЕРОВАКЦИНЕС ГМБХ (DE)

(72) Изобретатель:  
Хюрлиман Ганс Каспар, Беренс  
Мартина, Гебауэр Мэнди, Бреуниг  
Карин, Беренс Свен-Эрик (DE)

(74) Представитель:  
Носырева Е.Л. (RU)

(56) JORRIT-JAN KRIJGER ET AL. "A novel, lactase-based selection and strain improvement strategy for recombinant protein expression in *Kluyveromyces lactis*, art 112" MICROBIAL CELL FACTORIES, Vol. 11, No. 1, 20 August 2012 (2012-08-20), pages 1-12 DOI: 10.1186/1475-2859-11-112 ISSN: 1475-2859, XP021128994 the whole document

ARNOLD MARINA ET AL. "Protective Vaccination against Infectious Bursal Disease Virus with Whole Recombinant *Kluyveromyces lactis* Yeast Expressing the Viral VP2 Subunit", Vol. 7, No. 9, 01 September 2012 (2012-09-01), pages e42870.1-e42870.11, PLOS

ONE, PUBLIC LIBRARY OF SCIENCE, Retrieved from the Internet: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0042870> [retrieved on 2012-09-14] DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0042870 ISSN: 1932-6203, XP002695514 the whole document

TAKAKO IWATA ET AL. "Efficient secretion of human lysozyme from the yeast, *Kluyveromyces lactis*" BIOTECHNOLOGY LETTERS, SPRINGER NETHERLANDS, DORDRECHT, Vol. 26, No. 23, 01 December 2004 (2004-12-01), pages 1803-1808 DOI: 10.1007/S10529-004-4614-9 ISSN: 1573-6776, XP019230808 the whole document

MUSTILLI A C ET AL. "Comparison of secretion of a hepatitis C virus glycoprotein in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis*" RESEARCH IN MICROBIOLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, Vol. 150, No. 3, 01 April 1999 (1999-04-01), pages 179-187, [retrieved on 1999-04-01] ISSN: 0923-2508, XP027033495 the whole document

WO-A1-2013107436

WO-A2-2010054649

CONSTANCE MEHLGARTEN ET AL. "Divergent Evolution of the Transcriptional Network Controlled by Snf1-Interacting Protein Sip4 in Budding Yeasts" PLOS ONE, Vol. 10, No. 10, 01 June 2015 (2015-06-01), page e0139464 DOI: 10.1371/journal.pone.0139464 XP055587956 the whole document

ALBERT J.J. VAN OUYEN ET AL. "Heterologous protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis*" FEMS YEAST RESEARCH, GB, NL, Vol. 6, No. 3, 01 May 2006 (2006-05-01), pages 381-392 DOI: 10.1111/j.1567-1364.2006.00049.x ISSN: 1567-1356, XP055529474 the whole document

(57) Настоящее изобретение относится к рекомбинантным дрожжам *Kluyveromyces lactis* (*K. lactis*), которые характеризуются высокоэффективной экспрессией одного или более чужеродных белков и которые подходят для применения в качестве вакцины, предназначенной для выработки защитного иммунного ответа на патогены. В частности, в настоящем изобретении предусмотрены штаммы *K. lactis* для целенаправленного клонирования нуклеиновых кислот, кодирующих чужеродный антиген, в геном дрожжей штамма *K. lactis*, характеризующиеся тем, что у штамма *K. lactis* в качестве альтернативы или дополнения к локусу *KILAC4* в локусе *KIURA3-20* (*KLLA0E2277lg*) и/или в локусе *KIMET5-1* (*KLLA0B03938g*) содержатся интегрированные кассеты экспрессии для чужеродных антигенов. Настоящее изобретение дополнительно относится к интегрируемым векторам экспрессии и способу получения штаммов *K. lactis* по настоящему изобретению, а также их применению в качестве вакцины.

### Область техники

Настоящее изобретение относится к рекомбинантным дрожжам *Kluyveromyces lactis* (*K. lactis*), которые характеризуются высокоэффективной экспрессией одного или более чужеродных белков и которые подходят для применения в качестве вакцины, предназначенной для выработки защитного иммунного ответа на патогены. В частности, в настоящем изобретении предусмотрены штаммы *K. lactis* для целенаправленного клонирования нуклеиновых кислот, кодирующих чужеродный антиген, в геном дрожжей штамма *K. lactis*, характеризующиеся тем, что у штамма *K. lactis* в качестве альтернативы или дополнения к локусу KILAC4 в локусе KIURA3-20 (KLLA0E22771g) и/или в локусе KIMET5-1 (KLLA0B03938g) содержатся интегрированные кассеты экспрессии для чужеродных антигенов. Настоящее изобретение дополнительно относится к интегрируемым векторам экспрессии и способу получения штаммов *K. lactis* по настоящему изобретению, а также их применению в качестве вакцины.

### Предпосылки создания изобретения

Вакцины применяют для предупреждения заболеваний (профилактические средства для прививания) или для лечения развившихся заболеваний (иммунотерапевтические средства для прививания). За последние примерно 100 лет программы профилактического прививания содействовали существенному снижению количества инфекционных заболеваний. Разработка иммунотерапевтических средств для прививания насчитывает только приблизительно 20 лет, и они применялись, например, в отношении хронических инфекций, вызванных вирусами, бактериями или паразитами, или в отношении онкологических заболеваний. Целью прививания является индукция клеточного (т.е. по сути обусловленного Т-клетками и НК-клетками) и/или гуморального (т.е. по сути обусловленного В-клетками/антителами) иммунного ответа и иммунной памяти ("памяти") против антигенных компонентов патогенов или злокачественных (опухолевых) клеток.

Классические вакцины содержат возбудитель заболевания целиком в аттенуированной (инактивированной) или убитой форме, в том числе его генетический материал, т.е. нуклеиновые кислоты в форме ДНК или РНК. В большинстве случаев при получении данных классических средств для прививания необходимы особые меры по обеспечению безопасности и/или применение организмов, вызывающих инфекцию, и/или клеточных культур; кроме того, зачастую данные средства для прививания должны храниться и транспортироваться дорогостоящим способом и при применении холодовых цепей. Кроме того, при применении классических средств для прививания имеется риск того, что полученные (например, с помощью лабораторного животного или клеточной культуры) средства будут вызывать побочные эффекты у привитого индивидуума или что произойдет нежелательная реактивация возбудителя. Также существуют проблемы с диагностикой. Например, в случае прививания сельскохозяйственных животных цельными возбудителями привитые животные не будут отличаться от животных, инфицированных естественным образом, так что не могут быть использованы системы раннего предупреждения, основанные на обнаружении новых инфекций. По этой причине были разработаны так называемые "субъединичные вакцины", в случае которых прививают только определенными компонентами возбудителя. Необходимым условием для их использования является то, чтобы были известны "основные антигены" соответствующего возбудителя заболевания. Чаще всего основными антигенами являются поверхностные компоненты возбудителя, которые могут распознаваться иммунной системой, например, белки вирусной оболочки или белки вирусных капсидов. Эти основные антигены могут индуцировать у хозяина гуморальный и/или клеточный иммунный ответ и иммунную память против вируса даже в отсутствие цельной вирусной частицы. Поскольку при "вакцинации субъединичной вакциной" другие компоненты возбудителя отсутствуют, посредством дифференциальной диагностики можно отличать вакцинированных и естественным образом инфицированных индивидуумов (дифференциация инфицированных и вакцинированных животных (DIVA)); соответственно при этом используется термин "субъединичная маркерная вакцина". Недостатками многих субъединичных вакцин является зачастую сложное получение и зачастую недостаточная иммуногенность. Хотя самих возбудителей заболеваний можно эффективно культивировать (с учетом указанных выше ограничений), их основные антигены необходимо получать посредством дорогостоящих и в основном неэффективных способов генной инженерии и сложных способов очистки. Полученные таким образом субъединичные вакцины представляют собой, соответственно, биологический материал, который характеризуется небольшим сроком хранения и зачастую должен храниться и транспортироваться при охлаждении. По этим причинам большая часть средств для массового прививания сельскохозяйственных животных все еще основана на классическом принципе, при котором используют цельный возбудитель заболевания.

Широко распространенный инфекционный бурсит птиц (IBD) вызывает, например, вирус инфекционного бурсита (IBDV), безоболочечный вирус с геномом из двухнитевой, сегментированной РНК из семейства *Herpesviridae*. Большинство средств для прививания против IBD основаны на аттенуированных (ослабленных) или инактивированных вирусах. Однако здесь возникает проблема, заключающаяся в том, что сильно аттенуированные неинактивированные "живые вирусы", а также инактивированные вирусы хотя и обеспечивают защиту от вирусов IBD со средней патогенностью, но этого не происходит в случае высоковирулентных (сильновирулентных) штаммов вирусов IBD (vvIBDV). До недавнего времени сильновирулентные аттенуированные вирусы (промежуточные "горячие" штаммы) применялись для защиты

от vvIBDV, но данные штаммы для прививания характеризуются побочными эффектами в виде иммуносупрессии вследствие временного повреждения В-клеток в фабрициевой сумке, лимфатическом органе (Rautenschlein et al. (2005)). Однако даже эти промежуточные "горячие" вакцины не обеспечивают полной защиты от недавно обнаруженных штаммов vvIBDV (Negash et al. (2012); Kasanga et al. (2007)). Кроме того, одна проблема прививания сильными аттенуированными живыми вирусами заключается в том, что материнские антитела препятствуют репликации вируса и, следовательно, индукции иммунного ответа. Таким образом, эффективное прививание с помощью этих средств для прививания возможно только через три недели после вылупления (Kumar et al. (2000); Rautenschlein et al. (2005)).

Например, вирусы гриппа А относятся к одним из наиболее важных вирусных патогенов в мире (Short et al. (2015); Silva et al. (2012)). Вирусы гриппа относятся к семейству Orthomyxoviridae; они представляют собой оболочечные вирусы с однонитевой, сегментированной РНК в качестве генома. Как и большинство РНК-вирусов вирусы гриппа также подвержены высокой частоте мутаций. В частности, реассортация сегментов вирусной РНК приводит к образованию вирусного потомства с новыми генетическими и биологическими свойствами (Short et al. (2015)). Вследствие такой быстрой эволюции проблема с прививанием против вирусов гриппа, в частности, возникает из-за того, что существующая вакцина не "работает" в отношении новых возникших вариантов вируса. Соответственно, в течение длительного времени предпринимались попытки разработать вакцины, которые бы обеспечивали перекрестную и, следовательно, долгосрочную защиту от различных вариантов гриппа (Steel et al. (2010); Krammer and Palese (2013); Kirchenbaum and Ross (2014); Berthoud et al. (2011)).

Вирус вирусной диареи крупного рогатого скота (BVDV) представляет собой широко распространенный патоген парнокопытных. BVDV является представителем рода Pestivirus семейства Flaviviridae. Геном из однонитевой РНК данных вирусов также подвержен высокой частоте мутаций. Кроме того, беременные животные также могут передавать инфекцию плоду, и вследствие иммунологической толерантности рождаются животные с персистентной инфекцией (PI). Такие PI-животные далее распространяют данный вирус дальше, и мутации вируса могут приводить к 100% смертности в результате так называемой вирусной диареи. В данном случае также в течение длительного времени предпринимались попытки разработать вакцины, которые бы обеспечивали перекрестную и длительную защиту от различных вариантов вируса BVD (Ridpath (2015)).

Эффективная субъединичная вакцина может устранить или решить данные проблемы. В большинстве случаев субъединицы представляют собой белковые компоненты возбудителей заболеваний; они могут быть получены посредством генной инженерии в различных клетках-хозяевах. В качестве систем-хозяев для экспрессии гетерологичных белков, помимо кишечной бактерии *Escherichia coli*, широко стали применяться клетки млекопитающих или клетки насекомых, клетки растений и различных грибов, которые можно размножать в клеточной культуре. Системы на основе микроорганизмов, таких как бактерии и грибы, можно культивировать в больших масштабах при особенно низкой стоимости.

Дрожжевые клетки из родов дрожжей *Saccharomyces*, *Pichia* и *Kluyveromyces* уже в течение десятилетий регулярно используются для экспрессии чужеродных белков. Преимущество дрожжевых клеток над бактериями заключается в том, что они являются эукариотами, т.е. они во многих аспектах напоминают клетки животных, и белки эукариот, т.е. белки, которые продуцируются и/или должны быть функционализированы в клетках животных, можно недорого получать в дрожжах в нативной или почти нативной форме (Bathurst (1994); Gellissen & Hollenberg (1997)). Изначально дрожжи применяли только для продуцирования чужеродных белков; при этом после экспрессии белки очищали от дрожжевых клеток и использовали в качестве субъединичной вакцины. Только недавно были предприняты попытки введения самих дрожжей или клеточной фракции дрожжей в качестве вакцины. "Вакцина на основе дрожжей" соответственно представляет собой частицу дрожжей, которая содержит иммунологически эффективные компоненты возбудителя заболевания (антигены) и которая после введения (например, подкожно, внутримышечно или перорально/через слизистые оболочки) в организм-хозяин вызывает специфический иммунный ответ против данных антигенов и, следовательно, также против патогена, из которого получены данные антигены. В желательном случае у вакцинированных организмов индуцируется иммунологическая "память", которая в случае последующей инфекции ("заражения") препятствует размножению и/или распространению соответствующих возбудителей заболевания и/или смягчает патологические последствия инфекции. Как уже указано выше, антигены в основном представляют собой структурные белки возбудителей заболеваний, при этом кодирующие последовательности нуклеиновых кислот (гены, кодирующие антиген) с помощью способов генной инженерии вводят в дрожжевые клетки и обеспечивают экспрессию одного или более таких структурных белков. Полученные таким образом рекомбинантные дрожжи в живой форме (дрожжевые клетки), после инактивации и высушивания в форме порошка (частицы дрожжей) или после разрушения структуры клеток и гомогенизации (лизат дрожжей) представляют собой вакцину на основе дрожжей. После применения вакцины антигены распознаются иммунной системой и вызывают гуморальную и/или клеточную иммунную защиту.

Вакцинация вакциной на основе дрожжей известна специалисту в данной области техники. В ряде заявок на патент и патентов США, таких как, например, US 20090304741 A1, US 5830463 A, US 7465454 B2 и US 20070166323 A1, описано применение в иммунотерапии штаммов *Saccharomyces cerevisiae* (S.

cerevisiae), которые содержат по меньшей мере один рекомбинантный антиген. Было показано, что данные дрожжи являются эффективными в стимуляции иммунной реакции, в частности опосредованной клетками иммунной реакции.

В WO 2006044923 представлены дрожжи (*S. cerevisiae*), которые рекомбинантным образом экспрессируют различные белки вируса гепатита С (HCV) и которые могут вызвать иммунную реакцию, главным образом ответ с участием Т-клеток, против этих белки HCV, и их можно применять в качестве вакцины против хронического гепатита С.

В WO 2007092792 описано потенциальное применение рекомбинантных дрожжей *S. cerevisiae* против инфекции, вызванной вирусом гриппа, причем используется комбинация различных штаммов дрожжей, применение которых приводит к индукции Т-клеток, таким образом, к клеточному иммунному ответу.

В WO 20101054649 и WO 2013107436 описано применение штаммов вида *Kluveromyces lactis*, содержащих определенные антигены, для обеспечения защитного гуморального иммунного ответа после перорального/чрезслизистого или подкожного введения цельных убитых дрожжевых клеток. В последних патентах содержатся примеры применения, в которых для вакцинации успешно использовали рекомбинантные штаммы *K. lactis*, которые были получены из исходного штамма VAK367-D4.

Возможность применения рекомбинантных дрожжей *Kluveromyces lactis* для вакцинации известна специалисту в данной области техники. (Arnold et al. (2012)); WO 20101054649 и WO 2013107436). В примерах применения можно увидеть, что подкожное введение дрожжей *K. lactis*, которые экспрессируют капсидный белок VP2 вируса инфекционного бурсита (IBDV) внутри клетки за счет кассеты экспрессии под контролем промотора LAC4, вызывает гуморальный иммунный ответ, что обеспечивает эффективную защиту от вирусной инфекции. Это может быть показано для вируса IBD средней патогенности, но пока еще не обнаружено для очень вирулентного IBDV (vvIBDV). Предыдущие данные показали, что эффективность вакцины на основе дрожжей можно повысить за счет повышения внутриклеточной концентрации вирусного антигена (Arnold et al. (2012)). Один технический вариант для обеспечения повышения концентрации антигена заключается во введении дополнительной копии гена активатора транскрипции KIGAL4-1 (альтернативное название LAC9-1) посредством интеграции плазмиды pLI-1 (Krijger et al. (2012) и WO 2013107436) в штамм, экспрессирующий IBDV-VP2 (депонированные штаммы DSM 25406 и DSM 25407). Следовательно, до настоящего времени создание таких вакцинных штаммов *K. lactis* базировалось на двух генетических вмешательствах: первое заключалось в интеграции чужеродного гена, кодирующего антиген, второе заключалось в интеграции гена KIGAL4-1. Однако в той форме, которая применяется на практике на сегодняшний день, последнее также регулярно приводит к интеграции тандемных повторов плазмиды, что приводит не только цитотоксическому эффекту в результате сильной сверхэкспрессии активатора (Breunig 1989), но также к различному числу копий генов KIGAL4-1 и ScURA3 в созданных таким образом вакцинных штаммах.

Стратегия, описанная в указанных выше примерах применения (Arnold et al. (2012); WO 20101054649 и WO 2013107436), заключающаяся в экспрессии чужеродного гена с помощью немодифицированного промотора LAC4, имеет тот недостаток, что даже в неиндуцирующих условиях происходит минимальная экспрессия чужеродного гена, т.е. промотор в определенной степени склонен к спонтанной активации. Данный эффект является еще более выраженным при повышении дозы гена KIGAL4-1. Соответственно, в случае белков, которые при гетерологичной экспрессии оказывают цитотоксический эффект (цитопатический эффект, CPE) на дрожжевые клетки, образование биомассы при культивировании, например, во время осуществления способа периодической ферментации с подпиткой, может быть сильно ограничено. В частности, для таких случаев необходимо найти альтернативные пути, обеспечивающих как можно более низкую экспрессию гена в неиндуцирующих условиях.

Различные субъединичные вакцины являются эффективными, только тогда, когда для прививания используется не одна, а несколько субъединиц патогена. За счет использования нескольких субъединиц антигена для прививания можно дополнительно значительно повысить перекрестную защиту от различных вариантов патогена. Совместная экспрессия одинаковых или различных антигенов также может быть использована для дополнительного увеличения концентрации антигена в дрожжевой клетке или получения вакцины, которая защищает от различных патогенов.

Указанные выше штаммы, как правило, представляют собой ауксотрофные штаммы, которые в полной среде зачастую растут хуже, чем прототрофные штаммы. Соответственно, быстро осуществимое превращение ауксотрофных штаммов дрожжей в прототрофную форму может привести к улучшению свойств роста.

#### Описание изобретения

Цель настоящего изобретения заключалась в обеспечении новых вакцинных штаммов *K. lactis*, с помощью которых можно преодолеть недостатки существующего уровня техники. В частности, предусматривается обеспечение рекомбинантных штаммов *K. lactis*, которые содержат ограниченное число копий гена KIGAL4-1, интегрированных в определенный сайт в геноме. Кроме того, предусматривается обеспечение штаммов, у которых в неиндуцирующих условиях не допускается или допускается только небольшая экспрессия чужеродного белка, при этом допускается экспрессия нескольких копий антигена

или экспрессия нескольких антигенов в дрожжевой клетке, которые лучше подходят для культивирования и могут эффективно применяться в защитной вакцинации против патогенов. При этом предусматривается, что гетерологичные гены, которые кодируют активные иммуномодулирующие белки (антигены), интегрированы в определенные сайты генома *K. lactis*. При отборе искомого клона с интегрированным чужеродным геном в качестве селектируемого маркера не должны использоваться гены устойчивости. Кроме того, предусматривается образование прототрофных штаммов из ауксотрофных штаммов наиболее простым из возможных способов. Это также должно способствовать упрощенной ферментации вакцинных штаммов дрожжей, полученных в синтетической среде без добавок.

Данные цели были достигнуты путем обеспечения модульной системы, содержащей новые векторы и новые генетически модифицированные варианты дрожжей *K. lactis* и позволяющей создавать штаммы для прививания, оптимизированные в отношении специфических свойств белковых антигенов. Путем модульной замены элементов ДНК между векторами достигли эффективного регулярного клонирования областей, кодирующих чужеродный антиген, в геном дрожжей, независимо от чужеродного гена, подлежащего экспрессии. Благодаря целенаправленной интеграции соответствующих чужеродных генов в геном штаммы дрожжей являются стабильными и генетически определенными в течение многих поколений. За счет данных свойств способ ферментации воспроизводимо выполняют в неселективных условиях, и он может быть стандартизирован. Оптимизация дрожжей *K. lactis* согласно настоящему изобретению заключалась в том, чтобы контролировать уровень продуцирования белков таким образом, чтобы он был как можно более высоким, но вместе с тем, чтобы он не превышал предел, при котором цитопатический эффект антигенов в значительной степени препятствует способу ферментации. Этого достигали с помощью генетического вмешательства или с помощью комбинации нескольких генетических вмешательств:

- i) повышения концентрации индуцируемого лактозой активатора транскрипции,
- ii) целенаправленной модификации промотора LAC4 и/или
- iii) постепенного повышения дозы гена для чужеродного гена, кодирующего антиген.

Оптимизация дрожжей *K. lactis* согласно настоящему изобретению также заключалась во внедрении

iv) нескольких новых сайтов интеграции для кассет, кодирующих чужеродный ген, в геном дрожжей, чтобы иметь возможность экспрессировать одновременно несколько антигенов.

В предпочтительном варианте осуществления цель настоящего изобретения достигается посредством обеспечения штамма *K. lactis* для целенаправленного клонирования нуклеиновых кислот, кодирующих чужеродный антиген, в геном дрожжей штамма *K. lactis*, характеризующегося тем, что у штамма *K. lactis* в качестве альтернативы или дополнения к локусу KILAC4 в локусе KIURA3-20 (KLLA0E22771g) и/или в локусе KIMET5-1 (KLLA0B03938g) содержатся интегрированные кассеты экспрессии для чужеродных антигенов. Особенно предпочтительно, когда у штамма *K. lactis* в дополнение к локусу KILAC4 в локусе KIURA3-20 (KLLA0E22771g) и/или в локусе KIMET5-1 (KLLA0B03938g) содержатся интегрированные кассеты экспрессии для чужеродных антигенов. Еще более предпочтительно, когда у штамма *K. lactis* в дополнение к локусу KILAC4 в локусе KIURA3-20 (KLLA0E2277 1g) и в локусе KIMET5-1 (KLLA0B03938g) содержатся интегрированные кассеты экспрессии для чужеродных антигенов. Преимущество модифицированных таким образом штаммов *K. lactis* заключается в том, что гены для экспрессии чужеродных генов интегрированы в установленные, определенные локусы в геноме *K. lactis* и число копий чужеродных генов является контролируемым. Кроме того, данные штаммы *K. lactis* обеспечивают возможность интеграции различных генов для экспрессии различных чужеродных антигенов в определенные локусы в геноме *K. lactis*.

В контексте настоящего изобретения под "чужеродными антигенами" или "чужеродными белками" подразумеваются все пептиды, полипептиды и белки, которые являются подходящими для того, чтобы вызвать иммунный ответ, предпочтительно защитный иммунный ответ, против патогена или канцерогенных аномальных клеток у людей или у животных. Чужеродные белки могут быть получены из возбудителей заболеваний или опухолей различного типа, для которых были определены характеристики антигенов, которые самостоятельно способны индуцировать защитный иммунный ответ, предпочтительно защитный иммунный ответ.

В предпочтительном варианте осуществления чужеродные белки получают из возбудителей заболеваний (вирусов, бактерий, паразитов), для которых были определены характеристики антигенов, которые самостоятельно способны индуцировать защитный иммунный ответ, предпочтительно защитный гуморальный иммунный ответ.

Например, к ним относятся следующие: чужеродные белки, получаемые из паразитов

*Necator americanus*; *Ancylostoma duodenale*: белок ASP, разрушающие гемоглобин протеазы;

*Leishmania*: gp63, антиген промастиготы размером 46 кДа, LACK;

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

*Schistosoma*: TP1, Sm23, ShGSTs 26 и 28, парамиозин, миозин паразита, Sm14;

чужеродные белки, получаемые из бактерий *Mycobacterium tuberculosis*: Ag85A, Hsp65, R8307, 19 кДа, 45 кДа, 10,4;

*Helicobacter pylori*: VacA, LagA, NAP, hsp, уреазы, каталаза;  
*Streptococcus* группы A: M, пептидаза SCPA, экзотоксин SPEA и SPEC, фибронектин-связывающий белок;  
*Streptococcus pneumoniae*: PspA, PsaA, BHV 3, BHV 4;  
*Salmonella typhimurium*: антиген Vi;  
*Shigella*: LPS;  
*Vibrio cholerae*: CTB;  
*Escherichia coli* ETEC: LT, LT-ST, CTB;  
*Yersinia pestis*: F1, V;  
 чужеродные белки, получаемые из опухолевых клеток/опухолей (ассоциированные с опухолями антигены, ТАА)  
 CEA;  
 5T4; MUC1; MART1; HER-2;  
 особенно предпочтительными являются чужеродные белки, получаемые из вирусов *Caliciviridae* (вирус Норуолк, HEV): NV размером 60 кДа; ORF2 HEV; *Reoviridae* (ротавирус): VP7, VP4; *Retroviridae* (HIV): Gag, Pol, Nef, Env, gp160, gp120, gp140, gp41;  
*Flaviviridae* (род *Flavivirus*: WNV, вирус денге, YF, TBE, JEV): preM-Env, NS3, NS4, NS5;  
*Flaviviridae* (род *Pestivirus* BVDV, CSFV, BDV, род *Hepadnavirus* HCV): E1, E2, E<sup>RNS</sup> (чума), С, NS3, NS4, NS5;  
*Hepadnaviridae* (HBV): антиген HBS;  
*Paramyxoviridae* (*Paramyxovirinae*: PIV-1, PIV-2, вирус эпидемического паротита, вирус Сендай, PIV-2, PIV-4, вирус кори): M, HN, N, F;  
*Paramyxoviridae* (*Pneumovirinae*: RSV): F, G, SH, M;  
*Rhabdoviridae* (вирус бешенства): G;  
*Herpesviridae* (EBV, HSV2): gp350/220 (EBV), gB2, gD2 (HSV);  
*Coronaviridae* (SARS): CoV, N, M, S;  
*Orthomyxoviridae* (вирус гриппа А, В): HA, NA, M1, M2, NP;  
*Papillomaviridae*: L2, E6, E7.

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения модифицированные штаммы *K. lactis* характеризуются тем, что кассеты экспрессии *K. lactis* содержат промотор LAC4-12 (P<sub>LAC4-12</sub>) или варианты данного промотора, ORF экспрессируемого антигена и терминатор AgTEF1. Преимущество данного варианта осуществления заключается в том, что экспрессия чужеродных генов под контролем промотора P<sub>LAC4-12</sub> после интеграции LAC4 в локус и/или KIURA3, и/или KIMET5 приблизительно одинаково индуцируется лактозой.

Как описано выше, существует положительная корреляция между концентрацией антигена в вакцинных штаммах и иммунологическим действием вакцины на основе дрожжей в организмах-мишенях. В качестве альтернативы, для предотвращения СРЕ в результате сильной сверхэкспрессии, например, при интеграции дополнительного гена KIGAL4, описанную выше векторную систему можно модифицировать для быстрой и эффективной замены нескольких копий гена одной за другой и введения данной кассеты экспрессии за одну стадию в один из трех генных локусов (см. пример 5 и фиг. 7А).

В предпочтительном усовершенствованном варианте настоящего изобретения штаммы *K. lactis*, модифицированные таким образом, в локусе KILAC4, или в локусе KIURA3-20, или в локусе KIMET5-1 содержатся несколько копий последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих чужеродный антиген, которые вставлены посредством тандемной кассеты экспрессии или нескольких кассет экспрессии. Данные кассеты экспрессии содержат несколько копий кодирующего антиген участка (гена), фланкируемого промотором LAC4-12 (P<sub>LAC4-12</sub>) или вариантами данного промотора и терминатором AgTEF1 соответственно. Таким образом, путем увеличения числа копий гена антигена можно значительно увеличить его экспрессию в одном из соответствующих генных локусов.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения в локусе KILAC4 штамма *K. lactis* находится ген чужеродного антигена IBDV-VP2 в форме тандемной кассеты экспрессии. Преимущество данного штамма *K. lactis* относительно штаммов с одной копией гена, который кодирует чужеродный антиген IBDV-VP2, заключается в том, что чужеродный антиген IBDV-VP2 экспрессируется в увеличенном количестве. Особенно предпочтительным согласно данному варианту осуществления настоящего изобретения является штамм VAK1118 (DSM 32701), в котором содержится ген чужеродного антигена IBDV-VP2 в форме тандемной кассеты экспрессии в локусе KILAC4.

Еще более предпочтительно, если в локусе KILAC4, и/или в локусе KIURA3-20, и/или в локусе KIMET5-1 штаммов *K. lactis* по настоящему изобретению содержатся одна или более копий различных нуклеиновых кислот, кодирующих чужеродный антиген, которые вставлены посредством одной кассеты экспрессии, тандемной кассеты экспрессии или нескольких кассет экспрессии. Вследствие этого с одной стороны в дрожжевой клетке могут экспрессироваться различные чужеродные антигены, а с другой стороны эти различные чужеродные антигены могут экспрессироваться в различных концентрациях. Особенно предпочтительным согласно данному варианту осуществления является штамм *K. lactis*, в котором

в локусы KILAC4 и KIURA3-20 штамма *K. lactis* вставлены и экспрессируются последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие чужеродные антигены HA вируса гриппа А (A/Puerto Rico/8/1934(H1N1)) и M1 вируса гриппа А (A/Puerto Rico/8/1934(H1N1)). Особенно предпочтительным согласно данному варианту осуществления настоящего изобретения является штамм VAK1283 (DSM 32697), в котором в локусы KILAC4 и KIURA3-20 штамма *K. lactis* вставлены последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие чужеродные антигены HA вируса гриппа А (A/Puerto Rico/8/1934(H1N1)) и M1 вируса гриппа А (A/Puerto Rico/8/1934(H1N1)).

Как уже упоминалось, известно, что повышение дозы гена KIGAL4 может привести к повышению продуцирования антигена (Krijger et al. 2012 и WO 2013107436). Недостатки достижения этого за счет интеграции плазмиды pLI-1, экспрессирующей KIGAL4, в двухстадийном способе перечислены выше. Согласно настоящему изобретению данные недостатки преодолеваются путем обеспечения стабильного исходного штамма для интеграции чужеродных генов, который содержит вторую копию гена KIGAL4. Это позволяет гарантировать, что все полученные штаммы имеют одинаковый генетический фон и в этих штаммах содержится в точности одна дополнительная копия гена KIGAL4. Это снижает цитотоксичность, наблюдаемую при экспрессии нескольких копий, и уменьшает количество стадий для получения вакцинных штаммов до всего лишь одной стадии. Кроме того, повышается генетическая стабильность, поскольку исключаются обратимая интеграция/вырезание плазмиды. Такой штамм можно получать, например, как описано в примере 1.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрен штамм *K. lactis*, который в дополнение к геномному гену KIGAL4 содержит еще вторую эктопическую копию гена KIGAL4. В данном штамме экспрессия активатора транскрипции KIGAL4 может быть увеличена максимум в два раза, а экспрессия чужеродных генов, вставленных в локус KILAC4, и/или в локус KIURA3-20, и/или в локус KIMET5-1, может быть повышена определенным образом с помощью промотора LAC4-12 или посредством вариантов данного промотора, описанных ниже. В случае традиционной практики плазмиды, кодирующие KIGAL4, вводились в клетку транзистентно и при множественном неконтролируемом числе копий. В результате, чужеродный антиген зачастую экспрессировался в настолько высокой концентрации, что это приводило к цитотоксическим эффектам. В случае штаммов *K. lactis* согласно данному варианту осуществления настоящего изобретения цитотоксические эффекты можно с большей эффективностью снижать или избежать их. Дополнительные генные локусы, которые будут применяться в будущем для такой же цели (вставка кассеты экспрессии под управлением LAC4), также можно контролировать таким же способом. Было доказано, что предпочтительно, когда эктопическая копия гена KIGAL4, фланкированного промотором KIGAL4 и терминатором KIGAL4, интегрирована в штамме *K. lactis* в локус гена KLLA0E13795g (Klavt3::KIGAL4-1, SEQ ID NO: 1). Особенно предпочтительным согласно данному варианту осуществления настоящего изобретения является штамм VAK1111 (DSM 32696), который обладает данными свойствами.

В дополнительном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрен штамм *K. lactis*, у которого в локусе KILAC4 присутствует последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая чужеродный антиген IBDV-VP2. Особенно предпочтительным согласно данному варианту осуществления настоящего изобретения является штамм VAK1171 (DSM 32699). Данный штамм дополнительно содержит вторую эктопическую копию гена KIGAL4, в котором также присутствует последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая чужеродный антиген IBDV-VP2. Данный штамм демонстрирует повышенную экспрессию чужеродного антигена IBDV-VP2 по сравнению со штаммами без дополнительной эктопической копии гена KIGAL4.

Продуцирование гетерологичного белка в микроорганизмах является проблематичным, когда оно приводит к цитопатическому эффекту (CPE). Таким образом, в настоящем изобретении предусмотрен подход отделения фазы продуцирования антигена от фазы накопления биомассы. За счет применения индуцируемого промотора LAC4 это становится частично возможным, например, в способе периодической ферментации с подпиткой, но затруднено, поскольку в неиндуцирующих условиях промотор P<sub>LAC4-12</sub> не является полностью неактивным (т.е. до некоторой меры склонен к спонтанной активации). В случае антигенов с очень сильным CPE это приводит к снижению скорости роста и к индукции стрессового ответа в клетке с отрицательными эффектами в отношении продуцирования антигена. Данная проблема усугубляется удвоением дозы гена KIGAL4 и/или повышением числа последовательностей, кодирующих антиген (см. ниже).

Таким образом, предпочтительный усовершенствованный вариант штаммов *K. lactis* по настоящему изобретению заключается в том, что штаммы *K. lactis* характеризуются модифицированной структурой промотора у промотора LAC4-12, которая в неиндуцирующих условиях не допускает или допускает только небольшую экспрессию чужеродного белка. Модифицированная структура промотора LAC4-12, в частности, характеризуется тем, что удален основной контрольный участок (BCR) промотора P<sub>LAC4-12</sub> между положениями 1065 и 1540 (делеция LR2; P<sub>LAC4-12-LR2</sub>; SEQ ID NO: 2) (см. также пример 2). Как уже описано выше, преимущество данного варианта осуществления настоящего изобретения по сравнению с традиционной практикой заключается в том, что цитотоксические эффекты, которые обычно могут вызываться при сильной экспрессии чужеродного гена, снижаются или устраняются с большей эффективностью.

ностью. Предпочтительными согласно данному варианту осуществления являются штаммы *K. lactis*, у которых в локусе KILAC4 присутствует последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая чужеродный антиген HA вируса гриппа А (A/Puerto Rico/8/1934(H1N1)). Особенно предпочтительным согласно данному варианту осуществления настоящего изобретения является штамм VAK1243 (DSM 32702). Данный штамм характеризуется наличием делеции LR2 в промоторе LAC4-12.

Штамм *K. lactis* также может характеризоваться модифицированной структурой промотора LAC4-12, которая обеспечивает возможность модуляции экспрессии чужеродного белка, где количество сайтов связывания для активатора KIGal4 промотора ("вышележащие активирующие последовательности" 1, 2 и 4, 5) варьируется, и присутствует 1, 2, 3 или 4 сайта связывания KIGal4. Таким способом в дрожжевой клетке можно экспрессировать различные чужеродные белки при разной концентрации ("планируемое" качество). Укороченные варианты промотора, среди прочего, являются важными для обеспечения модульности системы, например, для экспрессии белков в одном и том же штамме при оптимальном стехиометрическом соотношении, например, для образования высокоиммуногенных вирусоподобных частиц (VLP). Согласно данному варианту осуществления настоящего изобретения является предпочтительным, когда в локусе KILAC4 штамма *K. lactis* вставлена последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая чужеродный антиген IBDV-VP2. Особенно предпочтительным согласно данному варианту осуществления настоящего изобретения является штамм VAK1131 (DSM 32700). Данный штамм характеризуется наличием делеции LR2 и делеции вышележащих активирующих последовательностей 4 и 5 в промоторе LAC4-12.

Цель настоящего изобретения частично заключалась в обеспечении штаммов *K. lactis*, которые являются более подходящими для культивирования. Данная проблема решена за счет того, что в штаммах *K. lactis* по настоящему изобретению восстановлена генная функция аллелей Kllac4, Klura3-20 и Klmet5-1. Таким образом, полученные штаммы *K. lactis* являются прототрофными (пример 6, фиг. 8). Таким образом, упрощена ферментация вакцинных штаммов, внедрение процессов производства становится проще и экономичнее. Предпочтительными согласно данному варианту осуществления настоящего изобретения являются штаммы *K. lactis*, у которых в локусы KILAC4, KIURA3-20 и KIMet5-1 штамма *K. lactis* вставлены последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие чужеродные антигены, эктодомен E2 BVDV (типа 1, CP7), эктодомен E2 BVDV (типа 2, New York 93) и Npro-NS3 BVDV (типа 1, CP7). Особенно предпочтительным согласно данному варианту осуществления настоящего изобретения является штамм VAK1400 (DSM 32698). Данный штамм является прототрофным.

В особенно предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к штамму *K. lactis*, выбранному из штаммов:

VAK952	DSM 32705;
VAK1111	DSM 32696;
VAK1118	DSM 32701;
VAK1131	DSM 32700;
VAK 1171	DSM 32699;
VAK1243	DSM 32702;
VAK1283	DSM 32697;
VAK1395	DSM 32706;
VAK1400	DSM 32698.

Данные штаммы были депонированы 24.11.2017 или 01.12.2017 (DSM 32705, DSM 32706) в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур ГмбХ, DSMZ, DSMZ, Инхоффенштрассе 7B, 38124, Брауншвейг, Германия, в соответствии с Будапештским договором согласно указанными выше номерам.

В одном дополнительном аспекте настоящего изобретения предусмотрены интегрируемые векторы экспрессии, с помощью которых получают штаммы *K. lactis* по настоящему изобретению.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрены интегрируемые векторы экспрессии KIPURA3 (SEQ ID NO: 3) и KIPMET5 (SEQ ID NO: 4). Данные векторы содержат промотор LAC4-12 ( $P_{LAC4-12}$ ) или варианты данного промотора (описанные выше для штаммов *K. lactis*), в том числе ORF для подлежащего экспрессии антигена, кроме того последовательность терминатора AgTEF1, а также нацеливающие последовательности, которые обеспечивает целенаправленное восстановление функциональности аллеля Klura3-20 или Klmet5-1 после интеграции. Последовательность, кодирующую антиген, клонируют с помощью определенных сайтов рестрикции между последовательно-

стью промотора и терминатора в касете экспрессии. С помощью данных векторов осуществляют стабильную интеграцию кассет, экспрессирующих чужеродный ген, в геном *K. lactis* без использования маркеров и без применения устойчивости к антибиотикам. Соответственно, преимущества данной векторной системы заключаются в том, что чужеродные гены легко заменяются между различными векторами, а также можно заменить другими промоторы и терминаторы в кассетах экспрессии. Кассета экспрессии состоит из промотора P<sub>LAC4-12</sub> и терминатора AgTEF1, а также расположенного между ними чужеродного гена. Чужеродный ген можно заменять за счет сайтов рестрикции AscI и NotI. Промотор P<sub>LAC4-12</sub> можно заменять в обоих векторах за счет сайтов рестрикции SmaI и AscI, терминатор в KIpURA3 за счет NotI и BoxI (или MluI) и в KIpMET5 за счет NotI и Ecl136II (или SacI). Альтернативные кассеты экспрессии клонируют в KIpURA3 между сайтами рестрикции SmaI и BoxI (или MluI), в KIpMET5 между SmaI и Ecl136II (или SacI). С помощью известных ферментов рестрикции заменяют также кассеты экспрессии между векторами KIpMET5 и KIpURA3 или встраивают дополнительные кассеты экспрессии. Улучшение по сравнению с векторами KIp3 и KIp3-MCS (WO 20101054649) заключается в том, что отбор происходит в неиндуцирующих условиях (без лактозы), что в случае белков с CPE приводит к более высоким уровням трансформации и препятствует возможному обогащению трансформантами со сниженной экспрессией чужеродного гена. См. также примеры 3.1 и 3.2.

В особенно предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрен интегрируемый вектор экспрессии, который выбран из KIpMET5-P<sub>LAC4-12</sub>-Et, KIpMET5-P<sub>LAC4-12-LR2</sub>-Et, KIpMET5-P<sub>LAC4</sub>-Et, KIpMET5-P<sub>LAC4-LR2</sub>, а также из KIpURA3-P<sub>LAC4-12</sub>-Et, KIpURA3-P<sub>LAC4-12-LR2</sub>-Et, KIpURA3-P<sub>LAC4</sub>-Et и KIpURA3-P<sub>LAC4-LR2</sub> (SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4 в комбинации с SEQ ID NO: 5, 6, 7 или 8).

Векторы KIpURA3-P<sub>LAC4-12</sub>-Et, KIpURA3-P<sub>LAC4-12-LR2</sub>-Et, KIpURA3-P<sub>LAC4</sub>-Et и KIpURA3-P<sub>LAC4-LR2</sub> представляют собой варианты вектора KIpURA3-Et, в каждый из которых вставлена последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белок Etx.B-NA. Векторы KIpURA3-P<sub>LAC4-12</sub>-Et, KIpURA3-P<sub>LAC4-12-LR2</sub>-Et, KIpURA3-P<sub>LAC4</sub>-Et и KIpURA3-P<sub>LAC4-LR2</sub> отличаются от вектора KIpURA3-Et промотором.

Векторы KIpMET5-P<sub>LAC4-12</sub>-Et, KIpMET5-P<sub>LAC4-12-LR2</sub>-Et, KIpMET5-P<sub>LAC4</sub>-Et, KIpMET5-P<sub>LAC4-LR2</sub> представляют собой варианты вектора KIpMET5, в каждый из которых вставлена последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белок Etx.B-NA. Векторы KIpMET5-P<sub>LAC4-12</sub>-Et, KIpMET5-P<sub>LAC4-12-LR2</sub>-Et, KIpMET5-P<sub>LAC4</sub>-Et, KIpMET5-P<sub>LAC4-LR2</sub> отличаются от вектора KIpMET5 промотором.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к способу получения штамма *K. lactis* по настоящему изобретению, включающему стадии:

- (i) вставки последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей антиген, в вектор KIpURA5 или KIpMET5,
- (ii) трансформации культуры *K. lactis* с помощью модифицированной и предварительно подвергнутой ферментативному расщеплению векторной конструкции,
- (iii) отбора трансформированных клеток *K. lactis* с помощью твердой среды, которая не содержит урацил или/и метионин, и
- (iv) необязательно восстановления прототрофии.

Согласно одному варианту осуществления способа по настоящему изобретению можно одновременно обеспечивать эктопическую вставку и регулируемую экспрессию генные последовательности нескольких антигенов. Предпочтительно, когда обеспечивают эктопическую вставку и регулируемую экспрессию различные генные последовательности, которые кодируют антигены различных вариантов патогена. Дополнительно предпочтительно, когда обеспечивают эктопическую вставку и регулируемую экспрессию различных генных последовательностей, которые кодируют антигены различных патогенов.

В одном дополнительном аспекте настоящего изобретения предусмотрены фармацевтические или ветеринарные композиции для парентерального, энтерального, внутримышечного, чрезслизистого или перорального введения, которые содержат штамм *K. lactis* по настоящему изобретению необязательно в комбинации с типичными носителями и/или вспомогательными веществами. В частности, настоящее изобретение относится к фармацевтическим или ветеринарным композициям, которые подходят для вакцинации.

Фармацевтическая или ветеринарная композиция предпочтительно содержит по меньшей мере один физиологически приемлемый носитель, разбавитель, вспомогательное средство и/или вспомогательное вещество. Штаммы *K. lactis* по настоящему изобретению могут находиться в фармацевтически приемлемом носителе, например, в традиционной среде, такой как водный солевой раствор или буферный раствор, в виде фармацевтической композиции для введения с помощью инъекции. Такая среда также может содержать традиционные средства для фармацевтической композиции, такие как, например, фармацевтически приемлемые соли для регуляции осмотического давления, буфер, консерванты и т.п. Предпочтительные среды включают физиологический раствор и сыворотку крови человека. Особенно предпочтительной средой является забуференный PBS физиологический раствор.

Другие подходящие фармацевтически приемлемые носители известны специалисту в данной области техники, например, из Remington's Practice of Pharmacy, 13-е издание и J. of Pharmaceutical Science & Technology, Vol. 52, Nr. 5, Sept-Okt, S 238-311.

Дополнительный аспект настоящего изобретения относится к применению рекомбинантных дрож-

жей *K. lactis* по настоящему изобретению для вакцинации, как, например, для обеспечения защитной иммунизации, в частности, защитной иммунизации, которая направлена на патоген.

Соответствующий способ обеспечения защитной иммунизации включает, например, следующие стадии:

- a) культивирования и размножения рекомбинантных дрожжей по настоящему изобретению,
- b) сбора и инактивации дрожжей,
- c) введения рекомбинантных дрожжей в соответствии с заранее определенной схемой иммунизации,
- d) определения титра образованных антител и/или
- e) получения доказательств иммунизации.

Культивирование и размножение рекомбинантных дрожжей по настоящему изобретению можно осуществлять с помощью любого доступного традиционного способа. Особенно предпочтительными являются способы, которые обеспечивают высокий выход клеток при низкой стоимости. К ним относятся способы ферментации, в частности, способы ферментации с высокой плотностью клеток. Было показано, что особенно преимущественным является осуществление ферментации с применением протокола периодической ферментации с подпиткой.

В предпочтительном варианте осуществления такую защитную иммунизацию обеспечивают путем перорального/чрезслизистого, внутримышечного или подкожного введения рекомбинантных дрожжей.

В способе по настоящему изобретению рекомбинантные дрожжевые клетки должны применяться в инактивированном/убитом состоянии. С этой целью после культивирования и экспрессии чужеродных генов дрожжи высушивают и затем инактивируют. Инактивацию можно проводить с помощью любого доступного традиционного способа. Особенно подходящей для применения в способе по настоящему изобретению является тепловая инактивация (например, тепловая инактивация в течение 2 часов при 90°C) или -облучение (например, при 25 или 50 кГр).

Настоящее изобретение также относится к способу вакцинации, включающему введение штамма *K. lactis* по настоящему изобретению субъекту, например, животному или человеку, предпочтительно животному, в количестве, достаточном для обеспечения у субъекта иммунного ответа, предпочтительно защитного иммунного ответа, на один или более чужеродных антигенов.

Особенное преимущество заключается в том, что защитный иммунный ответ на патоген развивается после однократного применения/иммунизации ("одна инъекция") или после двукратного применения/иммунизации ("прайм-буст") штаммов *K. lactis* по настоящему изобретению. Дополнительное преимущество заключается в том, что перекрестный защитный иммунный ответ на различные варианты патогена развивается после однократного применения/иммунизации ("одна инъекция") или после двукратного применения/иммунизации ("прайм-буст") штаммов *K. lactis* по настоящему изобретению. Когда штаммы *K. lactis* по настоящему изобретению несут и экспрессируют различные чужеродные гены антигенов различных патогенов, то защитный иммунный ответ на различные патогены может развиваться после однократного применения/иммунизации ("одна инъекция") или двукратного применения/иммунизации ("прайм-буст").

#### **Краткое описание преимуществ изобретения**

Описанные улучшения платформы *K. lactis* приводят к многочисленным преимуществам.

a) Обеспечивается возможность сильного упрощения (готовый к применению комплект/набор) и высокой воспроизводимости базовой конструкции "субъединичных вакцин" на основе дрожжей. Теперь их можно получать в течение определенного короткого промежутка времени.

b) Вакцины на основе дрожжей могут содержать один или более антигенов; их можно легко производить, продуцировать в различных количествах.

c) Кроме того, обеспечивается возможность эффективной ферментации прототрофных дрожжей.

d. Обеспечивается возможность строгой индуцируемости продуцирования рекомбинантного белка. Последнее является особенно важным для белков, которые могут вызвать СРЕ.

e) Целенаправленная стабильная интеграция чужеродных генов в геном и, таким образом, сопутствующая стабильность штаммов обеспечивает преимущество, заключающееся в том, что процесс получения проходит воспроизводимо. Это является особенно важным для получения в соответствии с GMP.

f) С повышением продуцирования рекомбинантного антигена, обеспечиваемого за счет повышения числа копий чужеродного гена и/или концентрации K1GAL4, улучшается защитная способность вакцины на основе дрожжей.

g) С повышением продуцирования рекомбинантного антигена, обеспечиваемого за счет повышения числа копий чужеродного гена и/или концентрации K1GAL4, также можно снизить дозу средства для прививания, подлежащего введению. Это делает получение дрожжей более экономичным и улучшает переносимость прививки у пациента, получившего прививание.

h) Поливалентные вакцины на основе дрожжей можно использовать для перекрестной защиты или поливалентной защиты для профилактики от различных вариантов одного и того же патогена или различных патогенов. Кроме инактивации и добавления соответствующего адъюванта или соответствующего объема жидкости какой-либо последующей обработки дрожжей для применения в качестве средства для прививания не осуществляют.

Настоящее изобретение более подробно объясняется с помощью графических материалов и примеров осуществления изобретения.

На фиг. 1 показано определение характеристик нового полученного основного штамма *K. lactis* с двумя копиями K1GAL4. Было проверено присутствие второй эктопической копии K1GAL4 в идентифицированном сайте интеграции и проанализировано влияние интеграции на рост дрожжей. А. Схема сайта интеграции эктопической копии K1GAL4. Указан сайт интеграции и приведены названия генов. В. Агарозный гель с ПЦП-амплифицированными с помощью праймеров

VK183 (5'-GAGCCCACCCACCTGCTCCTG-3') (SEQ ID NO: 9) и

VK184 (5'-CTGATGTATTGCGCTCCTTACTAAC-3') (SEQ ID NO: 10)

фрагментами локуса KIAVT3 штамма дрожжей с дополнительно интегрированным эктопическим геном K1GAL4 (VAK1110) и без него (VAK367). Для каждого случая ожидаемый размер фрагментов приведен на схеме справа. С. Капельный тест с серийными десятикратными разведениями (Start-OD 1) в среде, содержащей глюкозу (YPD) или лактозу (YPLac). Инкубацию проводили при 30 и 37°C соответственно. Сравнивали рост штаммов дрожжей с копией K1GAL4 в нативном генном локусе (VAK1139), в эктопическом генном локусе и делецией K1GAL4 в нативном генном локусе (VAK1110), без копии K1GAL4 (AKIgal4; VAK964) или с двумя копиями K1GAL4 (VAK1168). Было показано, что определенная интеграция дополнительного гена K1GAL4 приводит всего лишь к небольшим нарушениям роста: их наблюдают только при 37°C и в индуцирующих условиях. Нарушение роста является более отчетливым при полной делеции K1GAL4.

На фиг. 2 показан результат вестерн-блоттинг-анализа белков штамма *K. lactis* с дополнительной эктопической копией K1GAL4, который продуцирует IBDV-VP2. С помощью вестерн-блоттинга анализировали эффект дополнительной копии K1GAL4 на зависимое от промотора LAC4-12 продуцирование рекомбинантного белка. В качестве тестируемого штамма использовали штамм дрожжей с кассетой экспрессии IBDV-VP2, который сравнивали с другими штаммами дрожжей, экспрессирующими IBDV-VP2. Присутствие (+) или отсутствие (-) эктопической копии K1GAL4 и тандемной кассеты экспрессии IBDV-VP2 (см. ниже) указаны сверху. В штамм VAK911 эктопическую копию вводили посредством линейаризации плазмиды pLI-1 с помощью BstEI (Krijger et al. 2012 и WO 2013107436), в штамме VAK1130 эктопическая копия K1GAL4 находилась в локусе KIAVT3 (см. фиг. 1). Штамм VAK367 дрожжей применяли в качестве контрольного штамма дикого типа без чужеродного гена. После предварительного культивирования в YPD штаммы дрожжей выращивали в течение 15 ч в YPLac. По 20 мкг белкового экстракта от каждого штамма дрожжей анализировали с помощью SDS-PAGE. Иммуноблоттинг осуществляли с помощью иммунной сыворотки кролика к IBDV (1:8000) и антитела козы к антителу кролика, конъюгированного с HRP (1:10000). Мультимеры (агр.) и мономеры (мон.) IBDV-VP2 указаны справа с помощью стрелок, неспецифические полосы с помощью звездочек. Было показано, что эктопическая экспрессия дополнительного гена K1GAL4, а также присутствие тандемной кассеты экспрессии (см. также ниже) приводит к значительному увеличению концентрации чужеродного антигена.

На фиг. 3 проиллюстрирован эффект делеции LR2 в промоторе LAC4-12 на продуцирование рекомбинантного белка без индукции и рост дрожжей на глюкозе. Немодифицированный промотор LAC4-12 демонстрирует базовый уровень экспрессии GOI (представляющего интерес гена) даже в неиндуцирующих условиях. Это представляет особую проблему в случае чужеродных антигенов, которые являются цитотоксическими. С помощью данных экспериментов тестировали сможет ли делеция в BC-участке (делеция LR2) промотора LAC4-12 снизить или даже полностью подавить продуцирование рекомбинантного белка в неиндуцирующих условиях. А. Схема промотора LAC4-12 (P<sub>LAC4-12</sub>). Показаны основной контрольный участок (BCR), делеция LR2 и четыре сайта связывания K1Gal4 (вышележащая активирующая последовательность: U1, U2, U4, U5), а также последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая чужеродный ген (GOI). В. Вестерн-блоттинг штаммов дрожжей с делецией LR2 (VAK1131) и без нее (VAK1130), экспрессирующих IBDV-VP2, после культивирования в неиндуцирующих условиях (YP с 3% EtOH). VAK1111 служил в качестве контрольного штамма дикого типа без чужеродного гена. По 50 мкг белкового экстракта от каждого штамма дрожжей загружали 12% SDS-гель. Иммуноблоттинг осуществляли с помощью иммунной сыворотки кролика к IBDV (1:5000) и антитела козы к антителу кролика, конъюгированного с HRP (1:10000). Контроль загрузки KINor1 выявляли с помощью антитела мыши к Nor1 (1:5000) и антитела козы к антителу мыши, конъюгированного с HRP (1:10000). С. Капельный тест с серийными десятикратными разведениями (Start-OD 1) в YPD, YPD с 0,5% глюкозы и YPLac. Инкубацию проводили при 30 и 37°C соответственно. Сравнивали рост штаммов дрожжей, несущих в локусе LAC4 чужеродный ген HA вируса гриппа А с делецией LR2 (VAK1243) и без нее (VAK952). В качестве контрольного штамма дикого типа без чужеродного гена служил штамм VAK367 дрожжей. Было показано, что делеция LR2 подавляет нежелательную базовую экспрессию чужеродного белка. Также было показано, что делеция LR2 улучшает рост штамма дрожжей, который экспрессирует цитотоксический белок (гемагглютинин вируса гриппа, HA), как в неиндуцирующих условиях, так и в индуцирующих условиях. Это особенно заметно при 37°C.

На фиг. 4 показаны векторы KIp, которые можно применять для интеграции кассет экспрессии белка в различные локусы генома *K. lactis*. В то время как применение локуса LAC4 (векторная система

KIp3) уже было описано (WO 20101054649 и WO 2013107436), применение локусов KIURA3 и KIMET5 является новыми. А. Схема различных векторов KIp с их соответствующими сайтами интеграции в геном. В и С. Кассеты экспрессии и фланкирующие концы новых векторов KIpUKA3 (В) и KIpMET5, описанных в данном документе (С). Отмечены различные области последовательности ДНК и соответствующие сайты рестрикции. GOI: чужеродный ген (представляющий интерес ген). D. Вестерн-блоттинг-анализ экспрессии чужеродного белка в штаммах дрожжей, сконструированных с помощью векторов KIp (А, В и С). Чужеродный ген представляет собой Etx.В-НА. В качестве контроля загрузки использовали дрожжи, экспрессирующие белок "домашнего хозяйства" KINop1 (KLLA0C04389g). После предварительного культивирования в YPD (+U) штаммы дрожжей выращивали в течение 4 ч в YPLac (+U). По 30 мкг белкового экстракта от каждого штамма дрожжей загружали в 12% SDS-PAGE. Иммуноблоттинг осуществляли с помощью моноклональных антител мыши к НА (1:5000) и антител к KINop1 (1:5000; Санта-Крус, Техас, США), а также антитела козы к антителу мыши, конъюгированного с HRP (1:10000; Jackson ImmunoResearch, Пенсильвания, США). Было показано, что подобно локусу LAC4 (WO 20101054649 и WO 2013107436) оба локуса KIURA3 и KIMET5 являются применимыми для экспрессии гетерологичного гена.

На фиг. 5 показано продуцирование различных рекомбинантных белков в одном и том же штамме дрожжей. Данный штамм дрожжей (VAK1234) был сконструирован с помощью векторов KIpURA3 и KIp3-MCS. Проводили вестерн-блоттинг-анализ белков штамма дрожжей, экспрессирующего тандемный IBDV-VP2 (см. ниже), в который с помощью вектора KIpURA3 в качестве чужеродного гена была вставлена дополнительная кассета экспрессии с Etx.В-НА (VAK1234). В качестве контролей использовали штаммы дрожжей, которые несли только кассету экспрессии с Etx.В-НА в локусе LAC4 (VAK899) или локусе KIURA3 (VAK1235) или только тандемную кассету экспрессии IBDV-VP2 в локусе LAC4 (VAK1171) в геноме. После предварительного культивирования в YPD штаммы дрожжей выращивали в течение 6 ч. в YPLac. По 30 мкг белкового экстракта от каждого штамма дрожжей загружали в 12% SDS-PAGE. Определение белков в иммуноблоттинге осуществляли в случае Etx.В-НА с помощью антитела мыши к НА (1:5000; Санта-Крус, Техас, США) и антитела козы к антителу мыши, конъюгированного с HRP (1:10000), а в случае IBDV-VP2 с помощью иммунной сыворотки кролика к IBDV (1:5000; Granzow et al. (1997)) и антитела козы к антителу кролика, конъюгированного с HRP (1:10000; Jackson ImmunoResearch, Пенсильвания, США). Было показано, что оба чужеродных белка экспрессируются в одной и той же дрожжевой клетке. Неожиданно оказалось, что уровень экспрессии антигена при совместной экспрессии с другим антигеном не ограничивается. Это становится заметным при сравнении уровня экспрессии у моно- и бивалентных штаммов (см. также фиг. 12).

На фиг. 6 показаны различным образом индуцируемые варианты промотора LAC4-12 для кассет экспрессии в векторах KIp. Получали кассеты экспрессии векторов KIp с различными вариантами промотора LAC4-12. Эффект вариантов промотора на интенсивность индукции синтеза белка тестировали на основании анализа штаммов дрожжей, которые содержали соответствующие кассеты экспрессии с Etx.В-НА в качестве чужеродного гена. А. Схематическое изображение вариантов промотора, соответствующих векторов KIpURA3 с Etx.В-НА в качестве чужеродного гена и полученных с их помощью штаммов дрожжей. BCR: участок связывания активаторов транскрипции K1Cat8 и K1Sip4, активаторов транскрипции в неиндуцирующих условиях; U1, U2, U4, U5: участки связывания для активатора транскрипции K1Gal4 (вышележащая активирующая последовательность). В. Результаты вестерн-блоттинг-анализа для определения характеристик вариантов промотора LAC4-12 в штаммах дрожжей, полученных с помощью вектора KIpURA3 (А). После предварительного культивирования в YPD штаммы дрожжей выращивали в течение 4 ч в YPLac. По 30 мкг белкового экстракта от каждого штамма дрожжей загружали в 12% SDS-PAGE. Иммуноблоттинг осуществляли с помощью моноклональных антител мыши к НА (1:5000) и антител к Nop1 (1:5000), а также антитела козы к антителу мыши, конъюгированного с HRP (1:10000). Было показано, что уровень экспрессии чужеродного гена меняется в зависимости от типа используемого промотора.

На фиг. 7 показан эффект удвоения числа копий чужеродного гена с помощью тандемной кассеты экспрессии на продуцирование рекомбинантного белка. Тестировали эффект, оказываемый на продуцирование рекомбинантного белка (IBDV-VP2) за счет повышения числа копий чужеродного гена с помощью тандемной кассеты экспрессии. А. Схематическое изображение тандемной кассеты экспрессии. Отмечены области ДНК и соответствующие сайты рестрикции. GOI: чужеродный ген (представляющий интерес ген). В. Показана тандемная конструкция для случайной интеграции, полученный из (А) с помощью селективируемого маркера ScURA3. С. Результаты вестерн-блоттинг-анализа, выполняемого для сравнения продуцирования белка IBDV-VP2 в штамме дрожжей (VAK1118) с тандемной кассетой экспрессии (А) и штамме дрожжей (VAK910) с кассетой экспрессии, имеющей только одну копию чужеродного гена. После предварительного культивирования в YPD штаммы дрожжей выращивали в течение 3 ч или 6 ч в YPLac. По 60 мкг белкового экстракта от каждого штамма дрожжей загружали в 12% SDS-PAGE. Иммуноблоттинг осуществляли с помощью иммунной сыворотки кролика к IBDV (1:10000) и антитела козы к антителу кролика (1:10000), конъюгированного с HRP. Агрегированные (агр.) и мономерные (мон.) IBDV-VP2 указаны справа с помощью стрелок, неспецифические полосы с помощью звезд

дочек. D. Результат вестерн-блоттинг-анализа штаммов дрожжей с интегрированной случайным образом тандемной кассетой экспрессии IBDV-VP2 (B) в сравнении со штаммом дрожжей, образованным с помощью KPr3-MCS с кассетой экспрессии (VAK910), а также полученным из него штаммом с дополнительными копиями KIGAL4-1 (pLI-1). После предварительного культивирования в YPD штаммы дрожжей выращивали в течение 8 ч в YPLac. Иммуноблоттинг осуществляли, как описано в (b). Было показано, что применение тандемной кассеты экспрессии значительно увеличивало уровень экспрессии чужеродного белка.

На фиг. 8 показан генный фрагмент для восстановления генной функции аллелей Klura3-20 и Klmet5-1 (A). Схематически показаны генные локусы и генные фрагменты, амплифицированные с помощью указанных праймеров, для KIURA3 (A) и KIMET5 (B). Мутации аллелей Klura3-20 (A) и Klmet5-1 (B), восстановленных за счет гомологичной рекомбинации с данными генными фрагментами, показаны с помощью звездочек под генами. Показаны сайты рестрикции, с помощью которых вырезали субклонированные фрагменты. На данной схеме показана стратегия получения прототрофных штаммов дрожжей, экспрессирующих чужеродный ген в локусе URA3 или MET5.

На фиг. 9 в комбинации с табл. 1 и табл. 2 проиллюстрирована защитная иммунизация кур против vvIBDV в классической схеме прививания "прайм-буст". В двух экспериментах (A и B) группам из по меньшей мере 16 кур SPF подкожно прививали лиофилизированные и подвергнутые тепловой инактивации дрожжевые клетки генетически оптимизированного штамма дрожжей *K. lactis* VAK1127, экспрессирующего тандемный IBDV-VP2, с применением способа прайм-буст. Первое прививание проводили через две недели после вылупления (прайм), второе (буст) осуществляли через две недели после этого. Через две недели после буста проводили заражение вирусом с помощью высоковирулентного (vv) штамма IBDV (очень вирулентный 89163/7.3). Группу животных, которые служили в качестве контроля инфицирования, подвергали имитационной обработке (имитация), при которой применяли только PBS или адьювант. В эксперименте 1 (A) в качестве контроля также применяли штамм дикого типа (VAK367). В качестве контроля без заражения вирусом использовали по меньшей мере семь кур на группу использовали; в эксперименте 2 (B) - по меньшей мере пять. Образцы сыворотки крови собирали незадолго до первого введения, перед заражением и после него, в противном случае с интервалом десять дней. Степень сероконверсии определяли с помощью ELISA (ProFLOK IBD Plus, Synbiotics). Показаны значения титра, пересчитанные согласно указаниям в наборе. A. Эксперимент 2 осуществляли подобно эксперименту 1 (A). Показано среднее значение титра согласно ELISA для 12 животных со стандартным отклонением. В обоих экспериментах показано появление высоких титров антител к IBDV-VP2 у животных, вакцинированных с помощью VAK1127. В соответствующих таблицах обобщены результаты защиты вакцинированных животных от заражения с помощью vvIBDV: в обоих экспериментах по вакцинации была достигнута полная защита от вирусной инфекции.

На фиг. 10 показан эффект генетических модификаций для восстановления прототрофии на количество продуцируемого рекомбинантного белка и иммуногенность штамма дрожжей, экспрессирующего тандемный IBDV-VP2. Сравнивали ауксотрофный штамм дрожжей VAK1127, экспрессирующий тандемный IBDV-VP2, и полученный из него прототрофный штамм дрожжей VAK1171 с точки зрения эффективности продуцирования рекомбинантных белков и иммуногенности. A. Результаты вестерн-блоттинг-анализа для определения содержания IBDV-VP2 в свежесобранном материале дрожжей. После предварительного культивирования в YPD штаммы дрожжей выращивали в течение 8 ч в YPLac. 40 мкг белкового экстракта от каждого штамма дрожжей загружали в 12% SDS-PAGE. Иммуноблоттинг осуществляли с помощью иммунной сыворотки кролика к IBDV (1:10000) и антитела козы к антителу кролика, конъюгированного с HRP (1:10000). Агрегированные (агр.) и мономерные (мон.) IBDV-VP2 указаны справа с помощью стрелок, неспецифические полосы с помощью звездочек. B. Результаты вестерн-блоттинг-анализа для определения содержания IBDV-VP2 в лиофилизированном подвергнутом тепловой инактивации материале дрожжей, который потом использовали в исследовании иммунизации на мышах BALB/c (C). После предварительного культивирования в YPD штаммы дрожжей выращивали в течение 15 ч. в YPLac. По 10 мкг белкового экстракта от каждого штамма дрожжей загружали в 12% SDS-PAGE, кроме того, осуществляли иммуноблоттинг, как показано выше (A), и полоски указаны соответствующим образом. C. Тест на иммуногенность обоих штаммов дрожжей VAK1127 и VAK1171 в эксперименте по иммунизации на мышах BALB/c. Группам по пять мышей каждая трижды подкожно вводили прививание из расчета 0,1 мг (сухой вес) проанализированного выше (B) материала дрожжей. В качестве контроля использовали штамм дикого типа (VAK367) без антигена. Первое введение проводили с CFA (полный адьювант Фрейнда) в качестве адьюванта, остальные два введения проводили с интервалами в две недели с IFA (неполный адьювант Фрейнда) в качестве адьюванта. Через одну неделю после третьего введения мышей умерщвляли и спускали кровь. Образцы сыворотки крови анализировали с помощью ELISA с применением IBDV-VP2 (IDEXX). Абсорбция при 650 нм, которая коррелирует с титром антител к IBDV-VP2, показана со стандартным отклонением. В качестве положительного контроля для ELISA использовали моноклональное антитело к IBDV-VP2 (положит. таб64), в качестве отрицательного контроля использовали либо тестовый буфер (отрицат. 1), либо неспецифическое антитело (отрицат. 2). Было показано, что оба штамма характеризуются аналогичными уровнями экспрессии чужеродного бел-

ка и способностью вызывать иммунный ответ.

На фиг. 11 в комбинации с табл. 3 показана защитная иммунизация кур SPF против vvIBDV посредством однократного подкожного введения дрожжей для прививания, генетически оптимизированных по IBDV-VP2. Группам из по меньшей мере 18 кур SPF однократно подкожно вводили прививание из расчета 10 мг подвергнутых тепловой инактивации клеток генетически оптимизированного штамма дрожжей *K. lactis* VAK1171, экспрессирующего тандемный IBDV-VP2, через две недели после вылупления. В качестве контролей использовали животных, привитых с помощью PBS или 10 мг VAK367. Их прививали дважды через две или четыре недели после вылупления. Через шесть недель после вылупления проводили заражение всех животных с помощью vvIBDV. Образцы сыворотки анализировали, как описано выше с помощью ELISA (ProFLOK IBD Plus, Synbiotics). Показаны определенные значения титра антител. Отдельными точками показаны отдельные значения титра антител для двенадцати проанализированных кур на группу, полоски представляют собой среднее значение со стандартным отклонением. В случае контролей определяли только титр антитела для кур, выживших после заражения. Было показано, что вакцинация типа "одно введение" с помощью субъединичной вакцины на основе дрожжей VAK1171 уже обеспечивает полную защиту от последующего воздействия vvIBDV.

На фиг. 12 показано определение характеристик штаммов VAK952 и VAK1283. (А) Штаммы дрожжей VAK952 (моновалентный с НА) и VAK1283 (бивалентный с НА, М1) предварительно инкубировали в YPD в колбах для встряхивания, а затем индуцировали в YPL в течение 6 ч. Измеряли оптическую плотность при 600 нм и собирали культуру, характеризующуюся 30 единицами OD, осадок разбивали с помощью стеклянных шариков и посредством иммуноблоттинга оценивали растворимую (LF), а также нерастворимую (P, осадок) белковую фракцию. В качестве первичного антитела применяли антитело к НА1 или антитело к М1, а в качестве вторичного антитела применяли антитело мыши IR-Dye800CW. Сигнал генерировали с помощью инфракрасной системы формирования изображений (LI-COR Biosciences). (В, С) Штаммы дрожжей предварительно инкубировали в YPD в колбах для встряхивания, а затем индуцировали в YPL в течение периода времени, составляющего 24 ч. В указанные моменты времени определяли оптическую плотность культуры дрожжей и собирали культуру, характеризующуюся 30 единицами OD. (В) Осадки VAK1283 разбивали с помощью стеклянных шариков и анализировали с помощью иммуноблоттинга. (С) Измеренные значения оптической плотности для VAK952 и VAK1283 обобщены в качестве кривой роста в виде зависимости от времени и представляют собой среднее значение по меньшей мере двух независимых испытаний. (D) Для теста с капельным разведением штаммы дрожжей выращивали в чашках с питательным агаром, содержащих YPD, в течение 48 ч при 30°C. Готовили серийные разбавления дрожжей, начиная с 1 единицы OD, а затем капали в чашки с питательным агаром, содержащие YPD или YPL. Содержимое чашек культивировали в течение 48 ч при 30°C, а затем фотографировали. Понсо S: окраска общего белка дрожжей соответствующей фракции, контроль загрузки. Было показано, что VAK952 (моновалентный с НА) и VAK1283 (бивалентный (НА, М1)) экспрессировали белок НА в сравнимых количествах. Также было показано, что VAK1283 и VAK952 характеризуются сравнимыми свойствами с точки зрения роста при небольшом преимуществе VAK1283.

На фиг. 13 проиллюстрирован титр антител в сыворотке крови, полученной от мышей BALB/c после иммунизации с помощью VAK952 (моновалентный с НА), а также VAK1283 (бивалентный с НА, М1) перед заражением и после него. Оба штамма дрожжей предварительно инкубировали в колбах для встряхивания с YPD, а затем индуцировали в течение 12 ч (VAK952) или 6 ч (VAK1283) в YPL. Затем культуры собирали, высушивали и материал дрожжей инактивировали в течение 2 ч при 90°C. Для осуществления иммунизации самок мышей BALB/c возрастом 9 недель иммунизировали дважды (прайм-буст) с промежутком в три недели или один раз (одно введение) путем подкожного введения 2 мг дрожжей (VAK952, VAK1283) или 1 мг VAK1283 или двух введений PBS (без адьюванта). В качестве адьюванта применяли AddaVax. Через три или шесть недель после последнего введения животных инфицировали с помощью 5x MLD<sub>50</sub> вируса гриппа A/PR/8/34 (H1N1) путем интраназального введения. В качестве контроля инфицирования служили ложноинфицированные животные (имитация), которым интраназально вводили только PBS без вируса. Через три или шесть недель после последнего введения, а также во время заражения у животных собирали образцы сыворотки крови и оценивали их в отношении нейтрализующего антитела (nAb) в VNT. Титр<sub>50</sub> nAb: разведение сыворотки крови, которое обеспечивает снижение числа бляшек на 50% по сравнению с контролем без вируса. Соответствующее разведение сыворотки приведено в виде log<sub>2</sub>. Вследствие логарифмического представления результатов образцам сыворотки крови без детектируемого количества антитела присваивали значение: log<sub>2</sub>(2)=1. mAb: контроль системы тестирования (антитело к H1 (H37-66)). Было показано, что обе схемы иммунизации приводили к значительной индукции нейтрализующего антитела. Также очевидно, что полученные значения титра нейтрализующих антител к НА значительно не отличаются в экспериментах с вакцинацией, проведенной по схеме прайм-буст и проведенной по схеме одна инъекция с помощью VAK952 и VAK1283.

На фиг. 14 показано заражение с помощью вируса гриппа A/PR/8/34 (H1N1) после иммунизации с помощью VAK952 (моновалентный с НА), а также VAK1283 (бивалентный с НА, М1). Через три или шесть недель после последнего введения (схему иммунизации см. на фиг. 13) мышей BALB/c инфицировали с помощью 5x MLD<sub>50</sub> вируса гриппа A/PR/8/34 (H1N1) путем интраназального введения. В качест-

ве контроля инфицирования служили ложноинфицированные животные (имитация), которым интраназально вводили только PBS без вируса. Выживаемость (А), массу тела (В), а также клинические симптомы (С) животных затем оценивали несколько раз в день в течение периода времени, составляющего 14 дней. Для клинических симптомов была установлена шкала баллов 0-4, которые усредняли для каждой группы (0: без отклонений; 1: слегка взъерошенная шерсть; 2: взъерошенная шерсть, сниженная активность; 3: взъерошенная шерсть, потеря массы тела 15%; 4: взъерошенная шерсть, потеря веса тела >20%). Было показано, что способ иммунизации прайм-буст с помощью VAK952 не обеспечивает оптимальной защиты против воздействия вируса, как это происходит в случае VAK1283. В случае обеих вакцин схема одна инъекция из расчета 2 мг вводимой вакцины обеспечивает оптимальную защиту. При введении 1 мг VAK1283 обеспечивается степень защиты, аналогичная введению 2 мг VAK952 в способе прайм-буст.

Примеры осуществления изобретения

Пример 1. Получение штамма-хозяина с двумя копиями гена KIGAL4, стабильно интегрированными в несвязанные локусы гена.

Обеспечивали вставку второй копии гена KIGAL4 без селективируемого маркера в другой локус гена (эктопически). Вставку можно локализовать путем секвенирования гена KIAVT3 (KLLA0E13795g) (Klavt3::KIGAL4-I, SEQ ID NO: 1) (фиг. 1). Полученный штамм называется VAK1111. Независимую мейотическую сегрегацию обеих копий KIGAL4, расположенных на хромосоме E (эктопическая копия) и D (геномная копия), подтверждали путем эксперимента по скрещиванию. Кроме того, в том же эксперименте определяли то, что количество копий гена KIGAL4-1 в геноме составляет точно две.

Чтобы применять VAK1111 для целенаправленной интеграции кассеты экспрессии в локус LAC4 по аналогии с VAK367-D4, вводили фрагмент нарушения функции гена lac4::ScURA3, который обеспечивает возможность интеграции необходимого чужеродного гена без маркеров между промотором LAC4 и рамкой считывания LAC4 за одну стадию с помощью технологии на основе векторов KIp в условиях отбора при выращивании на лактозе (Krijger et al. (2012)). Полученный штамм VAK1123 отличается от VAK367-D4 только второй эктопической копией гена KIGAL4.

Пример 1.1. Улучшенное продуцирование вакцинного штамма дрожжей с дополнительным интегрированным геном KIGAL4.

В одном примере применения ген IBDV-oVP2<sub>T2S</sub> (Arnold et al. (2012)) вставляли в локус LAC4 штамма VAK1123 (получали штамм VAK1130). Обнаружили повышенное продуцирование IBDV-VP2 по сравнению со штаммом с только одной копией KIGAL4, который в остальном был изогенным данному штамму (VAK910). Для сравнения также показан штамм VAK1118, который несет только один ген KIGAL4, но две копии CDS VP2IBDY (см. ниже) (фиг. 2).

Пример 2. Промотор P<sub>LAC4-12LR2</sub> со сниженной базовой активностью для оптимизации экспрессии антигена с цитопатическим эффектом.

Продуцирование гетерологичного белка в микроорганизмах является проблематичным, когда оно приводит к цитопатическому эффекту (CPE). Таким образом, цель заключалась в обеспечении подхода отделения фазы продуцирования антигена от фазы накопления биомассы. За счет применения индуцируемого промотора LAC4 это становится частично возможным посредством способа периодической ферментации с подпиткой, но затруднено, поскольку в неиндуцирующих условиях промотор P<sub>LAC4-12</sub> не является полностью неактивным. В случае антигенов с очень сильным CPE это приводит к снижению скорости роста и к индукции стрессового ответа в клетке с отрицательными эффектами в отношении продуцирования антигена. Данная проблема усугубляется удвоением дозы гена KIGAL4 и/или повышением числа генов, кодирующих антиген (см. ниже). Для ее решения удаляли основной контрольный участок (BCR) промотора P<sub>LAC4-12</sub> (фиг. 3A) (Mehlgarten et al. (2015)) от -1065 до -1540 (делеция LR2; P<sub>LAC4-12-LR2</sub>, SEQ ID NO: 2). Данную делецию вводили в исходные штаммы VAK367 (одна копия KIGAL4) и VAK1111 (две копии KIGAL4) в геномный локус LAC4 вместе с фрагментом нарушения функции гена lac4::ScURA3. Полученные штаммы VAK1109 и VAK1124 являются подходящими для экспрессии антигенов с CPE. Промотор P<sub>LAC4-12LR2</sub> также использовали в интегрируемых векторах KIpURA3-Et и KIpMET5-Et (см. ниже).

Пример 2.1. Подавление базовой (неиндуцируемой) экспрессии антигена за счет модифицированного промотора.

После интеграции тандемной кассеты экспрессии IBDV-VP2 в VAK1124 (полученный штамм дрожжей: VAK1131; объяснение термина "тандемная кассета экспрессии" см. ниже и на фиг. 7), можно было увидеть, что в результате делеции LR2 в промоторе LAC4-12 продуцирование белка VP2 в неиндуцирующих условиях значительно снизилось (фиг. 3B). Может увидеть, что у штаммов, которые экспрессируют антиген вируса гриппа А, гемагглютинин (VAK952 без делеции, VAK1243 с делецией LR2 в промоторе), цитопатический эффект антигена HA вируса гриппа А подавляется, и за счет делеции LR2 рост в неиндуцирующих условиях улучшается (фиг. 3C).

Пример 3. Универсальная векторная система для направленной интеграции нескольких кассет экспрессии в геном *K. lactis*.

Штамм дрожжей VAK367, как и ранее VAK367-D4 (Krijger et al. (2012)), WO 20101054649), обеспечивал генетический фон для всех штаммов *K. lactis*, описанных в данном документе. Для данного штам-

ма характерны мутации в двух генах KIURA3 (KLLA0E22771g) и KIMET5 (KLLA0B03938g), которые обозначены как аллели Klura3-20 (отсутствующая пара оснований в положении +345) и KImet5-1 (G2555A и A3682T), он нуждается в урациле и метионине (ауксотрофия); таким образом, эти аллели являются нефункциональными вариантами гена.

Данные мутантные аллели использовали в дополнение к сайту интеграции LAC4, уже разработанному с помощью KIp3/KIp3-MCS (Krijger et al. (2012)), в качестве дополнительных локусов для целенаправленной интеграции и, таким образом, для получения мультивалентных вакцинных штаммов (фиг. 4А). Отбор проводили за счет восстановления генной функции данных мутантных генов без дополнительной вставки селектируемого маркера. С этой целью создавали новые векторы для интеграции. В данных векторах кассеты экспрессии (в каждом случае под контролем промотора LAC4-12 или его вариантов) фланкируются фрагментами гена, что обеспечивает возможность интеграции выше гена KIURA3 или ниже гена KIMET5 за счет гомологичной рекомбинации, и, тем самым, восстанавливает последовательности дикого типа данных генов.

За счет мутагенеза и отбора по ауксотрофии в отношении альтернативных стимуляторов роста можно обнаружить аналогичные дополнительные локусы в качестве сайта интеграции.

Пример 3.1. Векторы KIpURA3 и KIpMET5 для направленной интеграции кассет экспрессии (с индуцируемым промотором LAC4-12) в локусы KIURA3 (KLLA0E22771g) и/или KIMET5 (KLLA0B03938g) штаммов *K. lactis* с аллелями Klura3-20 или KImet5-1.

С помощью соответствующих генных фрагментов (нацеливающие последовательности KIMET5/KIURA3), которые обеспечивают целенаправленное восстановление функциональности аллелей Klura3-20 или KImet5-1, конструируют интегрируемые векторы экспрессии KIpURA3 (SEQ ID NO: 3) и KIpMET5 (SEQ ID NO: 4).

Вектор экспрессии KIpMET5 содержит кассету экспрессии, состоящую из промотора LAC4-12 ( $P_{LAC4-12}$  или его вариантов), последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей подлежащий экспрессии антиген, а также терминатора AgTEF1; выше геномного фрагмента KIMET5 она фланкирована вставленным терминатором ScCYC1, а ниже промотора KIAIM18 фланкирована геном KIAIM18, находящимся ниже.

Вектор экспрессии KIpURA3 содержит кассету экспрессии, состоящую из промотора LAC4-12 ( $P_{LAC4-12}$  или его вариантов), последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей подлежащий экспрессии антиген, а также терминатора AgYEF1; выше KLLA0E22749g она фланкирована соответствующим промотором, а ниже промотора KIURA3 фланкирована фрагментом KIURA3, находящимся ниже (фиг. 4В, С).

В каждом случае последовательность, кодирующую антиген, клонируют за счет сайтов рестрикции AscI и NotI между промотором и терминатором. За счет рестрикции полученной плазмиды с помощью Eco9II или KpnI кассета экспрессии целиком отделяется от векторной основы KIpURA5, с помощью HindIII или BoxI от KIpMET5, и рестриktionную смесь трансформируют в штаммы хозяева *K. lactis* с аллелем Klura3-30 и/или KImet5-1. Следовательно, кассета экспрессии с чужеродным геном, интегрированная таким образом в KIURA3-20 или KIMET5-1, точно соответствует кассете, которую можно интегрировать в LAC4 в VAK367-D4 с помощью вектора KIp3-MCS (WO 20101054649). Проверку урациловых или метиониновых прототрофных трансформантов осуществляют стандартным способом с помощью ПЦР колоний с праймерами MAB6 и VK211 в случае трансформантов с KIpMET5 или праймеров MAB6 и VK71 в случае трансформантов с KIpURA3. Когда кассеты экспрессии интегрируются в правильное местоположение между KIURA3 или KIMET5 и соответствующим смежным геном, образуются продукты размером 1652 п.о. в случае трансформантов с KIpMET5 или 1307 п. о. в случае трансформантов с KIpURA3. Отсутствовали какие-либо доказательства, что в результате вставки нарушалась функция смежных генов.

Праймер.

MAB6: 5'-CCCAGATGCGAAGTTAAGTG-3' (SEQ ID NO: 11)

VK71: 5'-TACAACAGATCACGTGATCTTTTGTAAAG-3' (SEQ ID NO: 12)

VK211: 5'-GATTTTCGTAACCCATTGTTTCATGAATG-3' (SEQ ID NO: 13)

Пример 3.2. Экспрессия чужеродного антигена после интеграции кассеты, кодирующей ген, в локус KIURA3 или KIMET5.

Чужеродный ген под контролем промотора  $P_{LAC4-12}$  примерно одинаково сильно индуцируется лактозой после интеграции в локус LAC4, KIURA3 и KIMET5. Термолабильная нетоксическая субъединица В энтеротоксина (Etx.B) из *E.coli* и (HA)<sub>3</sub>-эпитоп на С-конце (Etx.B-HA) служили в качестве тестовых белков для оценки векторной системы. Кодирующую последовательность клонировали в векторы KIpMET5, KIpURA3 и KIp3-MCS и интегрировали в генные локусы KIMET5 (VAK1251), KIURA3 (VAK1235) и LAC4 (VAK899) (фиг. 4D). Как показано с помощью вестерн-блоттинга, во всех трех штаммах концентрация белка Etx.B-HA является очень схожей (фиг. 4D). Соответственно, нельзя было определить эффект положения, зависимость количества продуцируемого рекомбинантного белка от сай-

та интеграции кассеты экспрессии в геном.

Пример 3.3. Совместная экспрессия двух чужеродных антигенов в одной и той же дрожжевой клетке.

Возможность продуцировать различные гетерологичные белки под контролем промотора  $P_{LAC4-12}$  в одном и том же штамме дрожжей с помощью новой векторной системы можно было обеспечить путем конструирования штамма дрожжей с кассетой экспрессии Etx.B-NA в локусе KIURA3 и кассетой экспрессии в локусе LAC4 с двумя копиями  $VP2_{IBDV}$ , которые присутствуют в виде тандема (VAK1234; фиг. 5; объяснение, касающиеся тандемной кассеты см. ниже и на фиг. 7). При сравнении со штаммами дрожжей, в геноме каждого из которых присутствовала только одна кассета экспрессии (VAK1235 или VAK1171), в случае VAK1234 не обнаружили какого-либо снижения концентрации белка Etx.B-NA или  $VP2_{IBDV}$ .

Пример 4. Варианты промотора LAC4 для модуляции синтеза рекомбинантного белка в аналогичных индуцирующих условиях.

Иммуногенное действие антигенов зачастую основано на сборке нескольких белков при нестехиометрическом соотношении. Чтобы обеспечить его в вакцинах на основе дрожжей, создавали варианты промотора  $P_{LAC4-12LR2}$  (фиг. 6A), которые могут индуцироваться в различной степени под действием лактозы или галактозы. Они отличаются числом сайтов связывания для активатора KIGal4 (U1, U2, U4, U5; Gödecke et al. (1991)) и присутствием или отсутствием основного контрольного участка BCR. В дополнение к конструкциям, показанным на фиг. 3A, которые использовали в векторе KIpURA3, за счет вставки дополнительных сайтов связывания можно получать варианты промотора с более высокой эффективность промотора. В результате этого получают синтетические, индуцируемые лактозой промоторы, предназначенные для улучшения векторной системы, и при одних и тех же индуцирующих условиях можно обеспечивать различные уровни экспрессии белков или генов.

Пример 4.1. Экспрессия чужеродного антигена под контролем различных вариантов промотора LAC4.

Экспрессия Etx.B-NA под контролем четырех вариантов промоторов LAC4-12. Тестировали четыре варианта промотора LAC4, которые отличаются числом сайтов связывания для активатора транскрипции KIGal4, а также присутствием/отсутствием контрольного участка для базового уровня экспрессии в неиндуцирующих условиях (основной контрольный участок, BCR; фиг. 6A; SEQ ID NO: 14). С помощью данных вариантов создавали векторы KIpURA3-Et KIpURA3-PL412-Et, KIpURA3-PL412LR2-Et, KIpURA3-PL4-Et и KIpURA3-PL4LR2 и в каждом случае в качестве тестового GOI вставляли белок Etx.B-NA. Как описано выше, возможна вставка альтернативного GOI за счет сайтов рестрикции AscI и NotI. Кассеты экспрессии интегрировали в локус KIURA3 и концентрацию белка Etx.B-NA определяли количественно посредством вестерн-блоттинга (фиг. 6B). Было показано, что в одинаковых индуцирующих условиях (4 ч в полной среде с лактозой) наиболее длинный вариант промотора  $P_{LAC4-12}$ , который содержит полный межгенный участок от гена LAC4 до LAC12 и содержит четыре сайта связывания для KIGal4 (U1, U2, U4, U5) (Gödecke et al. (1991)), обеспечивает самую высокую концентрацию белка. Когда в LAC4 присутствуют только два проксимальных сайта связывания U1 и U2 (от -1064 до -10), дополнительная делеция BCR (от -1540 до -1065) приводит к снижению количества белка даже в индуцирующих условиях.

Пример 5. Повышение продуцирования антигена за счет повышения числа копий гена, кодирующего антиген.

Таким образом, описанную выше векторную систему модифицировали для быстрого и эффективной замены нескольких копий гена одной за другой и введения данной кассеты экспрессии за одну стадию в один из трех генных локусов (фиг. 7A).

Для получения тандемной кассеты экспрессии, интегрируемой в локус LAC4, за одну стадию из какой-либо матрицы KIp3(-MCS)-GOI подвергают слиянию (клонирование In-Fusion) три ПЦР-амплифицированные фрагмента: (1 и 2) кассеты экспрессии с  $P_{LAC4-LR2}$  и  $T_{TEF}$  (праймер: VK30 и VK31 или VK32 и VK33) и (3) нацеливающую последовательность для LAC4 (VK34 и VK35)). После рестрикции, например, с помощью HpaI, тандемная кассета экспрессии может интегрироваться в локус lac4::URA3, как описано (фиг. 7). После успешной интеграции кассеты экспрессии, в зависимости от исходного штамма, первая копия чужеродного гена регулируется либо посредством  $P_{LAC4-12}$ , либо  $P_{LAC4-12-LR2}$ , а вторая - посредством  $P_{LAC4-LR2}$ . В качестве альтернативы, за счет вставки селектируемого маркера между двумя кассетами экспрессии в сайты рестрикции SmaI, MluI или PmeI и отделения нацеливающей последовательности для LAC4 за счет KpnI получают тандемную кассету, которая может интегрироваться в геном ненаправленным образом за счет NHEJ. Если кассета экспрессии вырезана с помощью MreI и AvaI, можно лигировать совместимые концы и, таким образом, создавать длинные кассеты экспрессии из нескольких кассет. Посредством повторной рестрикции с помощью MreI и AvaI смесь для лигирования обогащается фрагментами, в которых кассеты экспрессии расположены в тандеме (голова к хвосту). Их подвергают трансформации и ненаправленной интеграции путем отбора с применением маркера.

Праймер.

VK30: 5'-TATAGGGCGAATTGGAGCTCCGCCGGCGGAAGAGGTAACGCCCTTTTGT AAC-3' (SEQ ID NO: 15)

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

VK32: 5'-GCGAGTTCCGTTTAGACGCGTTTAAACTGTTTAATTATTATGGGGCAG GCGAGA-3' (SEQ ID NO: 17)

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

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

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

Пример 5.1. Успешное применение стратегии с множественными копиями.

Стратегию подтверждали с помощью IBDV-VP2 в качестве антигена и полученной из KIp3 кассеты экспрессии, которая содержала две последовательности, кодирующие IBDV-VP2 (CDS-VP2IBDV), в тандеме. Тандемная кассета экспрессии IBDV-VP2 (фиг. 7A) в векторе KIp3 (плазмида KIp3-тандем-оVP2T2S, SEQ ID NO: 21) состоит из двух регулируемых промотором LAC4 кодирующих последовательностей для VP2<sub>IBDV</sub> (CDS-VP2<sub>IBDV</sub>) из KIp3-MCS-оVP2T2S (Arnold et al, (2012)). Промоторные последовательности состоят из участка промотора LAC4 от -1123 до -10 для первой копии и от -1099 до -10 для второй копии. Оба CDS-VP2<sub>IBDV</sub> фланкированы на 3'-конце терминатором AgTEF1. Плазмиду KIp3-тандем-оVP2T2S разрезали с помощью HpaI и рестрикционную смесь трансформировали в штамм VAK367-D4. Полученный таким образом штамм дрожжей VAK1118 содержит тандемную кассету экспрессии, интегрированную в локус LAC4. Как показано с помощью вестерн-блоттинга, концентрация белка IBDV-VP2 в данном штамме выше по сравнению с изогенным штаммом с только одной копией (фиг. 7B). Тандемная кассета экспрессии генетически является очень стабильной: после выращивания в течение 78 поколений в индуцирующей среде (YNB + лактоза) у 100 колоний, протестированных с помощью ПЦР, было показано отсутствие генетической модификации кассеты экспрессии (данные не показаны).

Пример 6. Инструменты для обеспечения прототрофии в штаммах *K. lactis* для упрощенной ферментации в синтетической среде и полной среде.

В проведенных исследованиях было показано, что в полной среде урациловые ауксотрофные штаммы дрожжей растут хуже, чем урациловые прототрофные штаммы, причем этот эффект может быть лишь частично устранен при добавления урацила. Следовательно, чтобы упростить ферментацию штаммов для вакцин, облегчить внедрение процессов производства и обеспечить их экономичность, а также избежать воздействий на рост вследствие недостаточного поглощения метионина и/или урацила, необходимо найти пути для быстрого и воспроизводимого устранения ауксотрофии, необходимой при конструировании штамма. Для восстановления KIURA3 из Kluga3-20 посредством ПЦР получают ДНК-фрагмент с помощью праймеров VK67 и VK69 и гена KIURA3 дикого типа в качестве матрицы (фиг. 8A). Аналогичным образом, для исправления аллеля KImet5-1 получают ПЦР-фрагмент с помощью праймеров VK74 и VK75 и аллеля KIMET5 дикого типа в качестве шаблона (фиг. 8B). Трансформация ПЦР-фрагментов в соответствующие мутантные штаммы (отдельно или совместно) и отбор на среде без метионина и/или без урацила приводили к высокоэффективному восстановлению аллелей дикого типа. В частности, данный процесс проводили для образования штаммов VAK1171 и VAK1400 (см. выше).

Праймер.

VK67: 5'-GACATCACTGTCTCTCCCTTAATGATC-3' (SEQ ID NO: 22)

VK69: 5'-TCAGCAAGCATCAATAATCCCTTGGTTC-3' (SEQ ID NO: 23)

VK74: 5'-GAAAGAAAGACGTTGGTCTCTACGCTTG-3' (SEQ ID NO: 24)

VK75: 5'-AGATTATAAGTTCCTGGGGCTTTACCCAC-3' (SEQ ID NO: 25)

Пример 7. Защитная иммунизация с помощью оптимизированных инактивированных дрожжей для вакцин.

Модификации и оптимизации платформы для разработки вакцины на основе *K. lactis*, осуществленные согласно примерам 1-5, валидировали в различных исследованиях вакцинации.

Пример 7.1. Иммуногенность оптимизированной платформы на основе *K. lactis* с применением в качестве примера штамма дрожжей, экспрессирующего IBDV-VP2 (VAK1127).

Штамм VAK1127 содержит тандемную кассету экспрессии IBDV-VP2 (SEQ ID NO: 21), две копии KIGAL4 и делецию LR2 в промоторе LAC4. Для определения характеристик иммуногенности штамма дрожжей проводили испытания по иммунизации организмов-мишеней, представляющих собой кур. В

экспериментах с заражением достигали полной защиты кур SPF от высоковирулентного (vv) штамма IBDV89163/7.3 (AFSSA, Плуфраган, Франция), хорошо охарактеризованного Eterradossi и коллегами (1997) (табл. 1 и 2). В двух проведенных независимо испытаниях с этой целью дважды (фиг. 9А и В) подкожно вводили 1 мг лиофилизированных, подвергнутых тепловой инактивации (2 ч, 90°C) дрожжей (VAK1127) с неполным адьювантом Фрейнда (IFA) (прайм-буст). Введение осуществляли через две недели и четыре недели после вылупления, воздействие вирусом (заражение) осуществляли шесть недель после вылупления. Через 19 дней у животных, вакцинированных с помощью VAK1127, уже можно измерять высокий титр антител к IBDV-VP2. У контролей титр антител к IBDV-VP2 появляется только после заражения с помощью vvIBDV (фиг. 9). В обоих экспериментах наблюдали полную защиту (0% заболеваемости, 0% смертности) животных, вакцинированных с помощью VAK1127, от заражения с помощью vvIBDV (табл. 1 и 2). С помощью данных экспериментов можно наблюдать защиту от vvIBDV с помощью субъединичной вакцины при классическом способе прививания прайм-буст.

На иммуногенность дрожжей для прививания не влияет генетическая обратная мутация прототрофных штаммов дрожжей, несущих антиген. Это можно показать с помощью соответствующих ауксотрофных или прототрофных форм штамма дрожжей, экспрессирующих IBDV-VP2, в эксперименте по вакцинации мышей (фиг. 10С).

Штамм дрожжей VAK1127 (ауксотрофный) превращали в прототрофный, как описано выше (пример 6; фиг. 8), за две стадии с помощью ПЦР-фрагментов с получением VAK1171. У обеих форм штамма отсутствует какая-либо значительная разница в уровне экспрессии рекомбинантного белка (фиг. 10А и В). Мышей прививали подкожно трижды с двухнедельными интервалами с помощью подкожной инъекции 0,1 мг подвергнутых тепловой инактивации дрожжей с IFA. Между ауксотрофным штаммом, экспрессирующим IBDV-VP2 (VAK1127), и его прототрофным производным (VAK1171) не обнаружили каких-либо отличий в степени сероконверсии (фиг. 10С).

Пример 7.2. Полная защиты посредством вакцинации по схеме "одна инъекция".

Вакцинация по типу "одна инъекция", т.е. прививание посредством однократного введения вакцины, обычно является неэффективной в случае субъединичных вакцин из-за недостаточной иммуногенности. Однако данные по появлению титра антител (фиг. 9), полученные для оптимизированного штамма VAK1127 в способе прайм/буст, указывают на возможность обеспечения защиты также в подходе одна инъекция. Для проверки этого проводили вакцинацию по типу одна инъекция с помощью прототрофного штамма дрожжей VAK1171 (фиг. 11; табл. 3). При этом дрожжи вводили только один раз в повышенной дозе (10 мг) и заражение проводили с промежутком 4 недели. Было показано, что с помощью VAK1171 при схеме "одна инъекция" фактически можно достичь полной защиты от vvIBDV (0% заболеваемости, 0% смертности) (табл. 3). Такой результат связывают с достижением более высокого титра защитных антител примерно через 20 дней после вакцинации (фиг. 11). Тот факт, что схема прививания "одна инъекция" обеспечивает высокую степень защиты от vvIBDV, показывает сильный иммуногенный потенциал использованной вакцины и внушительно доказывает применимость оптимизированной платформы для разработки вакцины.

Пример 7.3. Улучшенная защита, обеспечиваемая бивалентной вакцины на основе дрожжей, по сравнению с моновалентной вакциной на основе дрожжей при применении против инфекций, вызванных вирусом гриппа А.

Для вакцинации против вируса гриппа типа А получали три различных вакцинных штамма. Первым создавали VAK952 (DSM 32705), который экспрессирует основной антиген штамма вируса гриппа А (Puerto Rico/8/1934; PR8/34), ген HA (гемагглютинина). Ген интегрировали в VAK952 с помощью способа, описанного в Krijger et al. (2012) и Arnold et al. (2012), в локус LAC4 в геноме. Вторым создавали VAK1283 (DSM 32697). В этом случае в дополнение к гену HA из PR8/34 в локусе LAC4 также интегрировали ген M1 в локус URA3. Ген M1 кодирует еще один важный антиген вируса гриппа А, который консервативен в значительно большей степени, чем HA. В уже опубликованных отчетах было показано, что путем объединения обоих антигенов можно повышать иммуногенность вакцины от вируса гриппа А, а также обеспечить перекрестную защиту от различных вирусов гриппа. Для валидации данного аспекта с применением бивалентной вакцины на основе дрожжей получали другой штамм (VAK1395; DSM 32706), который также содержал ген M1 в локусе URA3 и при этом ген HA из PR8/34 был заменен на ген HA вируса гриппа California/4/2009. Подтверждали сравнимый уровень экспрессии HA или дополнительной экспрессии M1 в соответствующих штаммах; также было показано, что штаммы характеризуются сравнимым ростом с небольшим преимуществом VAK1283 относительно VAK952 (фиг. 12). В исследованиях вакцинации, в которых схему "прайм-буст" или "одна инъекция" соответственно применяли на мышинной модели при различных концентрациях дрожжей, было показано, что каждый из VAK952 и VAK1283 индуцирует аналогичные титры нейтрализующего вирус антитела (фиг. 13). Однако в эксперименте с заражением стало очевидно, что бивалентная вакцина на основе VAK1283 обеспечивала максимальную защиту как в схеме "прайм-буст", так и в схеме "одна инъекция", в то же время в случае моновалентной вакцины на основе VAK952 этого не происходило. Кроме того, в случае вакцины на основе VAK1283 в эксперименте по типу "одна инъекция" половина используемого материала дрожжей обеспечивала эффект, аналогичный таковому для VAK952 в подходе "прайм-буст" (фиг. 14 и табл. 3). В экспе-

риментах, в которых использовали вакцину на основе VAK1395, также можно было наблюдать защиту от гриппа PR8/34. Таким образом, с помощью бивалентной вакцины на основе дрожжей обеспечивалась перекрестная защита от различных вариантов вируса гриппа.

Таблица 1

Прививка (а)		Гистопатологическая оценка повреждения фабрициевой сумки					Индекс bu/bod (с)		Заболеваемость (%) (d)	Смертность (%) (е)	
Штамм дрожжей (VAK)	Количество VP2 на дозу прививки	Адьювант	0	1	2	3	4	с заражением			без заражения
367	Отсутствует	IFA	0	-	-	1	7	2,80±1,32	5,36±0,65	6/10 (60)	4/10 (40)
1127	4,1±0,25 мкг	IFA	8	-	-	1	-	4,40±0,76	4,89±0,63	0/10	0/10
-	PBS	IFA	-	-	-	-	10	4,08±1,91	4,92±0,94	10/10 (100)	8/10 (80%)

Таблица 2

Прививка (а)		Гистопатологическая оценка повреждения фабрициевой сумки					Индекс bu/bod (с)		Заболеваемость (%) (d)	Смертность (%) (е)	
Штамм дрожжей (VAK)	Количество VP2 на дозу прививки	Адьювант	0	1	2	3	4	с заражением			без заражения
1127	4,1±0,71 мкг	IFA	6	-	-	-	-	5,10±0,78	4,81±1,20	0/9 (0)	0/9 (0)
-	PBS	IFA	-	-	-	-	8	4,09±1,87	5,32±0,85	9/9 (100)	7/9 (78)

Таблица 3

Прививка (а)		Гистопатологическая оценка повреждения фабрициевой сумки					Индекс bu/bod (с)		Заболеваемость (%) (d)	Смертность (%) (е)	
Штамм дрожжей (VAK)	Количество VP2 на дозу прививки	Адьювант	0	1	2	3	4	с заражением			без заражения
PBS	Отсутствует	MF59	-	-	-	-	9	3,73±1,92	4,77±1,02	9/9 (100)	6/9 (66)
VAK367	Отсутствует	MF59	-	-	-	-	10	4,09±1,58	3,60±0,89	10/10 (100)	9/10 (90)
VAK1171	35±4,2 мкг	IFA	10	-	-	-	-	4,48±0,37	3,96±1,02	0/10 (0)	0/10 (0)

Пояснения к табл. 1.

(а) Через две недели после вылупления курам вводили подкожно прививку из 1 мг дрожжей (или PBS) и IFA в качестве адьюванта. Через две недели после введения прививки им таким же образом вводили буст. Еще через две недели проводили тест с заражением вирусом, вводимым посредством глазного пути из расчета 10 EID vvlBDV (очень вирулентный 89163/7.3). В качестве дрожжей для прививания применяли инактивированные цельные дрожжи штамма VAK1127, группу, которую прививали только с помощью PBS и IFA, служила в качестве контроля инфицирования. Группа, у которой применяли дрожжи дикого типа без антигена (VAK367), служила в качестве контроля для определения эффекта дрожжей самих по себе.

(b) Гистопатологическую оценку повреждения фабрициевой сумки проводили с помощью шкалы от 0 до 4: 0: отсутствие повреждения; 1: 5-25% пораженных фолликулов; 2: 26-50% пораженных фолликулов; 3: 51-75% пораженных фолликулов; 4: 76-100% поражение фабрициевой сумки (утрата структуры).

(с) Среднее значение индекса отношения массы фабрициевой сумки к массе тела (bu/bod) рассчитывали с помощью формулы: (масса фабрициевой сумки/масса тела)×1000. Контрольная группа без нагрузки состояла из по меньшей мере семи кур, группа с нагрузкой состояла из десяти. Приведено стандартное отклонение.

(d) Заболеваемость приведена как количество заболевших кур к общему количеству кур в группе. Процент заболевших кур показан в скобках.

(е) Смертность приведена как количество погибших кур на общее количество кур в группе. Процент погибших кур показан в скобках.

Пояснения к табл. 2.

(а) Через две недели после вылупления курам вводили подкожно прививку из 1 мг дрожжей (или PBS) и IFA в качестве адьюванта. Через две недели после введения прививки им таким же образом вводили буст. Еще через две недели осуществляли тест с заражением вирусом, вводимым посредством глазного пути с помощью 10<sup>4</sup> EID vvlBDV (очень вирулентный 89163/7.3). В качестве дрожжей для прививания применяли инактивированные цельные дрожжи штамма VAK1127, группу, которую прививали только с помощью PBS и IFA, служила в качестве контроля инфицирования.

(b) Гистопатологическую оценку повреждения фабрициевой сумки проводили с помощью шкалы от 0 до 4: 0: отсутствие повреждения; 1: 5-25% пораженных фолликулов; 2: 26-50% пораженных фолликулов; 3: 51-75% пораженных фолликулов; 4: 76-100% поражение фабрициевой сумки (утрата структуры).

(с) Среднее значение индекса отношения массы фабрициевой сумки к массе тела (bu/bod) рассчитывали с помощью формулы: (масса фабрициевой сумки/масса тела)×1000. Контрольная группа без нагрузки состояла из по меньшей мере пяти кур, группа с нагрузкой состояла из девяти. Приведено стандартное отклонение.

(d) Заболеваемость приведена как количество заболевших кур к общему количеству кур в группе. Процент заболевших кур показан в скобках.

(e) Смертность приведена как количество погибших кур на общее количество кур в группе. Процент погибших кур показан в скобках.

Пояснения к табл. 3.

(a) Через две недели после вылупления курам вводили подкожно прививку из 10 мг дрожжей (или PBS) и IFA в качестве адьюванта. Через четыре недели проводили тест с заражением вирусом, вводимым посредством глазоносового пути из расчета  $10^4$  EID vvIBDV (очень вирулентный 89163/7.3). В качестве дрожжей для однократного прививания применяли инактивированные цельные дрожжи штамма VAK1171. Группа, которую прививали только с помощью PBS и MF59, а также группа, которую прививали с помощью дрожжей дикого типа и MF59, служили в качестве контроля инфицирования; при этом через две недели после введения первой прививки обеим группам вводили буст с помощью такого же количества дрожжей или PBS.

(b) Гистопатологическую оценку повреждения фабрициевой сумки проводили с помощью шкалы от 0 до 4: 0: отсутствие повреждения; 1: 5-25% пораженных фолликулов; 2: 26-50% пораженных фолликулов; 3: 51-75% пораженных фолликулов; 76-100% поражение фабрициевой сумки (утрата структуры).

(c) Среднее значение индекса отношения массы фабрициевой сумки к массе тела (bu/bod) рассчитывали с помощью формулы: (масса фабрициевой сумки/масса тела)×1000. Каждая группа состояла из по меньшей мере девяти кур. Приведено стандартное отклонение.

(d) Заболеваемость приведена как количество заболевших кур к общему количеству кур в группе. Процент заболевших кур показан в скобках.

(e) Смертность приведена как количество погибших кур к общему количеству кур в группе. Процент погибших кур показан в скобках.

Последовательности.

Настоящее изобретение содержит в качестве части описания следующие последовательности.

SEQ ID NO	Название
1	K. lactis avt3::LAC9
2	$P_{LAC4-12-LR2}$
3	Вектор $KIpURA3$
4	Вектор $KIpMET5$
5	Вариант $P_{LAC4-12}$ промотора $LAC4-12$
6	Вариант $P_{LAC4-12-LR2}$ промотора $LAC4-12$
7	Вариант $P_{LAC4}$ промотора $LAC4-12$
8	Вариант $P_{LAC4-LR2}$ промотора $LAC4-12$
9	Последовательность праймера VK183
10	Последовательность праймера VK184
11	Последовательность праймера MAB6

**045050**

12	Последовательность праймера VK71
13	Последовательность праймера VK211
14	BCR из $P_{LAC4-12}$
15	Последовательность праймера VK30
16	Последовательность праймера VK31
17	Последовательность праймера VK32
18	Последовательность праймера VK33
19	Последовательность праймера VK34
20	Последовательность праймера VK35
21	<i>K/p3-тандем-оVP2T2S</i>
22	Последовательность праймера VK67
23	Последовательность праймера VK69
24	Последовательность праймера VK74
25	Последовательность праймера VK75

## Список литературных источников.

- Arnold, M.; Durairaj, V.; Mundt, E.; Schulze, K.; Breunig, K. D. & Behrens, S.-E. Protective Vaccination against Infectious Bursal Disease Virus with Whole Recombinant *Kluyveromyces lactis* Yeast Expressing the Viral VP2 Subunit, *PLoS ONE, Public Library of Science*, **2012**, *7*, e42870
- Berthoud, T. K.; Hamill, M.; Lillie, P. J.; Hwenda, L.; Collins, K. A.; Ewer, K. J.; Milicic, A.; Poyntz, H. C.; Lambe, T. & Fletcher, H. A. Potent CD8+ T-cell immunogenicity in humans of a novel heterosubtypic influenza A vaccine, MVA- NP+ M1, *Clinical infectious diseases, Oxford University Press*, **2011**, *52*, 1-7
- Bathurst, I. C. Protein expression in yeast as an approach to production of recombinant malaria antigens, *The American journal of tropical medicine and hygiene, ASTMH*, **1994**, *50*, 20-26
- Breunig, K. D. Multicopy plasmids containing the gene for the transcriptional activator LAC9 are not tolerated by *K. lactis* cells, *Current genetics, Springer*, **1989**, *15*, 143-148
- de Silva; Chandimal, U.; Tanaka, H.; Nakamura, S.; Goto, N. & Yasunaga, T. A comprehensive analysis of reassortment in influenza A virus, *Biology open, The Company of Biologists Ltd*, **2012**, *1*, 385-390
- Etteradossi, N.; Toquin, D.; Abbassi, H.; Rivallan, G.; Cotte, J. & Guittet, M. Passive Protection of Specific Pathogen Free Chicks Against Infectious Bursal Disease by In - Ovo Injection of Semi - Purified Egg - Yolk Antiviral Immunoglobulins, *Zoonoses and Public Health, Wiley Online Library*, **1997**, *44*, 371-383
- Gellissen, G. & Hollenberg, C. P. Application of yeasts in gene expression studies: a comparison of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* and *Kluyveromyces lactis*-a review, *Gene, Elsevier*, **1997**, *190*, 87-97
- Gödecke, A.; Zachariae, W.; Arvanitidis, A. & Breunig, K. D. Coregulation of the *Kluyveromyces lactis* lactose permease and  $\beta$ -galactoidase genes is achieved by interaction of multiple LAC9 binding sites in a 2.6 kbp divergent promoter, *Nucleic acids research, Oxford University Press*, **1991**, *19*, 5351-5358

- Granzow, H.; Birghan, C.; Mettenleiter, T. C.; Beyer, J.; Köllner, B. & Mundt, E. A second form of infectious bursal disease virus-associated tubule contains VP4., *Journal of virology, Am Soc Microbiol*, **1997**, *71*, 8879-8885
- Kasanga, C. J.; Yamaguchi, T.; Wambura, P. N.; Maeda-Machang'u, A. D.; Ohya, K. & Fukushi, H. Molecular characterization of infectious bursal disease virus (IBDV): diversity of very virulent IBDV in Tanzania, *Archives of virology, Springer*, **2007**, *152*, 783-790
- Kirchenbaum, G. A. & Ross, T. M. Eliciting broadly protective antibody responses against influenza, *Current opinion in immunology, Elsevier*, **2014**, *28*, 71-76
- Kirunda, H.; Erima, B.; Tumushabe, A.; Kiconco, J.; Tugume, T.; Mulei, S.; Mimbe, D.; Mworozzi, E.; Bwogi, J. & Luswa, L. Prevalence of influenza A viruses in livestock and free-living waterfowl in Uganda, *BMC veterinary research, BioMed Central*, **2014**, *10*, 50
- Krammer, F. & Palese, P. Influenza virus hemagglutinin stalk-based antibodies and vaccines, *Current opinion in virology, Elsevier*, **2013**, *3*, 521-530
- Krijger, J.-J.; Baumann, J.; Wagner, M.; Schulze, K.; Reinsch, C.; Klose, T.; Onuma, O. F.; Simon, C.; Behrens, S.-E. & Breunig, K. D. A novel, lactase-based selection and strain improvement strategy for recombinant protein expression in *Kluyveromyces lactis*, *Microbial Cell Factories*, **2012**, *11*, 112
- Kumar, K.; Singh, K. C. P. & Prasad, C. B. Immune responses to intermediate strain IBD vaccine at different levels of maternal antibody in broiler chickens, *Tropical animal health and production, Springer*, **2000**, *32*, 357-360
- Negash, T.; Gelaye, E.; Petersen, H.; Grummer, B. & Rautenschlein, S. Molecular evidence of very virulent infectious bursal disease viruses in chickens in Ethiopia, *Avian diseases, BioOne*, **2012**, *56*, 605-610
- Rautenschlein, S.; Kraemer, C. H.; Vanmarcke, J. & Montiel, E. Protective efficacy of intermediate and intermediate plus infectious bursal disease virus (IBDV) vaccines against very virulent IBDV in commercial broilers, *Avian diseases, BioOne*, **2005**, *49*, 231-237
- Remington's Practice of Pharmacy, 13. Ausgabe und J. of. Pharmaceutical Science & Technology, Vol. 52, Nr. 5, Sept-Okt., S. 238-311

Ridpath, J. F. Emerging pestiviruses infecting domestic and wildlife hosts, *Animal Health Research Reviews, Cambridge University Press*, **2015**, 16, 55-59

RKI, Influenza (Teil 2): Erkrankungen durch zoonotische Influenzaviren, **2016**

Schrauwen, E. J. A. & Fouchier, R. A. M. Host adaptation and transmission of influenza A viruses in mammals, *Emerging microbes & infections, Nature Publishing Group*, **2014**, 3, e9

Short, K. R.; Richard, M.; Verhagen, J. H.; van Riel, D.; Schrauwen, E. J. A.; van den Brand, J. M. A.; Mänz, B.; Bodewes, R. & Herfst, S. One health, multiple challenges: The inter-species transmission of influenza A virus, *One health, Elsevier*, **2015**, 1, 1-13

Steel, J.; Lowen, A. C.; Wang, T. T.; Yondola, M.; Gao, Q.; Haye, K.; García-Sastre, A. & Palese, P. Influenza virus vaccine based on the conserved hemagglutinin stalk domain, *MBio, Am Soc Microbiol*, **2010**, 1, e00018-10

WHO, Influenza (Seasonal), **2016**

WHO, Biologicals, Influenza, **2017**

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Штамм *Kluveromyces lactis* (*K. lactis*) для целенаправленного клонирования нуклеиновых кислот, кодирующих чужеродный антиген, в геном дрожжей штамма *K. lactis*, характеризующийся тем, что у штамма *K. lactis* в качестве дополнения к локусу KILAC4 в локусе KIURA3-20 и/или в локусе KIMET5-1 содержатся интегрированные кассеты экспрессии для чужеродных антигенов, при этом кассеты экспрессии *K. lactis* содержат промотор LAC4-12 ( $P_{LAC4-12}$ ) или вариант данного промотора, в том числе межгенный участок от LAC12 до LAC4, кодирующий чужеродный антиген участок и терминатор Ag-TEF1, и при этом указанный вариант указанного промотора LAC4-12 ( $P_{LAC4-12}$ ) выбран из по меньшей мере одного из

промотора LAC4-12 с модифицированной структурой промотора, которая в неиндуцирующих условиях не допускает или допускает только небольшую экспрессию чужеродного белка, при этом удален основной контрольный участок (BCR) промотора  $P_{LAC4-12}$  от -1065 до -1540 (делеция LR2;  $P_{LAC4-12-LR2}$ ; SEQ ID NO: 2); и

промотора LAC4-12 с модифицированной структурой промотора, которая обеспечивает возможность модуляции экспрессии чужеродного белка, при этом количество сайтов связывания для активатора KIGal4 промотора ("вышележащие активирующие последовательности" 1, 2 и 4, 5) варьируется, и присутствует 1, 2, 3 или 4 сайта связывания KIGal4.

2. Штамм *K. lactis* по п.1, характеризующийся тем, что в локусе KILAC4, или в локусе KIURA3-20, или в локусе KIMET5-1 полученных штаммов *K. lactis* содержатся несколько копий нуклеиновых кислот, кодирующих чужеродный антиген, которые вставлены посредством тандемной кассеты экспрессии или нескольких кассет экспрессии.

3. Штамм *K. lactis* по п.1 или 2, характеризующийся тем, что в локусе KILAC4 штамма *K. lactis* находится ген чужеродного антигена VP2 IBDV в форме тандемной кассеты экспрессии.

4. Штамм *K. lactis* по п.1 или 2, характеризующийся тем, что в локусе KILAC4, и/или в локусе KIURA3-20, и/или в локусе KIMET5-1 содержатся одна или более копий различных нуклеиновых кислот, кодирующих чужеродный антиген, которые вставлены посредством одной кассеты экспрессии, тандемной кассеты экспрессии или нескольких кассет экспрессии.

5. Штамм *K. lactis* по любому из пп.1, 2 и 4, характеризующийся тем, что в локусах KILAC4 и KIURA3-20 штамма *K. lactis* вставлены и экспрессируются гены, кодирующие чужеродные антигены HA вируса гриппа А ((A/Puerto Rico/8/1934(H1N1)) и M1 вируса гриппа А ((A/Puerto Rico/8/1934(H1N1))).

6. Штамм *K. lactis* по любому из предыдущих пунктов, характеризующийся тем, что штамм *K. lactis* в дополнение к геномному гену KIGAL4 содержит еще вторую эктопическую копию гена KIGAL4.

7. Штамм *K. lactis* по п.6, характеризующийся тем, что эктопическая копия гена KIGAL4, которая фланкирована промотором KIGAL4 и терминатором KIGAL4, интегрирована в штамме *K. lactis* в локус гена KLLA0E13795g (KlavtS::KIGAL4-1, SEQ ID NO: 1).

8. Штамм *K. lactis* по любому из предыдущих пунктов, характеризующийся тем, что в локусе KILAC4 штамма *K. lactis* находится ген чужеродного антигена VP2 IBDV.

9. Штамм *K. lactis* по п.1, характеризующийся тем, что в локусе KILAC4 штамма *K. lactis* находится ген чужеродного антигена HA вируса гриппа А ((A/Puerto Rico/8/1934(H1N1))).

10. Штамм *K. lactis* по любому из предыдущих пунктов, характеризующийся тем, что в локусе

KILAC4 штамма *K. lactis* вставлен ген чужеродного антигена VP2 IBDV.

11. Штамм *K. lactis* по любому из предыдущих пунктов, характеризующийся тем, что восстановлена генная функция аллелей Kllac4, Klura3-20 и Klmet5-I, и при этом штамм *K. lactis* является прототрофным.

12. Штамм *K. lactis* по любому из предыдущих пунктов, характеризующийся тем, что в локусы KILAC4, KIURA3-20 и KlMet5-1 штамма *K. lactis* вставлены гены чужеродных антигенов эктодомена E2 BVDV (тип 1, CP7), эктодомена E2 BVDV (тип 2, New York 93) и Npro-NS3 BVDV (Тип1, CP7).

13. Штамм *K. lactis*, который представляет собой VAK1283 DSM 32697.

14. Штамм *K. lactis*, который представляет собой VAK1395 DSM 32706.

15. Штамм *K. lactis*, который представляет собой VAK1400 DSM 32698.

16. Способ получения штамма *K. lactis* по любому из пп.1-15, включающий стадии:

(i) вставки генной последовательности требуемого антигена в вектор KIpURA3 и/или KIpMET5 и в вектор KIp3-MCS,

(ii) трансформации культуры *K. lactis* с помощью модифицированных и предварительно подвергнутых ферментативному расщеплению векторной конструкции и/или векторных конструкций,

(iii) отбора трансформированных клеток *K. lactis* с помощью твердой среды, которая не содержит урацил или/и метионин.

17. Способ по п.16, дополнительно включающий стадию (iv) восстановления прототрофии.

18. Способ по п.16 или 17, характеризующийся тем, что одновременно обеспечивают эктопическую вставку и регулируемую экспрессию генных последовательностей нескольких антигенов.

19. Способ по п.18, характеризующийся тем, что обеспечивают эктопическую вставку и регулируемую экспрессию различных генных последовательностей, которые кодируют антигены различных вариантов патогена.

20. Способ по п.18, характеризующийся тем, что обеспечивают эктопическую вставку и регулируемую экспрессию различных генных последовательностей, которые кодируют антигены различных патогенов.

21. Фармацевтическая композиция, содержащая штамм *K. lactis* по любому из пп.1-15.

22. Применение штамма *K. lactis* по любому из пп.1-15 в вакцинации.

23. Применение по п.22, характеризующееся тем, что штамм *K. lactis* вводится подкожно, внутримышечно, перорально или через слизистые оболочки.

24. Применение по п.22, характеризующееся тем, что штамм *K. lactis* после однократного применения или иммунизации или двукратного применения или иммунизации обеспечивает защитный иммунный ответ против патогена.

25. Применение по п.22, характеризующееся тем, что штамм *K. lactis* после однократного применения или иммунизации или двукратного применения или иммунизации обеспечивает перекрестный защитный иммунный ответ против различных вариантов патогена.

26. Применение по п.22, характеризующееся тем, что штамм *K. lactis* после однократного применения или иммунизации или двукратного применения или иммунизации обеспечивает защитный иммунный ответ против различных патогенов.

27. Применение штамма *K. lactis* по любому из пп.1-15 в защитной гуморальной вакцинации.

28. Применение по п.27, характеризующееся тем, что штамм *K. lactis* вводится подкожно, внутримышечно, перорально или через слизистые оболочки.

29. Применение по п.27, характеризующееся тем, что штамм *K. lactis* после однократного применения или иммунизации или двукратного применения или иммунизации обеспечивает защитный иммунный ответ против патогена.

30. Применение по п.27, характеризующееся тем, что штамм *K. lactis* после однократного применения или иммунизации или двукратного применения или иммунизации обеспечивает перекрестный защитный иммунный ответ против различных вариантов патогена.

31. Применение по п.27, характеризующееся тем, что штамм *K. lactis* после однократного применения или иммунизации или двукратного применения или иммунизации обеспечивает защитный иммунный ответ против различных патогенов.

32. Способ вакцинации, включающий введение штамма *K. lactis* по любому из пп.1-15 субъекту в количестве, достаточном для обеспечения у субъекта защитного иммунного ответа против одного или более чужеродных антигенов.

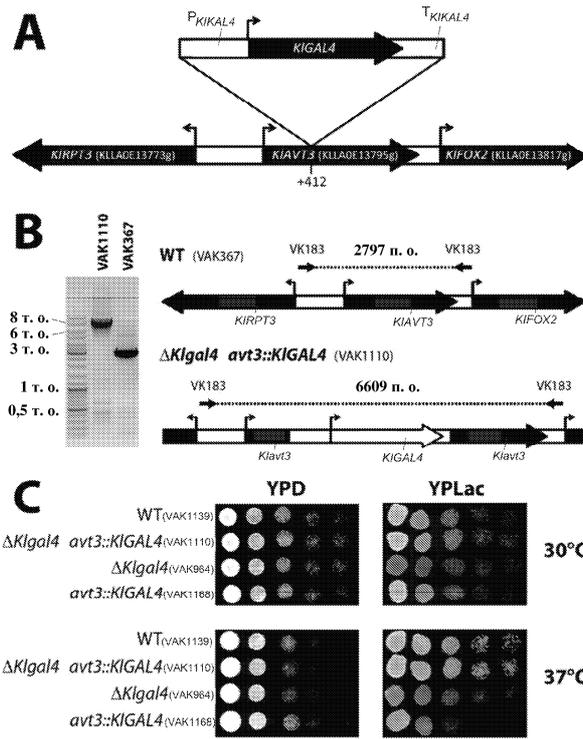
33. Способ по п.32, характеризующийся тем, что штамм *K. lactis* вводят подкожно, внутримышечно, перорально или через слизистые оболочки.

34. Способ по п.32 или 33, характеризующийся тем, что штамм *K. lactis* после однократного применения или иммунизации или двукратного применения или иммунизации обеспечивает защитный иммунный ответ против патогена.

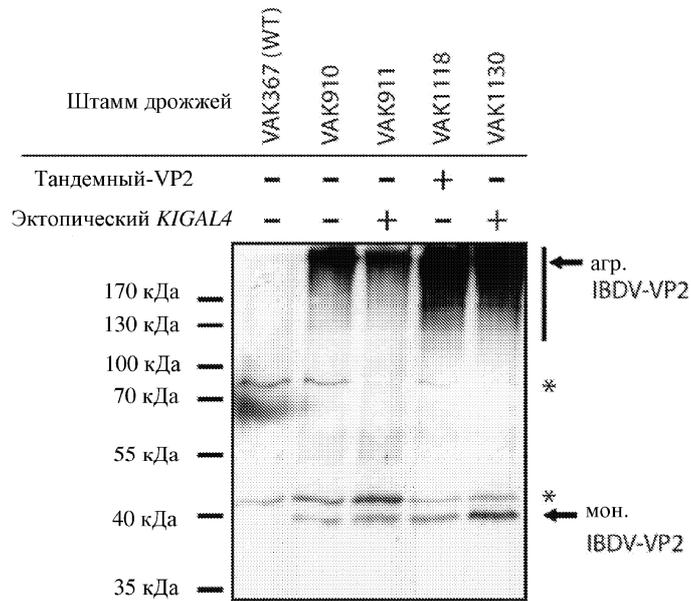
35. Способ по п.32 или 33, характеризующийся тем, что штамм *K. lactis* после однократного применения или иммунизации или двукратного применения или иммунизации обеспечивает перекрестный защитный иммунный ответ против различных вариантов патогена.

36. Способ по п.32 или 33, характеризующийся тем, что штамм *K. lactis* после однократного применения или иммунизации или двукратного применения или иммунизации обеспечивает защитный иммун-

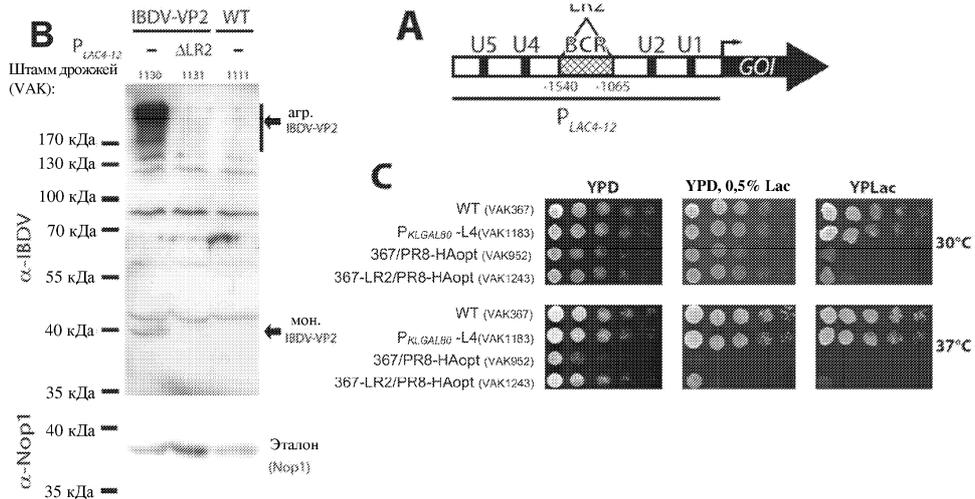
ный ответ против различных патогенов.



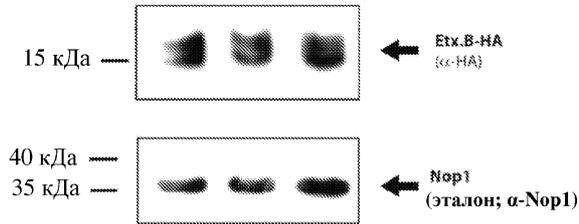
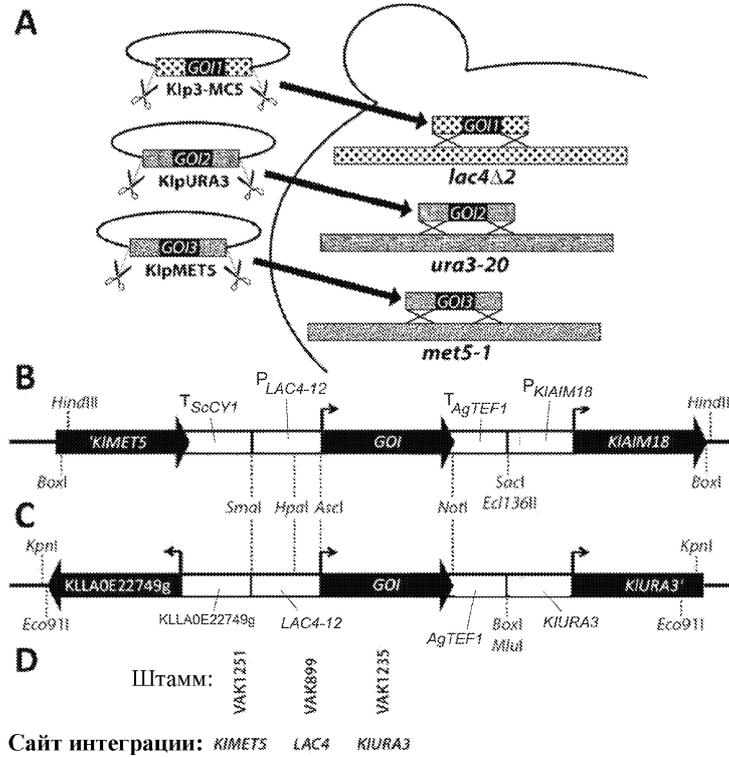
Фиг. 1



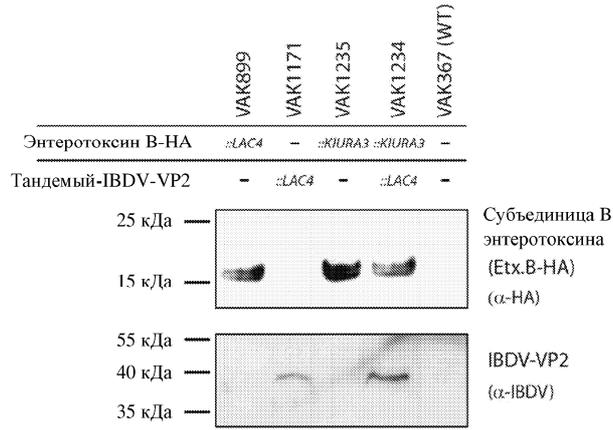
Фиг. 2



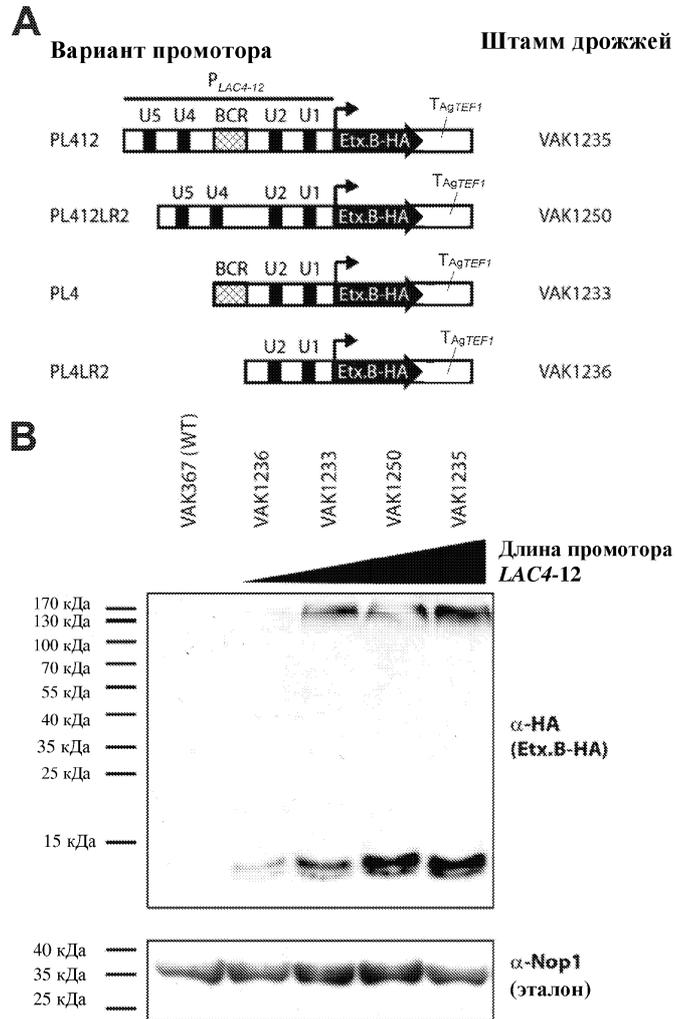
Фиг. 3



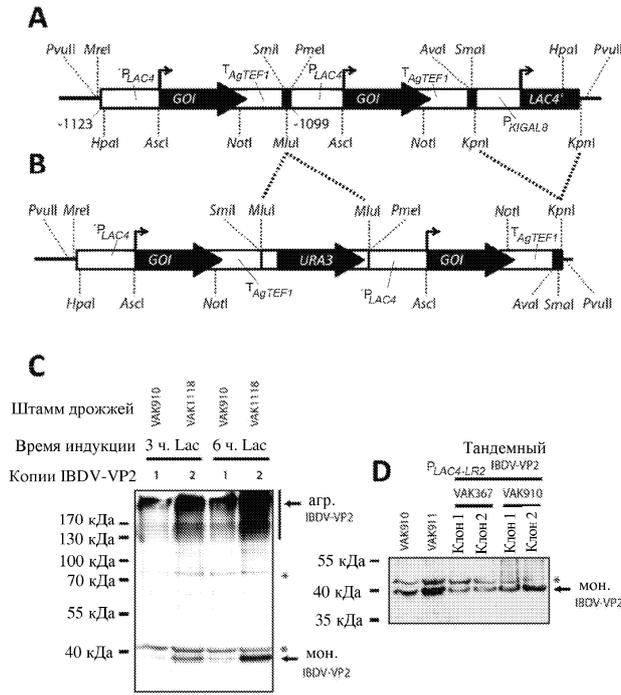
Фиг. 4



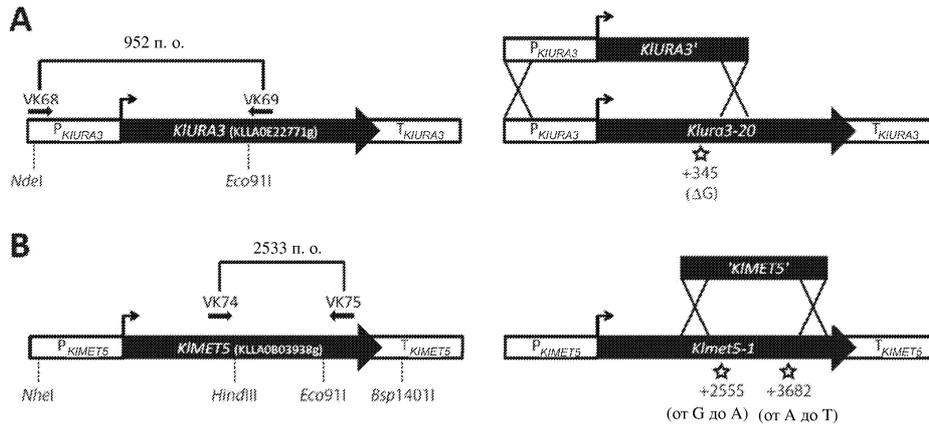
Фиг. 5



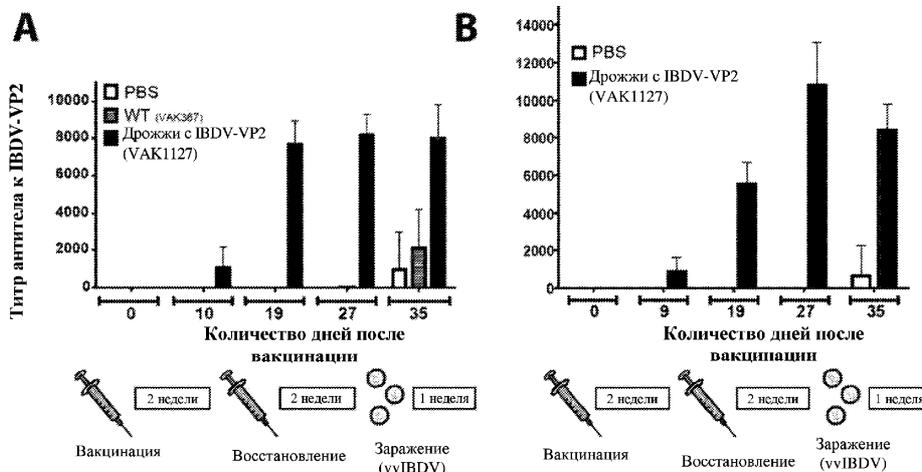
Фиг. 6



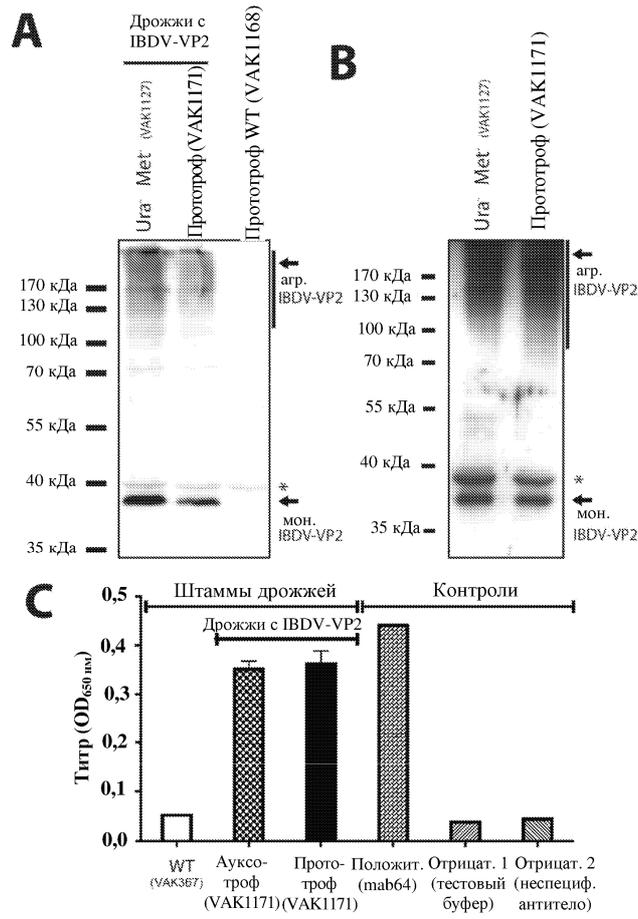
Фиг. 7



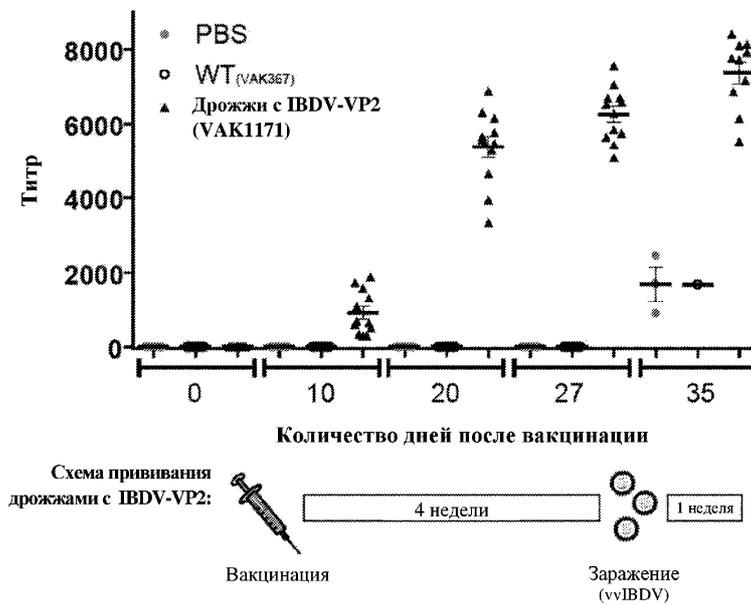
Фиг. 8



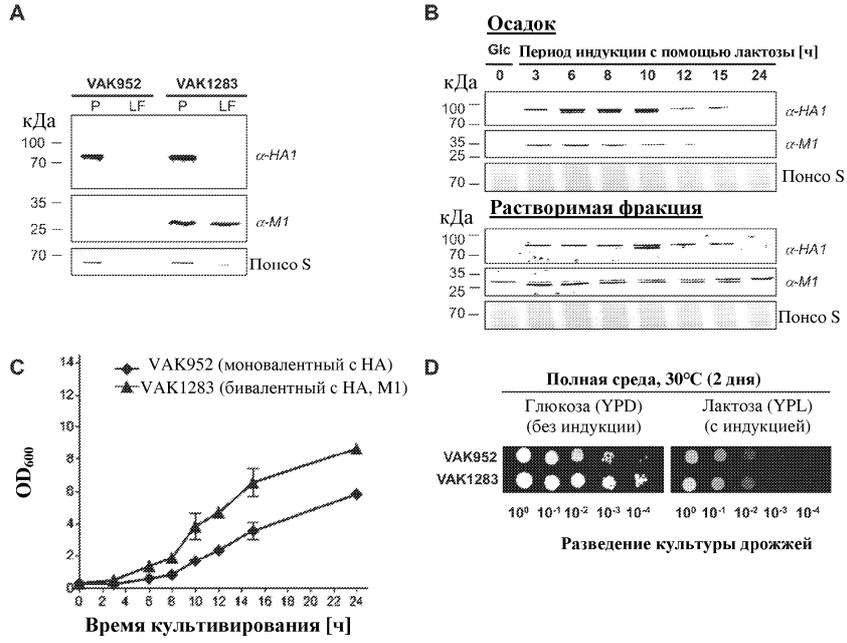
Фиг. 9



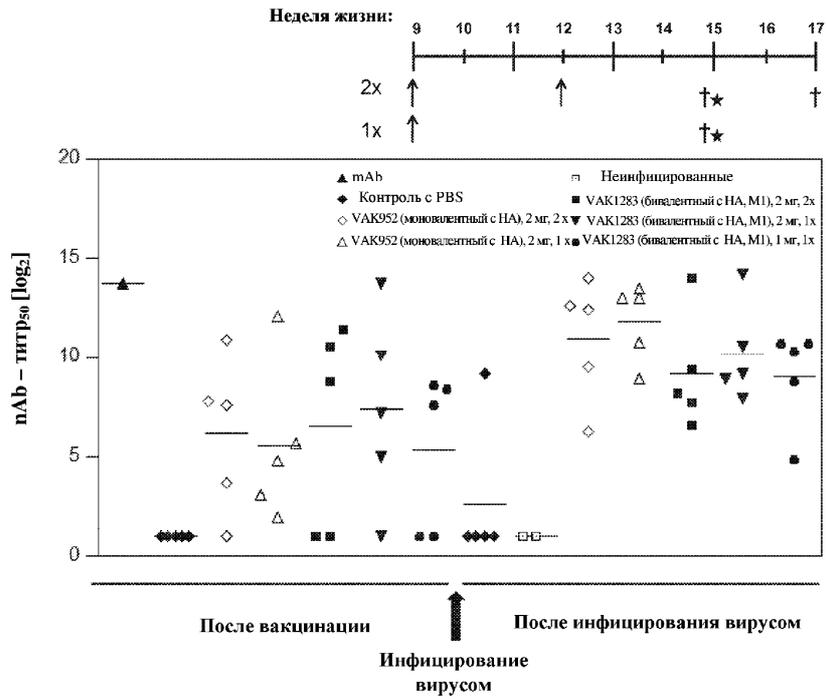
Фиг. 10



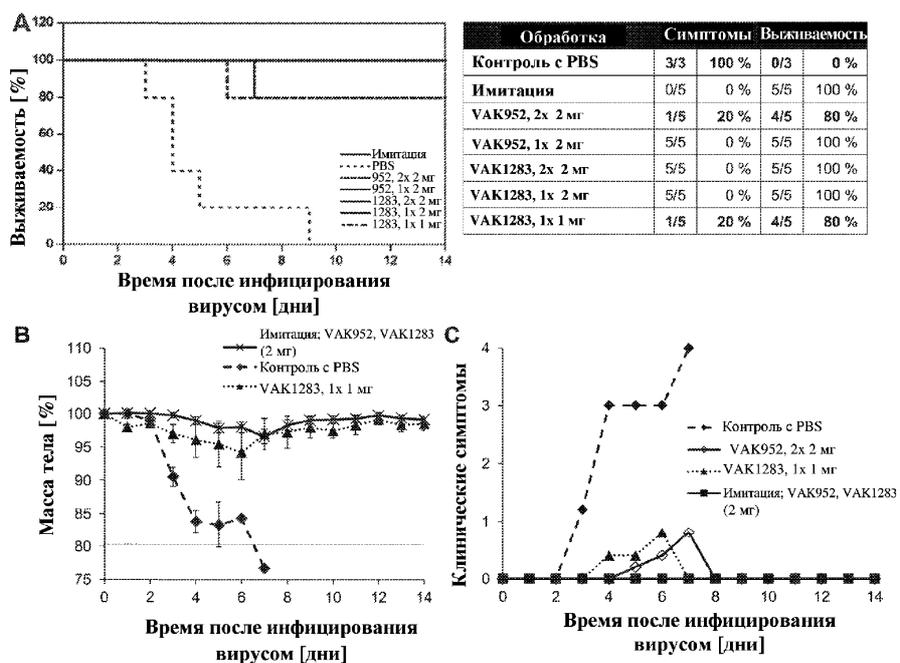
Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 14



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2